

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

5

VOLUME 41 (LXIX)  
PRAHA  
MAY 1996  
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

## Editorial Board – Redakční rada

### Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Members – Členové

Prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

RNDr. Mjlan Fgánek, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hoffrek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

M. V. Nermut, MD., PhD., Prof. emeritus, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s., Jílové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

**Cíl a odborná náplň:** Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agri-Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicita:** Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 41 vychází v roce 1996.

**Přijímání rukopisů:** Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

**Informace o předplatném:** Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1996 je 492 Kč.

**Aims and scope:** The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agri-Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicity:** The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 41 appearing in 1996.

**Acceptance of manuscripts:** Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

**Subscription information:** Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1996 is 115 USD (Europe), 120 USD (overseas).

# GOAT IODOPENIA AS A CAUSE OF CONGENITAL STRUMA IN KIDS

## JÓDOPÉŇIA KÔZ PRÍČINOU KONGENITÁLNEJ STRUMY U KOZLIAT

J. Bíreš<sup>1</sup>, P. Bartko<sup>1</sup>, T. Weissová<sup>1</sup>, A. Michna<sup>1</sup>, T. Matišák<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

<sup>2</sup>District Veterinary Administration, Spišská Nová Ves, Slovak Republic

**ABSTRACT:** The objective of the paper was to assess the occurrence of congenital struma in kids in relation to the clinical and biochemical finding in their mothers. Observations involved 46 imported goats of Saanen and Alpine breeds in the course of kidding and their kids. Thyroid gland hypertrophy (39 goats) and somewhat worse or even bad state of nutrition were dominant clinical findings in pregnant goats and in goats after kidding. Abortions in the last month of pregnancy were recorded in 14 goats, and 14 goats delivered stillborn kids. Eighteen goats delivered 26 liveborn kids, but 18 out of them died within 12 to 24 hours after birth. Dead kids were hairless, they had skin edema, and very shortened thoracic as well as pelvic limbs. The thyroid gland was well visible and palpable. Surviving kids lagged behind in their growth and often suffered from bronchopneumonia as an additional disease. Iodine concentration in the blood serum of goats ( $5.58 \pm 2.14 \mu\text{mol/l}$ ) was significantly lower ( $P < 0.01$ ) in comparison with kids ( $133.4 \pm 15.61 \mu\text{mol/l}$ ). This state was characterized by adequate  $T_3$  and  $T_4$  concentrations in the blood serum of goats ( $1.78 \pm 0.59$  and  $4.53 \pm 4.44 \text{ nmol/l}$ , resp.) and of kids ( $4.66 \pm 2.26$  and  $182.93 \pm 2.59 \text{ nmol/l}$ , resp.). Iodine content in the thyroid gland of the seven kids that died was  $1.86 \pm 0.96 \text{ mg/kg}$  fresh tissue. Examination of indicators of the internal environment in the blood serum showed alternate statistical differences ( $P < 0.01$ ) between adult goats and their kids in erythrocyte counts, hemoglobin, hematocrit value, leucocyte counts, activities of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, concentrations of total protein, albumin, total immunoglobulins, total lipids, cholesterol, phosphorus, copper, iron and zinc, while the explicit relation to disorders of iodine metabolism and thyroid hormones was not confirmed. The average content of iodine in the examined samples of soil ( $14.67 \text{ mg/kg}$ ) and alfalfa hay ( $0.1 \text{ mg/kg}$ ) demonstrated that primary deficiency of iodine in goats was the cause of congenital struma in kids.

goats; iodine deficiency; thyroid gland hypertrophy

**ABSTRAKT:** Cieľom práce bolo posúdiť výskyt kongenitálnej strumy u kozliat vo vzťahu ku klinickému a biochemickému nálezu ich matiek. Sledovania prebehli na 46 importovaných kozách plemena sánskeho a alpínskeho v priebehu kotení a ich kozľatách. Dominantný klinický nález u gravidných kôz a kôz po vykotení bola hypertrofia štítnej žľazy (39 kusov) a menej dobrý, až zlý výživný stav. 14 kôz potratilo v poslednom mesiaci gravidity a 14 kozám sa rodili mŕtve kozľatá. 18 kôz porodilo 26 živonarodených kozliat, z ktorých 18 uhynulo v priebehu 12 až 24 hodín po narodení. Mŕtve kozľatá boli neosrstené, s kožným edémom a malí výrazne skrátene hrudníkové aj panvové končatiny. Štítina žľaza bola dobre viditeľná a palpovateľná. Prežívajúce kozľatá zaostávali v raste a najčastejším pridruženým ochorením bola bronchopneumónia. Koncentrácia jódu v krvnom sére kôz ( $5,58 \pm 2,14 \mu\text{mol/l}$ ) bola v porovnaní s kozľatami ( $133,4 \pm 15,61 \mu\text{mol/l}$ ) signifikantne nižšia ( $P < 0,01$ ). Uvedenému stavu zodpovedali hladiny  $T_3$  a  $T_4$  v krvnom sére kôz ( $1,78 \pm 0,59$  resp.  $4,53 \pm 4,44 \text{ nmol/l}$ ) a kozliat ( $4,66 \pm 2,26$  resp.  $182,93 \pm 2,59 \text{ nmol/l}$ ). Obsah jódu v štítnej žľaze siedmich uhynutých kozliat bol  $1,86 \pm 0,96 \text{ mg/kg}$  čerstvého tkaniva. Zo sledovaných parametrov vnútorného prostredia v krvnom sére boli striedavo zaznamenané štatistické rozdiely ( $P < 0,01$ ) medzi dospelými kozami a ich mláďatami pri erytrocytoch, hemoglobíne, hematokrite, leukocytoch, aktivite aspartátaminotransferázy, alanínaminotransferázy, gamaglutamyltranspeptidázy, alkalickéj fosfatázy, koncentrácií celkových bielkovín, albumínu, celkových imunoglobulínov, celkových lipidov, cholesterolu, fosforu, meďi, železa a zinku, pričom jednoznačná súvislosť na poruchy metabolizmu jódu a tyroidných hormónov sa nepotvrdila. Priemerné množstvo jódu vo vyšetrovaných vzorkách pôdy ( $14,67 \text{ mg/kg}$ ) a lucernového sena ( $0,1 \text{ mg/kg}$ ) poukázali, že príčinou kongenitálnej strumy u kozliat bola primárna karencia jódu u kôz.

kozy; karencia jódu; hypertrofia štítnej žľazy

### ÚVOD

Jód ako esenciálny mikroprvok potrebný pre vývoj štítnej žľazy zasahuje do syntézy tyroxínu a trijódtyro-

nínu. Prostredníctvom tyreoidných hormónov ovplyvňuje jód celkový vývoj a rast tkanív, celulárnu spotrebu kyslíka, rast a zrenie buniek, metabolizmus lipidov, sacharidov, minerálnych látok a vitamínov (Davis a i.,

1988; Kanagawa a i., 1990; Rhind a i., 1991; Thilly a i., 1992; Bíreš a i., 1993). Bezprostredný vzťah jódu bol potvrdený najmä k reprodukčnému aparátu samic a samcov a v ostatnom období sa sleduje jeho úloha pri obranných reakciách organizmu (Rastogi a Agarwal, 1990; Cole a i., 1994).

Primárna alebo sekundárna karencia jódu je spojená so zvýšenou sekréciou tyroid-stimulujúceho hormónu, hyperpláziou štítnej žľazy, hypotyreoidizmom, poklesom tyroxínu a normálnou alebo mierne zvýšenou koncentráciou trijódotyronínu v krvnom sére alebo plazme (Hetzel, 1989; Janssen a i., 1994). Výsledkom uvedených biochemických zmien je zastavenie alebo spomalenie rastu zvierat, kreténizmus, zníženie produkcie, dystrofické procesy v parenchýme pečene, obličiek, svalovine srdca a hyperplázia hypofýzy (Mano a i., 1985; Ramakrishna a Prasad, 1992). U zvierat trpiacich deficienciou jódu sa znižuje vitálna kapacita pľúc, je narušený termoregulačný systém a zvyšuje sa náchylnosť k iným ochoreniam (Jones a i., 1986; Beard a i., 1989). Najnáchylnejšie na nedostatočný prívod jódu sú mladé zvieratá s vysokou produkciou a v priebehu gravidity.

Cieľom práce bolo posúdiť výskyt kongenitálnej strumy u kozliat vo vzťahu ku klinickému a biochemickému nálezu ich matiek.

## MATERIÁL A METÓDY

Sledovanie prebehlo v chove importovaných kôz plemena sánskeho (18 kusov) a alpínskeho (28 kusov) vo veku 18 až 24 mesiacov. Vyšetrenia pozostávajúce z klinického pozorovania, odberu biologického materiálu, biochemických analýz a patologicko-anatomickej pitvy sa robili v priebehu kotenja sedem mesiacov po privezení kôz na Slovensko z Marseille. Chov importovaných kôz na Slovensku sa realizoval v podhorskej oblasti stredného Spiša. Kŕmna dávka v letnom období pozostávala z pastvy, počas zimy kozy dostávali lucernové seno (4 kg/kus/deň), jačmenný šrot (0,6 kg/kus/deň), nejudidovanú kusovú soľ a vodu (*ad libitum*).

Pôdne vzorky za účelom analýzy jódu boli odobraté z troch stanovíšť (pastva, porasty pre výrobu objemového a jadrového krmiva) sondovacími tyčami do hĺbky 20 cm, pričom na jednu pôdnu vzorku bolo urobených 25 až 30 vpichov. Odobraté vzorky sa po vrusení homogenizovali a preosiali cez sito o priemere ôk 2 mm. Hmotnosť vzorky určenej pre analýzu tvorilo 400 g jemnozeme. Stanovenie I bolo robené taktiež v krmive (lucernové seno, jačmenný šrot a kusová soľ).

Klinické vyšetrenie sa robilo tak u kôz, ako i kozliat počas celého obdobia kotenja (február–marec). Krv pre biochemické vyšetrenie sa odoberala z *v. jugularis* od 20 kôz (10 ks plemena sánskeho a 10 ks plemena alpínskeho) s rôznou formou klinickej manifestácie strumy 7 až 14 dní po fyziologickom pôrode alebo potrate. Krv od 8 kozliat vo veku 4 až 8 dní sa získala vepunkciou z *v. jugularis*. Vzorky štítnej žľazy, pravého

pečeňového laloku a kôrovej časti pravej obličky sa odobrali pri pitve siedmich mŕtvonarodených kozliat.

Hematologické vyšetrenie (Er – erytrocyty, Hb – hemoglobín, Ht – hematokrit, Lc – leukocyty) sa robilo na prístroji Serno-S-150. Aktivita enzýmov aspartátamínوترansferázy – AST (E.C. 2.6.1.1.), alanínaminوترansferázy – ALT (E.C. 2.6.1.2.), gamaglutamyltransferázy – GMT (E.C.2.3.2.1.) a alkalickéj fosfatázy – ALP (E.C. 3.1.3.1.) sa stanovila Bio-La testom (Lachema Brno). Celkové imunoglobulíny (IgC) sa analyzovali v krvnom sére turbidimetricky (Mc Ewan a i., 1970), albumín (ALB) fluorometricky na prístroji JASCO EP 550, celkové bielkoviny (CB) Bio-La testom (Lachema Brno) a celkový bilirubín (C. bil.) fotometricky podľa Jendrassika a Grofa (1938).

Analýza glukózy (Gluk), celkových lipidov (TL) a cholesterolu (Chol) bola v krvnom sére robená Bio-La testom (Lachema Brno). Stanovenie Ca, P, Mg, Cu, Fe, Zn a Se sa v krvnom sére a vyšetovaných orgánoch robilo metódou atómovej absorpčnej spektrofotometrie na prístroji Perkin Elmer 1100 a 4100 ZL. Samotná mineralizácia pečene, obličiek a štítnej žľazy prebiehala v zmesi HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v Microwave Laboratory System (Milestone mls 1200). Jód v pôde, krmivách, krvnom sére a biologickom materiáli kôz sa stanovil kolorimetricky (Tušl, 1981, 1983). Pre stanovenie koncentrácie trijódotyronínu a tyroxínu sa použil RIA-test T<sub>3</sub> a T<sub>4</sub> (ÚRVJT Košice). Komparácia výsledkov analýz bola robená Studentovým *t*-testom.

## VÝSLEDKY

### Koncentrácia jódu v pôde a krmivách

Priemerné množstvo jódu vo vyšetovaných vzorkách pôdy bolo 14,67 mg/kg, lucernovom sene 0,1 mg/kg, jačmeni 0,6 mg/kg a kusovej soli 0,7 mg/kg.

### Klinický obraz

Gravidné kozy a kozy po vykotení boli v menej dobrom až zlom výživnom stave. U 39 sledovaných kôz sa pozorovalo zväčšenie štítnej žľazy, ktorej veľkosť sa pohybovala od fazule až po semenníky dospelého barana. Hypertrofovaná štítina žľaza bola na pohmat tuhoelastická až tuhá a nebolestivá. Zväčšenie štítnej žľazy bolo väčšinou symetrické. Príjem krmiva a správanie postihnutých kôz nebolo zmenené. Z ostatných zmien boli u 30 kôz charakteristické alopetické ložiská na koži hlavy, krku, hrudníka a chrbta, ktorých veľkosť bola hrášku až detskej dlane. Zistený klinický nálež nebol závislý na plemennej príslušnosti.

Štrnásť kôz potratilo v poslednom mesiaci gravidity a ďalším 14 kozám sa narodili mŕtve kozlatá. Ostatných 18 kôz porodilo 26 živonarodených kozliat, z ktorých 18 uhynulo v priebehu 12 až 24 hodín po narodení. Mŕtve kozlatá boli neosrstené, s kožným edémom a mali výrazne skrátané hrudníkové i panvové končatiny.

ny. U 20 kusov bol v dôsledku objemnej hlavičky pozorovaný nepomer medzi telom. Štítina žľaza dosahovala veľkosť holubacieho vajca a na pohmat bola mäkkej konzistencie. Živé kozľatá mali nižšiu pôrodnú hmotnosť ( $3,6 \pm 0,9$  kg) a boli málo životaschopné. Reflex cicania bol často vymiznutý a tri kusy sa nevedeli vôbec postaviť. Rektálna teplota pri narodení sa pohybovala od 39 do 39,4 °C, počet pulzov 140 až 190/min a počet dychov 70 až 100/min. Zvýšený bronchiálny tonus bol dobre počuteľný na obidvoch stranách pľúcneho poľa. Štítina žľaza bola dobre viditeľná a palpovateľná. Najčastejším pridruženým ochorením bola bronchopneumónia. Prežívajúce kozľatá zaostávali v raste a zvýšila sa u nich náchylnosť k ostatným ochoreniam.

#### Laboratórny nález

Výsledky biochemických vyšetrení krvi a krvného séra sú uvedené v tabuľkách I až VII.

Hodnoty Er, Hb a Ht u dospelých kôz boli v porovnaní s kozľatami signifikantne vyššie ( $P < 0,01$ ) – tab. I. Počet Lc bol u kôz  $13,04 \pm 1,87$  G/l a u ich mláďat  $17,35 \pm 0,35$  G/l. Rozdiel v uvedenom parametri medzi porovnávanými skupinami ležal na hranici významnosti  $P < 0,01$ . Preukazuje nižšia aktivita bola u matiek oproti kozľatám u AST a ALP ( $P < 0,01$ ) a vyššia pri ALT ( $P < 0,01$ ) – tab. II. Aktivita GMT a koncentrácia C. bil. u kôz a ich kozliat bola vyrovnaná. Ukazovatele bielkovinového profilu (CB, ALB, IgC) dosahovali v krvnom sére kôz štatisticky vyššie hladiny ako u ich mláďat ( $P < 0,01$ ) – tab. III. Parametre energetického profilu (Gluk, TL, Chol) boli v krvnom sére kôz v porovnaní s kozľatami signifikantne nižšie ( $P < 0,01$  – tab. IV). Sérová koncentrácia fosforu u kôz bola oproti mláďatám preukazne nižšia ( $P < 0,01$ ) – tab. V. Množstvo vápnika v krvnom sére nebolo medzi porovnávanými skupinami signifikantne rozdielne. Obsah horčíka v krvnom sére matiek a mláďat bol vyrovnaný ( $1,15 \pm 0,13$  resp.  $1,07 \pm 0,06$  mmol/l). Hladiny stopových prvkov (Fe, Cu, Zn) v krvnom sére kôz signifikantne prevyšovali ich množstvo u kozliat ( $P < 0,01$ ) – tab. VI. Koncentrácia jódu v krvnom sére kozliat presahovala jeho hladiny u kôz 26-násobne ( $133,4 \pm 15,61$  resp.  $5,58 \pm 2,14$  μmol/l). Rozdiel bol štatisticky významný ( $P < 0,01$ ). Uvedenému stavu zodpovedal obsah  $T_3$  a  $T_4$ , ktorý bol v krvnom sére kozliat v porovnaní s matkami signifikantne vyšší ( $P < 0,01$ ) – tab. VII. Koncentrácia selénu v krvnom sére kôz bola  $1,71 \pm 0,27$  μmol/l a u kozliat  $1,58 \pm 0,48$  μmol/l.

Biochemické zmeny neboli ovplyvnené plemennou príslušnosťou.

Koncentrácia Ca, P, Mg, Cu, Fe, Zn, Se a I vo vyšetovaných orgánoch kozliat je zaznamenaná v tab. VIII. Pre vyšetované tkanivo štítnej žľazy bola charakteristická najvyššia kumulácia jódu ( $1,86 \pm 0,96$  mg/kg), selénu ( $0,068 \pm 0,048$  mg/kg), fosforu ( $1\ 818,13 \pm 524,38$  mg/kg) a vápnika ( $79,83 \pm 21,48$  mg/kg). V pečení sa pozorovali najvyššie hodnoty Mg, Cu, Fe a Zn.

#### DISKUSIA

Obsah jódu v troch analyzovaných vzorkách pôdy zo sledovanej oblasti spĺňal minimálne požiadavky, pretože výskyt strumy vzniká už na pôdach s obsahom okolo 10 mg/kg (Vrzgula a Jagoš a kol., 1986). Uvedenému pôdnemu jódu zodpovedala i jeho koncentrácia vo vyšetovaných krmivách, pričom najchudobnejšie bolo lucernové seno. Pre optimálne zásobenie prežúvavcov je však potrebné, aby krmna dávka obsahovala 0,2 až 0,6 mg/kg jódu (Groppeľ a i., 1986; Jenkins a Hidiroglou, 1990; Swanson a i., 1990).

Z pohľadu nameraných hodnôt jódu v pôde a krmivách bola pravdepodobnou príčinou porúch metabolizmu jódu u importovaných kôz jeho primárna karencia. Tá sa manifestovala u dospelých kôz hyperplastickou strumou, častými abortami a neuspokojivým výživným stavom. Zistený klinický nález je u zvierat trpiacich deficienciou jódu spojený s poruchou jodizácie a deiodizácie tyroidných hormónov v štítnej žľaze a narušením celkového metabolizmu (Leirer a i., 1983; Janssen a i., 1994). Zvlášť citlivé na nedostatočný prívod jódu sú gravidné zvieratá, čo sa v sledovanom chove prejavilo potratmi a rodením mŕtvych kozliat. Tie boli neosrstené a malformované.

Kongenitálna agenéza štítnej žľazy je okrem fyzického zastavenia vývoja plodu doprevádzaná v dôsledku poruchy syntézy mozgovej DNA kreténizmom (Pérez a i., 1984; Hetzel, 1990). Príčinou pozorovanej generalizovanej alopecie u mŕtvonarodených kozliat je podľa autorov Ramakrishna a Prasad (1992) pri intrauterinnej karencii jódu hyperkeratóza epidermy a keratinizácia vlasových folikulov, čo len potvrdzuje úlohu tyroxínu pri formovaní epidermálnych útvarov.

U ôsmich živých kozliat dominovala struma rôzneho rozsahu, celková slabosť, nevyvinutý reflex cicania a vysoká predispozícia k ochoreniam dýchacieho systému. Zistený nález je výsledkom agenézy alebo hypogenézy štítnej žľazy u vyvíjajúceho sa plodu, pretože syntéza tyroidných hormónov začína za normálnych podmienok v druhom až treťom mesiaci gestácie (Pérez a i., 1984; Hetzel, 1989). Navyše kompenzácia nedostatočnej tvorby tyroidných hormónov vo fete je zo strany matky limitovaná, nakoľko ich prechod placentou je obmedzený (Jost, 1966). Perzistencia nami zaznamenaných zvýšených triasových hodnôt u kozliat po narodení (frekvencia dychu a pulzu) je taktiež pri nízkej syntéze tyroxínu výsledkom poruchy termoregulácie (Bate a i., 1993). Respiračné poruchy sú podobne pri karencii jódu spôsobené nízkymi hladinami tyroidných hormónov, ktoré počas intrauterinného vývoja negatívne ovplyvňujú vývoj pľúcnych lalokov vo fete (Jones a i., 1986).

Popísanému klinickému nálezu u vyšetovaných zvierat laboratórne zodpovedali hladiny jódu a tyroidných hormónov v krvnom sére dospelých kôz. Nameované hodnoty jódu v krvnom sére kôz sú charakteristické pre rozsiahlu karenciu s negatívnym dopadom na

I. Hematologický profil – Hematologic profile

Ukazovateľ <sup>1</sup>	Er T/l	Hb g/dcl	Ht l/l	Lc G/l
Kozy <sup>2</sup> $\bar{x}$	15,45**	8,92**	0,31**	13,04**
n = 20 $\pm s$	1,41	0,76	0,03	1,87
Kozfatá <sup>3</sup> $\bar{x}$	9,02	11,27	0,23	17,35
n = 8 $\pm s$	0,88	0,18	0,02	0,35

\*\* =  $p < 0,01$ ; <sup>1</sup>indicator, <sup>2</sup>goats, <sup>3</sup>kids

II. Enzymatický profil v krvnom sére (μkat/l) – Enzymatic profile in blood serum

Ukazovateľ <sup>1</sup>	AST	ALT	GMT	ALP
Kozy <sup>2</sup> $\bar{x}$	0,323**	0,373**	0,727	0,365**
n = 20 $\pm s$	0,049	0,077	0,305	1,329
Kozfatá <sup>3</sup> $\bar{x}$	0,764	0,146	0,737	4,72
n = 8 $\pm s$	0,251	0,027	0,073	1,63

\*\* =  $p < 0,01$ ; For 1–3 see Tab. I

III. Koncentrácia celkových bielkovín (CB), albumínu (ALB), celkových imunoglobulínov(IgC) a celkového bilirubínu (C. bil.) v krvnom sére – Concentrations of total protein (CB), albumin (ALB), total immunoglobulins (Igc) and total bilirubin (C. bil.) in blood serum

Ukazovateľ <sup>1</sup>	CB (g/l)	ALB (g/l)	IgC (U ZST)	C. bil. (μmol/l)
Kozy <sup>2</sup> $\bar{x}$	69,79**	49,19**	23,48**	6,55
n = 20 $\pm s$	6,39	4,16	3,91	1,94
Kozfatá <sup>3</sup> $\bar{x}$	55,85	39,75	12,64	6,44
n = 8 $\pm s$	3,71	6,53	5,46	1,11

\*\* =  $p < 0,01$ ; For 1–3 see Tab. I

IV. Koncentrácia glukózy (Gluk), celkových lipidov (TL) a cholesterolu (Chol) v krvnom sére – Concentrations of glucose (Gluk), total lipids (TL) and cholesterol (Chol) in blood serum

Ukazovateľ <sup>1</sup>	Gluk (mmol/l)	TL (g/l)	Chol (mmol/l)
Kozy <sup>2</sup> $\bar{x}$	0,48**	2,41**	2,39**
n = 20 $\pm s$	0,48	0,42	0,54
Kozfatá <sup>3</sup> $\bar{x}$	3,0	4,36	3,21
n = 8 $\pm s$	1,10	1,12	1,16

\*\* =  $p < 0,01$ ; For 1–3 see Tab. I

V. Makromineralný profil v krvnom sére (mmol/l) – Macromineral profile in blood serum

Ukazovateľ <sup>1</sup>	Ca	P	Mg
Kozy <sup>2</sup> $\bar{x}$	2,52	2,21**	1,15
n = 20 $\pm s$	0,11	0,37	0,13
Kozfatá <sup>3</sup> $\bar{x}$	2,71	3,17	1,07
n = 8 $\pm s$	0,27	0,39	0,06

\*\* =  $p < 0,01$ ; For 1–3 see Tab. I

VI. Mikromineralný profil v krvnom sére (μmol/l) – Micromineral profile in blood serum

Ukazovateľ <sup>1</sup>	Cu	Fe	Zn	Se	J
Kozy <sup>2</sup> $\bar{x}$	16,26**	24,02**	9,61**	1,71	5,58**
n = 20 $\pm s$	1,58	2,19	1,54	0,27	2,14
Kozfatá <sup>3</sup> $\bar{x}$	9,45	17,46	6,12	1,58	133,4
n = 8 $\pm s$	1,11	1,90	1,08	0,48	15,61

\*\* =  $p < 0,01$ ; For 1–3 see Tab. I

VII. Koncentrácia trijódtyronínu ( $T_3$ ) a tyroxínu ( $T_4$ ) v krvnom sére (nmol/l) – Concentrations of triiodothyronine ( $T_3$ ) and thyroxine ( $T_4$ ) in blood serum

Ukazovateľ <sup>1</sup>		$T_3$	$T_4$
Kozy <sup>2</sup>	$\bar{x}$	1,78**	4,53**
$n = 20$	$\pm s$	0,59	4,44
Kozlatá <sup>3</sup>	$\bar{x}$	4,66	182,93
$n = 8$	$\pm s$	2,26	2,59

\*\* =  $p < 0,01$ ; For 1–3 see Tab. I

VIII. Koncentrácia Ca, P, Mg, Cu, Fe, Zn, Se a I v štítnej žľaze, pečeni a obličkách mŕtvonarodených kozliat (mg/kg čerstvého tkaniva) – Ca, P, Mg, Cu, Fe, Zn, Se and I concentrations in the thyroid gland, liver and kidneys of stillborn kids (mg/kg fresh tissue)

Ukazovateľ <sup>1</sup>		Ca	P	Mg	Cu	Fe	Zn	Se	I
Štítna žľaza <sup>2</sup>	$\bar{x}$	79,83	1 818,13	156,88	1,84	65,76	23,39	0,068	1,86
$n = 7$	$\pm s$	21,48	524,38	79,80	0,75	21,01	18,60	0,048	0,96
Pečeň <sup>3</sup>	$\bar{x}$	62,55	125,65	1 553,85	31,85	649,20	28,90	0,035	1,10
$n = 7$	$\pm s$	14,71	40,65	368,29	14,52	234,21	7,09	0,022	0,58
Obličky <sup>4</sup>	$\bar{x}$	54,0	1 125,36	124,31	1,56	51,80	13,36	0,025	0,78
$n = 7$	$\pm s$	7,82	505,03	14,03	0,40	18,33	2,21	0,001	0,64

<sup>1</sup>indicator, <sup>2</sup>thyroid gland, <sup>3</sup>liver, <sup>4</sup>kidneys

produkcii  $T_3$  a  $T_4$  (Körber a i., 1984; Mano a i., 1985; Bireš a i., 1993). Koncentrácia uvedených parametrov bola v krvnom sére štvor- až osemďňových kozliat v porovnaní s matkami signifikantne vyššia ( $P < 0,01$ ) a predovšetkým hladiny jódu ( $133,4 \pm 15,61 \mu\text{mol/l}$ ) a  $T_3$  ( $4,66 \pm 2,24 \text{ nmol/l}$ ) indikovali len okrajovú jodopéniu (Durdvič a i., 1980; Rastogi a Agarwal, 1990). Naproti tomu množstvo jódu v štítnej žľaze ( $1,86 \pm 0,96 \text{ mg/kg}$ ), ale i v pečeni a obličkách poukazuje na základe zistení autorov Gropel a i. (1986) u kozliat na rozsiahlu deficienciu jódu spojenú s hypotyreózou. Štatisticky vyššie hodnoty jódu a jeho metabolitov v krvnom sére kozliat ako u matiek boli pravdepodobne viazané na príjem jódu v mlieku resp. mlieku a intenzívnejšou metabolickou aktivitou štítnej žľazy mláďat reagovať na deficitný príjem jódu.

Zo sledovaných parametrov vnútorného prostredia boli striedavo zaznamenané štatistické rozdiely medzi dospelými kozami a ich mláďatmi, pričom jednoznačná súvislosť na primárnu karenciu jódu sa nepotvrdila. Všeobecne ukazovatele hematologického profilu, aktivity enzýmov, koncentrácia CB, ALB, IgC, Cu, Fe a Zn dosahovali u kôz v porovnaní s kozlatami fyziologickejšie, hladiny. Najvyššie vybočenie z referenčného rozpätia sa u kozliat zistilo v počte Lc, aktivite ALP, koncentrácií Ht, IgC, Cu, Fe, Zn a u dospelých kôz v obsahu glukózy a Zn. U mláďat a matiek sa pozorovala okrajová hyperbilirubinémia. Namerané hodnoty ostatných biochemických ukazovateľov tak u kôz ako u ich mláďat sa pohybovali v rámci fyziologického rozpätia, ktoré v našich chovateľských podmienkach udávajú Bireš a i. (1993), Martinko a Krokavec (1993).

U obidvoch vyšetrovaných kategórií kôz bola zaznamenaná výrazná karencia zinku. Laboratórnemu nálezu Zn v krvnom sére a analyzovaných orgánoch zodpovedali i alopetické ložiská na koži. Deficiencia zinku u zvierat s jodopéniou podľa autorov Oliver a i. (1987), Smith a i. (1993) zvyšuje vylučovanie tyrotopínu a cestou inhibičného vplyvu na periférnu jodinizáciu tyroxínu spôsobuje pokles sérového trijódtyronínu. Rozsiahla hypoinmunoglobulinémia, ktorá sa potvrdila u vyšetrovaných kozliat na základe koncen-

trácie IgC v krvnom sére ( $12,64 \pm 5,46 \text{ ZST}$ ) je u zvierat trpiacich karenciou väčšinou spojená s nedostatočným formovaním obranných reakcií (Schöne a i., 1987; Woods a Woodward, 1991). Mierne vybočenie ostatných vyšetrovaných indexov v krvi, krvnom sére z referenčného rozpätia u kôz a kozliat, ako i analyzovaných minerálnych prvkov v orgánoch uhynutých kozliat, možno považovať za nešpecifický výsledok narušenia celkového metabolizmu pri primárnej deficiencii jódu.

## LITERATÚRA

- BATE, C. A. – FINSTEN, A. – CROSSLEY, J. G.: Postnatal thyroxine status of piglets in response to prenatal thyroxine infusion of the sow. *Can. J. Anim. Sci.*, 73, 1993: 533–538.
- BEARD, J. – TOBIN, B. – GREEN, W.: Evidence for thyroid hormone deficiency in iron-deficient anemic rats. *J. Nutr.*, 119, 1989: 772–778.
- BÍREŠ, J. – BARTKO, P. – MARAČEK, I.: Chronická alopetická dermatóza u kôz z aspektu plemenných a metabolických kritérií. *Slov. Vet. Čas.*, 18, 1993: 20–35.
- BÍREŠ, J. – BARTKO, P. – PAUER, T. – JUHÁSOVÁ, Z. – BEKEOVÁ, E. – GEDEON, V.: Jodopéniá u plemenných baranov – klinika, patologicko-anatomický a laboratórny nález. *Veterinářství*, 43, 1993: 6–8.
- COLE, N. A. – GALLAVAN, R. H. – RODRIGUEZ, S. L. – PURDY, C. W.: Influence of triiodothyronine injection on calf immune response to an infectious Bovine rhinotracheitis virus challenge and nitrogen balance of lambs. *J. Anim. Sci.*, 72, 1994: 1263–1273.
- DAVIS, S. R. – COLLIER, R. J. – McNAMARA, J. P. – HEAD, H. H. – CROOM, W. J. – WILCOX, C. J.: Effects

- of thyroxine and growth hormone treatment of dairy cows on mammary uptake of glucose, oxygen and other milk fat precursors. *J. Anim. Sci.*, 66, 1988: 80–89.
- DURDEVIČ, J. – STOJČIĆ, V. – JOVANOVIĆ, M. S. – RADAKOVIĆ, N.: Concentration of thyroxine, triiodothyronine and cortisol in the blood serum of ketotic cows. *Acta Vet. (Beograd)*, 30, 1980: 7–12.
- GROPPEL, B. – ANKE, M. – SCHOLZ, E. – KÖHLER, B.: The influence of different iodine supply on reproduction and the intrathyroidal iodine content of goats and sheep. In: Spurenelementensymposium – Jod, KMU Leipzig, FSU Jena, 1986: 72–80.
- HETZEL, B. S.: The iodine deficiency disorders: their nature and prevention. *Ann. Rev. Nutr.*, 9, 1989: 21–38.
- HETZEL, B. S.: Iodine deficiency: an international public health problem. In: BROWN, M. L. (ed.): Present knowledge in nutrition. Washington, ILSI 6th ed. 1990: 308–313.
- JANSSSEN, K. – HEIDE, D. – VISSEE, T. J. – KAPTEIN, E. – BEYNEN, A. C.: Thyroid function and deiodinase activities in rats with marginal iodine deficiency. *Biol. Trace Elem. Res.*, 40, 1994: 237–246.
- JENDRASSIK, L. – GROF, P.: Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. *Biochem. Z.*, 297, 1938: 6–13.
- JENKINS, K. J. – HIDIROGLOU, M.: Effects of elevated iodine in milk replacer on calf performance. *J. Dairy Sci.*, 73, 1990: 804–807.
- JONES, B. R. – GREENWAY, R. M. – JOLLY, R. D. – LABUC, R. H. – DAVIS, G. B.: Thyroglobulin synthesis in an inherited ovine goitre: possible neonatal respiratory distress syndrome. *N. Z. Vet. J.*, 34, 1986: 145–148.
- JOST, A.: Anterior pituitary function in foetal life. In: HARRIS, G. W. – DONOVAN, V. T. (ed.): The pituitary gland. London, Butterworth, 1966. 299 s.
- KANAGAWA, Y. – SATAKE, T. – KAWASHIMA, R.: Effect of thyroxine injection on bone growth in energy deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 36, 1990: 24–249.
- KÖRBER, R. – JÄKEL, L. – ZASTROW, H. J. – ROSSOW, N.: Untersuchungen zur pathophysiologischen Wirkung des Jodmangels auf die Fruchtbarkeit von Kühen. *Mh. Vet.-Med.*, 39, 1984: 805–808.
- LEIRER, R. – KÖRBER, R. – JÄKEL, L.: Untersuchungen zum Jodmangelsyndrom beim Rind. *Mh. Vet.-Med.*, 38, 1983: 103–109.
- MANO, M. T. – POTTER, B. J. – BELLING, G. B. – HETZEL, B. S.: Low-iodine diet for the production of severe I deficiency in marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*). *J. Nutr.*, 54, 1985: 367–372.
- MARTINKO, A. – KROKAVEC, M.: Štúdium hodnôt hematologických ukazovateľov u kôz a capov. *Veterinářství*, 43, 1993: 21–22.
- McEWAN, A. D. – FISCHER, E. W. – SELMAN, J. E.: Observations on the immune globulin levels of neonatal and their relationship to disease. *J. Compt. Path.*, 80, 1970: 259–265.
- OLIVER, J. W. – SACHAN, D. S. – SU, P. – APPLEHANS, F. D.: Effects of zinc deficiency on thyroid function. *Drug-Nutr. Interact.*, 5, 1987: 113–124.
- PÉREZ, H. – RUIZ, S. – LEIVA, L. – MUZZO, S.: Influence of intrauterine iodine deficiency on excitability of the rat parietal association cortex. *Nutr. Rep. Int.*, 30, 1984: 265–269.
- RAMAKRISHNA, C. – PRASAD, M. C.: Pathomorphological study of experimental hypothyroidism in goats. *Indian. Vet. J.*, 69, 1992: 111–114.
- RASTOGI, S. K. – AGARWAL, S. P.: Breed differences in serum thyroid hormone levels of cows during oestrous cycle. *Indian. J. Anim. Sci.*, 60, 1990: 1047–1052.
- RHIND, S. M. – BASS, J. – DONEY, J. M. – HUNTER, E. A.: Effect of litter size on the milk production, blood metabolite profiles and endocrine status of ewes lambing in January and April. *Anim. Prod.*, 53, 1991: 71–80.
- SCHÖNE, F. – STEINBACH, G. – KIRCHNER, E. – HENNIG, A. – LÜDKE, H.: Influence of diets with rapeseed meal containing varying amounts of goitrogenic compounds or iodine on performance, immune response and some blood serum parameters in growing pigs. *Acta Veter. (Brno)*, 56, 1987: 281–296.
- SMIT, J. G. G. – Van der HEIDE, D. – Van TINTELEN, G. – BEYNEB, A. C.: Thyroid function in rats with iodine deficiency is not further impaired by concurrent, marginal zinc deficiency. *Brit. J. Nutr.*, 70, 1993: 585–592.
- SWANSON, E. W. – MILLER, J. K. – MUELLER, F. J. – PATTON, C. S. – BACON, J. A. – RAMSEY, N.: Iodine in milk and meat of dairy cows fed different amounts of potassium iodide or ethylenediamine dihydroiodide. *J. Dairy Sci.*, 73, 1990: 398–405.
- THILLY, C. H. – VANDERPAS, J. B. – BEBE, N. – NTAMBUE, K. – CONTEMPRE, B. – SWENNEN, B. – MORENO-REYES, R. – BOURDOUX, P. – DELANGE, F.: Iodine deficiency, other trace elements and goitrogenic factors in the etiopathogeny of iodine deficiency disorders (IDP). *Biol. Trace Elem. Res.*, 32, 1992: 229–243.
- TUŠL, J.: Stanovení jodu v potravinách. *Chem. Listy*, 75, 1981: 1233–1239.
- TUŠL, J.: Kolorimetrické stanovení stop jodu v potravinách na základě katalytické reakce  $\text{NO}_2^-/\text{SCN}^-$ . *Chem. Listy*, 77, 1983: 513–515.
- VRZGULA, L. – JAGOŠ, P. a kol.: Vnútorné choroby prežívavcov a ošipaných. 2. vyd. Bratislava, Príroda 1986. 284 s.
- WOODS, J. W. – WOODWARD, B. D.: Enhancement of primary systemic acquired immunity by exogenous triiodothyronine in wasted, protein-energy malnourished weanling mice. *J. Nutr.*, 121, 1991: 1425–1432.

Došlo 1. 9. 1995

*Kontaktná adresa:*

Doc. MVDr. Jozef B í r e š , DrSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/633 21 11–15, fax 095/76 76 75

# THE EFFECT OF VITAMIN E ON THE QUALITY OF FAT COMPONENT OF BROILER CHICKEN MEAT

## VPLYV VITAMÍNU E NA KVALITU TUKOVEJ ZLOŽKY MÄSA BROJLEROVÝCH KURČIAT

J. Kušev, J. Jantošovič, J. Šály, M. Kozák

*University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** The effect of vitamin E on the quality of meat stored for a short and a long time was investigated in chickens of Hybro hybrid. Vitamin E was added to drinking water from the 42nd to the 49th day of chicken age at a dose 40 mg per bird/day, in form of *Tocopherol acetatum* (Combinal E) within 7 days. The chickens were slaughtered and the carcasses were dressed at the age of 56 days. A kilogram of feed mix contained 186 g crude protein, 12.28 MJ ME and 8 mg of vitamin E. Vitamin E was found to have positive effects on acid number and peroxide value of meat at a short-time storage of broiler meat for 72 hours at 4 °C. When meat was stored in a freezer at a temperature of -20 °C for 6, 8 and 10 weeks, the meat from chickens with vitamin E administration had the acid number of fat lower and the peroxide value highly significantly ( $P < 0.001$ ) lower than control chickens. After ten-week storage the acid number of experimental chickens was 0.888 and the peroxide value amounted to 12.78 while these values of control chickens were 1.034 and 21.55, respectively. There were no significant differences between the experimental and control chickens in sensory evaluation of roasted chickens.

chickens; vitamin E; peroxide value; acid value of fat; sensory evaluation

**ABSTRAKT:** U kurčiat hybridu Hybro sme sledovali vplyv vitamínu E na kvalitu krátkodobu a dlhodobu uskladňovaného mäsa. Vitamín E bol pridávaný do pitnej vody od 42. do 49. dňa veku kurčiat v dávke 40 mg na kus a deň vo forme *Tocopherol acetatum* (Combinal E) po dobu 7 dní. Kurčatá boli odporazené a jatočne opracované vo veku 56 dní. Kilogram kŕmnej zmesi obsahoval 186 g NL, 12,28 MJ ME a 8 mg vitamínu E. Pri krátkodennom uskladňovaní brojlerového mäsa po dobu 72 hodín pri +4 °C mal vitamín E podávaný kurčatám priaznivý vplyv na číslo kyslosti a peroxidové číslo v mäse. Pri mraziarskom skladovaní mäsa pri teplote -20 °C po dobu 6, 8 a 10 týždňov bolo od kurčiat s prídavkom vitamínu E číslo kyslosti tuku nižšie a peroxidové číslo vysoko preukazne ( $P < 0,001$ ) nižšie ako u kontrolných kurčiat. Po 10 týždňoch skladovania bolo u pokusných kurčiat číslo kyslosti 0,888 a peroxidové číslo 12,78 a u kontrolných kurčiat 1,034 a 21,55. Pri senzorickej hodnote pečených kurčiat neboli preukazné rozdiely medzi pokusnými a kontrolnými kurčatami.

kurčatá; vitamín E; peroxidové číslo; číslo kyslosti tuku; senzorickej hodnotenie

### ÚVOD

Pri technologickom spracovaní jatočnej hydiny dochádza k hydrolytickým a oxidačným premenám tukov, čo má za následok zmyslové zmeny (chuť, vôňa) a následne znehodnotenie potraviny (C a b a d a j a T u r e k , 1992), zníženie rozpustnosti bielkoviny, odbúranie pigmentov, vitamínov, narušenie bunecnej integrity a nutričnej hodnoty potravín (F e n n e m a , 1973). Preto štúdiom chemických zmien lipidov vo vzťahu k antioxidantom pri skladovaní hydínového mäsa je stále aktuálnym problémom.

Oxidácia tukov pri technologickom spracovaní jatočnej hydiny sa ovplyvňuje zavádzaním vhodnej technológie (P i s k a r e v a i . , 1976) a pridávaním rôznych antioxidantných látok. Ako antioxidantné látky sa používajú látky prírodného (tokoferoly, lecitín, xantofyly,

gossypol a iné) a syntetického pôvodu (kyselina askorbová, deriváty fenolu, viacmocných fenolov, fenylen-diamínu, chinolínové deriváty atď.). Antioxidačné účinky majú aj niektoré farbivá, ako metylénová modrá, toluidínová modrá, metylénová violet, rosanilín a iné (M o o r e a i . , 1953, 1954; D a m , 1957). Praktická aplikácia antioxidantných aditívnych látok naráža na problémy hygienické, ale aj technologické. Je preto výhodné, keď kŕmna zmes obsahuje prírodne antioxidantné látky v koncentracii postačujúcej pre stabilizáciu tukovej zložky mäsa. Prírodné antioxidantné látky, ktoré sú súčasťou rastlinných buniek, sú tokoferoly.

Vo výžive zvierat antioxidantné látky svojim účinkom znižujú tvorbu peroxidov v tukoch, chránia lipofilné vitamíny, pôsobia synergicky s vitamínom E, majú tiež vplyv na pigmentáciu kože brojlerov, sfarbenie žltka, zlepšujú stabilizáciu xantofylov a zvyšujú konverziu krmiva (N a j m a n a H e r z i g , 1975).

Obsah antioxidantov v hydinovom mäse je najvhodnejšie zabezpečiť v požadovanom množstve ich skrmovaním. Za týmto účelom sme v našej práci sledovali možnosť využitia vitamínu E.

## MATERIÁL A METÓDA

Pokusné a kontrolné kurčatá hybridu Hybro vo veku 42 dní boli kŕmené *ad libitum* kŕmnom zmesou BR2. Kŕmna zmes obsahovala v 1 kg 186 g NL, 12,28 MJ ME, 36 g tukov, 33 g vlákniny, 8 mg vitamínu E, 11,2 g vápnika, 6,5 g anorganického fosforu. Hlavnými komponentami kŕmnej zmesi bola kukurica (55 %), extrahovaný sójový šrot (19 %) a pšenica (15 %). V kontrolnej a pokusnej skupine bolo po 24 kurčiat.

V pokusnej skupine kurčiat bol do pitnej vody prídavaný Combial E (*Tocopherolum aceticum*) v dennej dávke 40 mg/kus po dobu 7 dní od 42. do 49. dňa veku kurčiat. Jedendňová dávka vitamínu E pre celú skupinu kurčiat bola podaná v 2 l vody. Každý deň pred podaním Combialu E bola voda odobraná na jednu hodinu. Po vypití vody s Combialom E kurčatá dostávali pitnú vodu bez Combialu E. Vo veku 56 dní kurčatá boli odporazené a po jatočnom opracovaní boli uložené v chladničke. Po 72 hodinách skladovania pri teplote 4 °C boli ďalej skladované v polyetylénových obaloch

pri teplote -20 °C. Vzorky sme vyšetrovali po 72 hodinách, 6, 8 a 10 týždňoch.

Hydrolytické a oxidačné zmeny tukovej zložky boli stanovené na základe čísla kyslosti a obsahu peroxidov v chloroformovom extrakte podľa postupu Pearsona (1973).

Senzorické hodnotenie pečených kurčiat (A – čerstvé, B – po 10 týždňoch) robila 6-členná komisia, a to parovou skúškou a 5-bodovým systémom hodnotenia akosti (Tilgner, 1961). Matematicko-štatistické vyhodnotenie bolo vykonané podľa Eckschlagera (1971).

## VÝSLEDKY

Závislosť kyslosti tukov od doby uskladnenia mäsa brojlerových kurčiat je uvedená v tab. I. Z dosiahnutých výsledkov pri krátkodobom a dlhodobom uskladnení je zrejme, že číslo kyslosti tuku u pokusných kurčiat bolo nižšie. Štatistická významnosť bola zaznamenaná len po 10-týždňovom uskladnení.

Priemerne hodnoty peroxidového čísla sú uvedené v tab. II. Z prezentovaných výsledkov je zrejme, že peroxidové číslo u pokusnej skupiny, ktorej bol skrmovaný vitamín E v dávke 40 mg/ks a deň, je pozitívne ovplyvnené už 72 hodín po porážke. Napriek tomu, že

I. Priemerné hodnoty kyslosti tukov v priebehu krátkodobého<sup>x</sup> a dlhodobého<sup>xx</sup> skladovania brojlerových kurčiat – Average values of fat acid number during short-time<sup>x</sup> and long-time<sup>xx</sup> storage of broiler chicken meat

Doba skladovania <sup>1</sup>	Skupina kurčiat <sup>2</sup>		Relatívna hodnota oproti kontrole <sup>5</sup> (%)
	pokusná <sup>xxx3</sup>	kontrolná <sup>4</sup>	
72 hodín <sup>6</sup>	0,894	0,937	95,411
6 týždňov <sup>7</sup>	0,708	0,827	85,611
8 týždňov <sup>8</sup>	1,025	1,205	85,062
10 týždňov <sup>9</sup>	0,888 <sup>+</sup>	1,034	85,880

Vysvetlivky pre tab. I a II – Explanatory notes to Tabs. I and II:

x = skladovanie pri teplote +4 °C – storage at a temperature +4°C

xx = skladovanie pri teplote -20 °C – storage at a temperature -20 °C

xxx = pokusná skupina kurčiat jeden týždeň pred porážkou dostávala vitamín E 40 mg/kus a deň po dobu 7 dní – experimental group of chickens a week before slaughter received 40 mg/bird vitamin E for 7 days

+ = P < 0,05

<sup>1</sup>storage time, <sup>2</sup>group of chickens, <sup>3</sup>experimental<sup>xxx</sup>, <sup>4</sup>control, <sup>5</sup>relative value against control, <sup>6</sup>72 hours, <sup>7</sup>6 weeks, <sup>8</sup>8 weeks, <sup>9</sup>10 weeks

II. Priemerné hodnoty peroxidového čísla v priebehu krátkodobého<sup>x</sup> a dlhodobého<sup>xx</sup> skladovania mäsa brojlerových kurčiat – Average peroxide values during short-time<sup>x</sup> and long-time<sup>xx</sup> storage of broiler chicken meat

Doba skladovania <sup>1</sup>	Skupina kurčiat <sup>2</sup>		Relatívna hodnota oproti kontrole <sup>5</sup> (%)
	pokusná <sup>xxx3</sup>	kontrolná <sup>4</sup>	
72 hodín <sup>6</sup>	7,69 <sup>+</sup>	13,96	55,086
6 týždňov <sup>7</sup>	9,85 <sup>+</sup>	18,60	52,957
8 týždňov <sup>8</sup>	10,07 <sup>+</sup>	19,60	65,204
10 týždňov <sup>9</sup>	12,78 <sup>+</sup>	21,55	46,728

+ = P < 0,001

For 1–9 see Tab. I

po 10 týždňoch uskladňovania sme u pokusnej skupiny zaznamenali skoro 80% zvýšenie peroxidového čísla (7,69 z 12,78). Toto číslo bolo vysoko preukazne nižšie ( $P < 0,001$ ) ako u kontrolných kurčiat. Aj po 10 týždňoch uskladňovania bolo peroxidové číslo u pokusných kurčiat nižšie (12,78) ako u kontrolných kurčiat po 72 hodín od porážky (13,96).

Skladovanie mäsa kontrolnej skupiny kurčiat vykazovalo pri každom vyšetrení (po 72 hodinách, 6, 8 a 10 týždňoch) preukazne vyššie peroxidové číslo v porovnaní s pokusnými kurčiatami.

Senzorické vyšetrenie kurčiat je uvedené v tab. III. Ako z tabuľky vyplýva, bodovým hodnotením sme

nenie oproti kontrolnej skupine bolo zachované aj pri dlhodobom uskladnení počas 10 týždňov pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pri 10-týždňovom uskladnení sme zaznamenali taktiež signifikantne významné zmeny v čísle kyslosti tukov.

Výsledky vo vzostupe čísla kyslosti tuku a vzostupe peroxidového čísla sa zhodujú s údajmi autorov Ristic (1975) a Stankovský a Sásik (1979). Uvedení autori zároveň upozorňujú, že peroxidové číslo a číslo kyslosti má byť smerodatným pre vyhodnotenie akosti mäsa. Vitamín E a ďalšie antioxidanty podávané počas života štatisticky významne zvyšujú oxidačnú stabilitu aj počas skladovania mäsa (Lin a i.,

III. Senzorické hodnotenie pečených kurčiat podľa 5-bodovej stupnice s párovým  $t$ -testom – Sensory evaluation of roasted chickens by a 5-score scale with paired  $t$ -test

Ukazovateľ <sup>1</sup>	A				B			
	Kontrola <sup>2</sup>		Pokus <sup>3</sup>		Kontrola <sup>2</sup>		Pokus <sup>3</sup>	
	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$	$\bar{x}$	$s$
Vôňa <sup>4</sup>	3,55	0,51	3,55	0,85	3,41	0,51	3,5	0,52
Chutnosť <sup>5</sup>	3,81	0,7	3,61	0,6	3,76	0,43	3,41	0,51
Štavnatosť <sup>6</sup>	3,83	0,7	3,61	0,77	3,25	0,42	3,08	0,66
Konzistencia – krehkosť <sup>7</sup>	3,61	0,69	3,88	0,67	3,66	0,65	3,55	0,52
Celkový počet bodov <sup>8</sup>	14,82		14,65		14,08		13,49	
Preferencia <sup>9</sup> v. h.	10		8		11		7	
Straty po upečení <sup>10</sup> (%)	30,5	1,58	31,1	1,87	–		–	

A = čerstvé kurčatá – fresh chickens

B = skladované 10 týždňov pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$  – 10-week storage at  $-20^{\circ}\text{C}$

v.h. = pri 18 párových skúškach – at 18 paired tests

<sup>1</sup>indicator, <sup>2</sup>control, <sup>3</sup>experiment, <sup>4</sup>flavor, <sup>5</sup>taste, <sup>6</sup>juiciness, <sup>7</sup>consistency – tenderness, <sup>8</sup>total scores, <sup>9</sup>preference, <sup>10</sup>shrinkage loss after roasting

u pečených kurčiat nezaznamenali štatisticky významné rozdiely. Kvalita bola v oboch skupinách z hľadiska percentuálnych strát, bodového a párového testu pečených kurčiat bez preukáznych rozdielov.

## DISKUSIA

Negatívny vplyv lipidov pri krátkodobom a dlhodobom skladovaní hydiny je známy (Cabadaj a Turek, 1992). U jednotlivých druhov hydiny a zvierat sú známe taktiež rozdiely v kvalite tukov (Mecchia a i., 1956; Keskinel a i., 1964). Frigg a i. (1990, 1991) a Yamauchi a i. (199) lepšiu stabilitu tukov dávajú do súvislosti so zvýšeným obsahom tokoferolov v hydinovom mäse.

Vychádzajúc z uvedených údajov sme sa zamerali na ovplyvnenie kvality mäsa a tukov brojlerových kurčiat formou 7-dňového predporážkového skrmovania zvýšeného obsahu vitamínu E (40 mg kus/deň). Z dosiahnutých výsledkov je zrejme, že vitamín E ovplyvnil najmä peroxidové číslo tukov po skladovaní hydiny pri teplote  $4^{\circ}\text{C}$  po dobu 72 hodín. Toto pozitívne ovplyv-

nenie (Yamauchi a i., 1991). Títo autori skrmovali vitamín E dva týždne pred porážkou v dávke 100, 250, 500 a 1 000 mg/kg krmnej zmesi. V našom experimente sme aplikovali vitamín E do pitnej vody v dávke 40 mg/kus po dobu sedem dní. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že už táto dávka vitamínu E priaznivo ovplyvní oxidáciu tukov pri krátkodobom a dlhodobom skladovaní mäsa brojlerových kurčiat. Avšak, ak chceme udržať hodnotu peroxidového čísla 10–12, doba aplikácie a dávka zdá sa, že nie je dostačujúca.

Pri krátkodobom skladovaní nami sledovaného mäsa brojlerových kurčiat sme nezaznamenali senzorické zmeny. Naše výsledky sa zhodujú s výsledkami autorov Blum a i. (1992), ktorí skrmovali krmnu zmes s obsahom vitamínu E 20, 40, 80 a 160 mg/kg krmnej zmesi od 14. dňa veku až po porážku. Po 6- a 13-mesačnom skladovaní pri teplote  $-18^{\circ}\text{C}$  neboli zistené rozdiely v senzorickej kvalite mäsa (štavnatosť a chuť) brojlerových kurčiat. Naše výsledky ukázali, že skrmovanie vitamínu E vo zvýšenej dávke týždeň pred porážkou hydiny by mala byť akceptovaná u brojlerových kurčiat, ktoré plánujeme dlhobodo mraziarsky uskladňovať.

## LITERATÚRA

- BLUM, J. C. – TOURAILLE, C. – SALICHON, M. R. – RICARD, F. H. – FRIGG, M.: Effect of dietary vitamin E supplies in broilers. 2. Male and female growth rate, viability, immune response, fat content and meat flavour variations during storage. *Arch. Geflügelkde*, 56, 1992: 37–42.
- CABADAJ, R. – TUREK, P.: Hygiena a technologia hydiny a vajec. Košiciach Magnus, 1992. 287.
- DAM, H.: Influence of antioxidants and redox substances on sings of vitamin E deficiency. *Pharmacol. Rev.*, 9, 1957: 1–16.
- ECKSCHLAGER, K.: Chyby chemických rozborů. Praha, SNTL 1971.
- FENNEMA, O. R.: Nature of the freezing process. In: Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter. New York, Marcel Dekker 1973.
- FRIGG, M. – PRABUCKI, A. L. – RUHDEL, E. U.: Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability of trout filets. *Aquaculture*, 84, 1990: 145–158.
- FRIGG, M. – PRABUCKI, A. L. – BANKEN, L. – SCHWEGRE, B. – HAUSER, A. – BLUM, J.: Effect of dietary vitamin E supplies in broilers. 1. Report: Evaluation of parameters related to oxidative stability of broiler meat. *Arch. Geflügelkde*, 55, 1991: 201–207.
- KESKINEL, A. J. – AYRES, J. C. – SNYDER, H. E.: Determination of oxidative changes in raw meats by the 2-thio-barbituric acid method. *Food Technol.*, 18, 1964: 223.
- LIN, C. F. – ASGHAR, A. – GRAY, J. – BUCKLEY, D. – BOOREN, A. et al.: Effect of oxidised dietary oil and antioxidant supplementation on broiler growth and meat stability. *Brit. Poult. Sci.*, 30, 1989: 855–864.
- MECCHI, E. P. – POOL, M. F. – BEHMAN, G. A. – HAMACHI, M. – KLOSE, A. A.: The role of tocopherol content in the comparative stability of chicken and turkey fat. *Poult. Sci.*, 35, 1956: 1238–1246.
- MOORE, T. – SHARMAN, I. M. – WARD, J. R.: The vitamin E activity of substances related to methylene blue. *Biochem. J.*, 54, 1953: 16–17.
- MOORE, T. – SHARMAN, I. M. – WARD, J. R.: The partial vitamin E activity of certain redox dyes. *Biochem. J.*, 55, 1954: 7.
- NAJMAN, L. – HERZIG, I.: Use of some antioxidants in stabilization of inedible fat. *Doc. Veter.*, 8, 1975: 66–70.
- PEARSON, D.: *Laboratory Techniques in Food Analysis*. London, Beterworths 1973.
- PISKAREV, A. L. – DIBIRASULAYEV, M. A. – KOVALEVA, A. P. – KULIKOVSKAYA, L. V.: Influence of storage temperature reduction and of application of additional antioxidants to refrigeration technical means on quality preservation of animal products. *Inter. Inst. of Refrig.*, Melbourne, Australia, 1976.
- RISTIC, M.: Welche Faktoren beeinflussen die Lagerfähigkeit von Schlachtgeflügel. *Dtsch. Geflügelwirtsch.*, 27, 1975: 1115–1116.
- STANKOVSKÝ, I. – SÁSIK, M.: Interpretácia niektorých ukazovateľov hygienickej hodnoty potravín v praxi. *Zbor. ŠVS MPVŽ SSR*, 1979 (5): 125–131.
- TILGNER, L. D.: *Organoleptická analýza potravín*. Praha a Bratislava, SNTL 1961.
- YAMAUCHI, K. – MURATA, H. – OHASHI, T. – KATAYAMA, H. – PEARSON, A. M. – OKADA, T. – YAMAKURA, T.: Effect of dietary alpha-tocopherol supplementation on the molar ratio of subcellular membranes and its relationship to oxidative stability. *Nippon J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.*, 38, 1991: 545–552.

Došlo 6. 9. 1995

---

### Kontakná adresa:

MVDr. Janko Kušev, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/633 21 11–15, fax: 095/76 76 76

---

# ENHANCEMENT OF ANTIBODY RESPONSE TO BOVINE HERPESVIRUS 1 WITH NON-SPECIFIC IMMUNOSTIMULANTS

## ZVYŠOVÁNÍ PROTILÁTKOVÉ ODPOVĚDI PROTI VIRU BHV-1 NESPECIFICKÝMI IMUNOSTIMULAČNÍMI LÁTKAMI

J. Hampl, J. Franz, J. Štěpánek, M. Toman

*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Stimulatory effects of aluminium hydroxide, lipopolysaccharide (LPS), muramyl dipeptide (MDP), and empty liposomes on the antigenicity of inactivated bovine herpesvirus 1 were tested in mice. Compared with the standard effect of aluminium hydroxide, stronger antibody responses were observed in mice treated with empty liposomes or LPS alone, or a combination thereof. The strongest antibody response was recorded in mice treated with a combination of inactivated BHV-1, MDP and empty liposomes.

bovine herpesvirus 1; antibody response; aluminium hydroxide; lipopolysaccharide; muramyl dipeptide; liposomes

**ABSTRAKT:** Imunogenita živého a inaktivovaného viru BHV-1, resp. kombinace s dalšími nespecifickými adjuvantními látkami, a to prázdny liposomy, lipopolysacharidem (LPS), muramyl dipeptidem (MDP) a hydroxidem hlinitým (Aluxid), byla testována na BALB/c myších, které byly rozděleny do osmi patnáctičlenných skupin. Imunizace a reimunizace byly provedeny subkutánně dávkami 0,2 ml suspenze inaktivovaného viru s obsahem 1 µg bílkovin. 21. den pokusu byly myši reimunizovány stejnou dávkou. Z každé skupiny bylo 21., 35. a 49. den usmrceno pět myši a získaná krevní séra byla použita k sérologickému vyšetření metodou ELISA. Bylo zjištěno, že ve srovnání se standardním imunopotenciálním efektem hydroxidu hlinitého byla vyšší protilátková odpověď zaznamenána již po aplikaci inaktivovaného viru BHV-1 a prázdnych liposomů nebo samotného LPS, resp. LPS v kombinaci s prázdny liposomy. Imunizační dávka sestávající z inaktivovaného viru BHV-1, MDP a prázdnych liposomů měla imunizační efekt nejvyšší.

virus BHV-1; protilátková odpověď; hydroxid hlinitý; lipopolysacharid; muramyl dipeptid; liposomy

### INTRODUCTION

The basic tool of immunoprophylaxis of infectious diseases in farm animals is live and inactivated vaccines inducing specific protective immunity. The fact that the immunogenicity of inactivated or subunit antigens is lower than that of live vaccines has motivated the efforts to innovate biologicals of the former type. Their common feature have been attempts to increase the immunogenicity of inactivated antigens, originally with Freund's adjuvant or aluminium hydroxide and recently replaced by new carrier types, such as liposomes (Gregoriadis, 1990), microparticles (Kreuter et al., 1986) or structures of the ISCOM type (Morein et al., 1984), completed with immunostimulants, such as muramyl dipeptide (Ulrich and Fidler, 1992), lipid A (Verma et al., 1992; Alving, 1993), avridine (Fatunmbi et al., 1992) and other substances enhancing the activity of the immune system of animals (Allison and Byards, 1986; Warren and Cheddidi, 1988; Bomford, 1992).

Only vaccines containing inactivated antigens of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) with aluminium hydroxide as the most common adjuvant are currently used for

specific prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) within herd sanitation programmes.

Both the intensity of the antibody response and dynamics and persistence of immunity induced by inactivated vaccines are rather limited. The enhancement of the immunogenicity of inactivated IBR vaccines is still a topical task and has become the subject of our investigations. The aim of our experiments was to define in mice the effects of empty liposomes, lipopolysaccharide and muramyl dipeptide, which are known to stimulate the immune response (Gregoriadis, 1990), on the antigenicity of purified inactivated BHV-1 by comparing them with the effects of aluminium hydroxide.

### MATERIAL AND METHODS

#### Chemicals

The following chemicals were used in our experiments: egg phosphatidyl choline (PC), muramyl dipeptide (MDP), tetramethylbenzidine (TMB, Sigma, St. Louis, USA), cholesterol (C, Flow, High Wycombe,

U.K.), aluminium hydroxide (Aluxid, Bioveta, Nitra, Slovak Republic), and lipopolysaccharide (LPS). The latter was prepared from a culture of *Bordetella bronchiseptica* by phenolic extraction as described by Westphal et al. (1952). Its detailed characteristics are described elsewhere (Tomán et al., 1994).

## Virus

A strain of BHV-1 was propagated in the calf kidney cell line MDBK. The cell cultures were inoculated with a defined dose of BHV-1 (3 to 5 TCID<sub>50</sub> per cell) and were repeatedly frozen-thawed as soon as a marked cytopathic effect developed, i. e. 24 to 36 hours after the inoculation. The cell debris was removed by centrifugation (25 min at 7,000 rpm, rotor JS-7.5, Beckman J2-21M), the suspension was concentrated by ultrafiltration (Amicon) and the virus was purified by velocity ultracentrifugation in a discontinuous potassium tartrate density gradient (30/50% w/v, 2 h at 4 °C and 27,000 rpm, rotor SW 28, Beckman L8-80M) (Trudel et al., 1987). The virus-containing fractions were pooled and centrifuged (90 min at 100,000 x g, rotor Sw 55 Ti, Beckman L8-80M) and the sediment was resuspended in TEN buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, pH 7.4) to obtain 1 per cent of the original volume.

The concentrated virus was inactivated with 0.05% formaldehyde at 4 °C for 3 days and the inactivation was checked by reinfection of cell cultures.

Protein concentration was determined (Bradford, 1976) in the resulting suspension which was subsequently diluted to contain 1 µg protein per 1 dose. Non-inactivated BHV-1 was prepared in the same way and used in immunization experiments as a live virus.

## Liposomes

Multilamellar liposomes were prepared from egg phosphatidyl choline (PC) and cholesterol (C) at the molar ratio 0.5:0.5 using the method of Kirby and Gregoriadis (1984). The mice were immunized with liposomes free of virus protein (empty liposomes). One dose contained 1 mg of the freeze-dried product.

## Immunization

The antigenicity of the live and the inactivated BHV-1 and of the combinations of the latter with non-specific adjuvants including liposomes, LPS, MDP and aluminium hydroxide was tested in BALB/c mice divided into eight groups with fifteen animals in each. Each mouse received subcutaneously 0.2 ml of the inactivated virus suspension containing 1 µg of protein. Reinoculation with the same dose was made on Day 21. Five mice of each group were sacrificed to collect blood samples for serological examinations on Days 21, 35 and 49.

The following inocula were used in the eight groups:

- 1 – live virus (1 µg protein)
- 2 – inactivated virus (1 µg protein)
- 3 – inactivated virus (1 µg protein) + 0.1 ml Aluxid
- 4 – inactivated virus (1 µg protein) + 10 µg LPS (dry matter)
- 5 – inactivated virus (1 µg protein) + 1 mg empty liposomes
- 6 – inactivated virus (1 µg protein) + 1 µg LPS (dry matter) + 1 mg empty liposomes
- 7 – inactivated virus (1 µg protein) + 10 µg LPS (dry matter) + 1 mg empty liposomes
- 8 – inactivated virus (1 µg protein) + 10 µg MDP + 1 mg empty liposomes.

## Titration of antibodies

Titres of antibodies to BHV-1 were determined by indirect ELISA using the complete BHV-1 and a suspension of non-infected MDBK cells, processed in the same way as the positive and the negative control antigens, respectively. Blood sera were assayed in two-fold dilution series within the range 1 : 100 – endpoint. Mean values and standard deviations were calculated for each group from all recorded antibody titres including the negative ones. Porcine antibodies to murine IgG, purified by affinity chromatography and labelled with horse-radish peroxidase (Farr and Nakane, 1991), were used as the conjugate. The reaction was visualized with hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine. Differences between the mean values of Groups 1, 2, and 4 through 8 and that of Group 3 were analysed by the *t*-test.

## RESULTS

The results obtained in Groups 1 through 8 inoculated and reinoculated with live or inactivated BHV-1 alone or inactivated BHV-1 combined with aluminium hydroxide as the conventional adjuvant, or with LPS are shown in Tab. I.

The significantly weakest antibody response was found in all three samplings of the mice immunized with inactivated virus alone (Group 2), in which no marked rise in antibody titres was observed even after reimmunization. A marked rise in antibody titres after reimmunization recorded in the mice treated with live virus (Group 1) was followed by an apparent decrease on Day 49. However, the differences were insignificant when compared with Group 3.

A gradual increase in antibody titres up to Day 49 was demonstrated in the mice treated with inactivated BHV-1 combined with aluminium hydroxide (Group 3) or LPS (Group 4). The strongest antibody responses were observed in the latter group. Compared with Group 3, the differences were significant in the samples collected on Days 21 and 35.

Empty liposomes or their combinations with LPS or MDP were used as components of inocula in Groups 5

Group	Treatment	Antibody titres on days		
		21	35	49
1	live virus	240 ± 285	11 040 ± 8 769	640 ± 480
2	inactivated virus	20 ± 24*	260 ± 120*	190 ± 120*
3	inactivated virus + Al(OH) <sub>3</sub>	60 ± 20#	880 ± 391#	3 040 ± 1 920#
4	inactivated virus + 10 µg LPS	180 ± 40**	7 040 ± 3 135*	10 880 ± 7 993
5	inactivated virus + liposomes	100 ± 63	3 520 ± 1 567*	640 ± 196*
6	inactivated virus + liposomes + 1 µg LPS	20 ± 40	5 120 ± 1 567**	2 400 ± 2 023
7	inactivated virus + liposomes + 10 µg LPS	520 ± 240*	12 800 ± 7 010*	8 320 ± 3 840*
8	inactivated virus + liposomes + 10 µg MDP	640 ± 195**	17 920 ± 8 960*	8 960 ± 3 135**

## Legends:

Each group consisted of 15 mice

\* =  $P \leq 0.05$ \*\* =  $P \leq 0.01$ 

# = reference values for tests of significance

through 8. It is evident from the results that even empty liposomes enhanced significantly the formation of antibodies, although the effect was only short (Group 5). LPS increased significantly the antibody response reaching its maximum on Day 35. The strongest responses and similar dynamics of antibody titres were recorded in Group 8, in which LPS was replaced by MDP.

## DISCUSSION

Effective inactivated vaccines and continuous serological monitoring are the essential prerequisites of success in programmes aimed at stepwise sanitation of cattle herds and elimination of IBR. The immunization should induce a solid and permanent protective immunity in the vaccinates and thus prevent the circulation of the causative agent in animal populations. Therefore, studies aimed at the enhancement of immunogenicity of inactivated BHV-1 antigens are of considerable importance for the current epidemiological practice.

Significant enhancing effects of incorporation of BHV-1 proteins in ISCOMs or liposomes on their immunogenicity were published earlier (Hampel et al., 1992; Franz et al., 1992). However, the prospects of commercial manufacture of such biologicals are limited owing to the rather sophisticated procedure for isolation of viral proteins to be incorporated.

Our investigations into the stimulation of antibody responses concentrated on the effects of empty liposomes, MDP and LPS isolated from *Bordetella bronchiseptica*. LPS and MDP are immunostimulants with pronounced adjuvant activities (Gregoriadis, 1990). Both activate macrophages and stimulate the production of interleukin 1 triggering the whole chain of regulatory events. LPS, containing lipid A as the immunologically active component, is also known for its mitogenic effects on B lymphocytes. Several immunostimulant activities were demonstrated in MDP

(Maeda et al., 1989; Gregoriadis and Panagiotidi, 1989). Relevant to its use as an adjuvant is its enhancing effect on cell-mediated immunity. The use of empty liposomes as immunostimulants is not common (de Haan et al., 1995a, b), but was motivated by the known fact that macrophages are activated by the uptake of liposomes.

Therefore the adjuvant activities of LPS and MDP in combinations with empty liposomes and possible cumulative effects were investigated in our experiments. Mice were chosen as experimental animals to test the effects in the simplest possible way although this species is not a natural host of BHV-1. ELISA, as a method with a sufficient specificity and sensitivity, was used for the evaluation of the level and dynamics of antibody titres. ELISA is used currently within IBR herd control programmes and its results correlate well with those of neutralization test (Suribaru et al., 1984; Cho and Bohac, 1985; Pechman et al., 1995).

Mean titres obtained in Group 3, treated with the vaccine containing aluminium hydroxide gel as the conventional adjuvant, were taken as reference values and differences found in the remaining groups were tested for significance. Our results have confirmed the finding of Naylor et al. (1982) that the administration of virus protein alone induces only a weak antibody response. A considerably stronger immunostimulatory effect, evident from an increase of antibody titres in blood sera collected after the first immunization and their persistence, was observed after the administration of the vaccine containing LPS.

Simple procedures of preparing multilamellar liposomes, their prolonged storability in dehydrated state led us to tests of a vaccine prepared from inactivated virus and empty liposomes. Although the mean peak value of antibody titre induced by such a vaccine was significantly higher, the persistence of antibodies in blood serum was shorter than after the treatment with the vaccine containing aluminium hydroxide. Significantly stronger immunostimulatory effects were ob-

served in both the primary and the secondary responses to treatments with vaccines containing liposomes and LPS or MDP. The highest antibody titres and longest persistence in blood sera were recorded in Group 8 treated with the vaccine containing inactivated virus, empty liposomes and MDP. Similar results were reported, among others, by Tsujimoto et al. (1989) and Nerome et al., (1990), who used derivatives of MDP and antigens of hepatitis B viruses and influenza virus, respectively. No data on such potentiating of antigenicity of BHV-1 were found in available literature.

Some of the differences found in our investigations were insignificant owing to a high standard deviation of antibody titres resulting from a considerable variation of immune responses in individual mice, evident particularly in Groups 2 and 6, in which antibody responses were demonstrable in 2 and 1 animals, respectively, on post-immunization Day 21. Another example thereof are blood sera collected in Group 4 on Day 49.

The enhancement of antigenicity of inactivated BHV-1 by the combinations of preformed liposomes with LPS or MDP, demonstrated in our experiments, allows us to expect that such supplementation could increase the potency of the existing biologicals. If the results presented here are confirmed by long-term experiments in larger animals and natural hosts of BHV-1, such vaccines could replace the vaccines with added oil adjuvants that are not currently approved for use in the Czech Republic owing to frequent adverse reactions.

## REFERENCES

- ALLISON, A. C. – BYARS, N. E.: An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *J. Immunol. Meth.*, **95**, 1986: 157–168.
- ALVING, C. R.: Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology*, **187**, 1993: 430–446.
- BOMFORD, R.: Adjuvants for viral vaccines. *Med. Virol.*, **2**, 1992: 169–174.
- BRADFORD, M. M.: A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 1976: 248–254.
- CHO, H. J. – BOHAC, J. C.: Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bovine rhinotracheitis viral antibody in cattle. *Can. J. Comp. Med.*, **49**, 1985: 189–194.
- FATUNMBI, O. O. – NEWMAN, J. A. – SIVANANDAN, V. – HALVORSON, D. A.: Enhancement of antibody response of turkeys to trivalent avian influenza vaccine by positively charged liposomal avridine adjuvant. *Vaccine*, **10**, 1992: 623–626.
- FARR, A. G. – NAKANE, P. K.: Immunohistochemistry with enzyme-labelled antibodies: a brief review. *J. Immunol. Meth.*, **47**, 1981: 129–144.
- FRANZ, J. – HAMPL, J. – ŠTĚPÁNEK, J. – ŠMÍD, B.: Preparation of immunostimulating complexes (ISCOM) containing bovine herpesvirus 1 proteins. *Acta Vet. (Brno)*, **67**, 1992: 37–41.
- GREGORIADIS, G.: Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol. Today*, **11**, 1990: 89–97.
- GREGORIADIS, G. – PANAGIOTIDI, CH.: Immunoadjuvant action of liposomes: comparison with other adjuvants. *Immunol. Lett.*, **20**, 1989: 237–240.
- HAAN de, A. – GEERLIGS, H. J. – HUCHSHORN, J. P. – SCHARRENBURG van, G. J. M. – PALACHE, A. M. – WILSCHUT, J.: Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. *Vaccine*, **13**, 1995a: 155–162.
- HAAN de, A. – RENEGAR, K. B. – SMALL, P. A. – WILSCHUT, J.: Induction of a secretory IgA response in the murine female urogenital tract by immunization of the lungs with liposome-supplemented viral subunit antigen. *Vaccine*, **13**, 1995b: 613–616.
- HAMPL, J. – ŠTĚPÁNEK, J. – FRANZ, J. – SVOBODA, I.: Incorporation of bovine herpesvirus 1 protein subunits into large unilamellar and multilamellar liposomes. *Acta Vet. Brno*, **67**, 1992: 29–36.
- KIRBY, CH. – GREGORIADIS, G.: Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*, **11**, 1984: 979–984.
- KREUTER, J. – BERG, U. – LIEHL, E. – SOLIVA, M. – SPEISER, P. P.: Influence of the particle size on the adjuvant effect of particulate polymeric adjuvants. *Vaccine*, **4**, 1986: 125–129.
- MAEDA, H. – SAIKI, I. – ISHIDA, H. – KISO, M. – HASEGAWA, A. – AZUMA, I.: Adjuvant activities of synthetic lipid A subunit analogues and its conjugates with muramyl dipeptide derivatives. *Vaccine*, **7**, 1989: 275–281.
- MOREIN, B. – SUNDQUIST, B. – HÖGLUND, S. – DALSGAD, K. – OSTERHAUS, A.: ISCOM, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, **308**, 1984: 457–460.
- NAYLOR, P. T. – LARSEN, H. S. – HUANG, L. – ROUSE, B. T.: *In vivo* induction of anti-herpes simplex virus immune response by type 1 antigens and lipid A incorporated into liposomes. *Infect. Immun.*, **36**, 1982: 1209–1216.
- NEROME, K. – YOSHIOKA, Y. – ISHIDA, M. et al.: Development of a new type of influenza subunit vaccine made by muramyl dipeptide-liposome: enhancement of humoral and cellular immune responses. *Vaccine*, **8**, 1990: 503–509.
- PECHMAN, V. – FRANZ, J. – ŠTĚPÁNEK, J.: Evaluation of IBR Ab ELISA immunodiagnostic kit. Project report. Test-Line Clinical Diagnostics, Brno 1995. 16 p.
- SURIBABU, T. – MALLICK, B. B. – SHINERAN, C.: Detection of bovine herpes virus 1 (BHV-1) and infectious bovine rhinotracheitis (IBRV) antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from field cases. *Indian J. Anim. Sci.*, **54**, 1984: 261–262.
- TOMAN, M. – TURÁNEK, J. – HOŘAVOVÁ, P.: Nonspecific stimulation of resistance of mice to infection by lipopo-

lysacharide of *Bordetella bronchiseptica* incorporated into liposomes. *Acta Vet. (Brno)*, 63, 1994.

TRUDEL, M. – BOULAY, G. – SEGUIN, C. – NADON, F. – LUSSIER, G.: Vaccination of rabbits with bovine herpesvirus type 1 subunit vaccine: adjuvant effect of ISCOMs. *Vaccine*, 5, 1987: 239–243.

TSUJIMOTO, M. – KOTANI, S. – OKUNAGA, T. et al.: Enhancement of humoral immune responses against viral vaccines by a non-pyrogenic 6-0-acyl muramyl dipeptide and synthetic low toxicity analogues of lipid A. *Vaccine*, 7, 1989: 39–48.

ULLRICH, S. E. – FIDLER, I. J.: Liposomes containing muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (MTP-PE) are excellent adjuvants for induction of an immune response to

protein and tumor antigens. *J. Leukocyte Biol.*, 52, 1992: 489–494.

VERMA, J. N. – RAO, M. – AMSELEM, S. – KRZYCH, U. – ALVING, C. R. – GREEN, S. J. – WASSEF, N. M.: Adjuvant effects of liposomes containing lipid A: enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages. *Infect. Immun.*, 60, 1992: 2438–2444.

WARREN, H. S. – CHEDID, L. A.: Future prospects for vaccine adjuvants. *CRC Critical Rev. Immunol.*, 8, 1988: 83–101.

WESTPHAL, O. – LUDERITZ, O. – BISTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch.*, 78, 1952: 148–155.

Arrived on 21st April 1995

---

*Contact Address:*

RNDr. Jaroslav Hampl, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29

---

Oznamujeme čtenářům a autorům našeho časopisu,

že v návaznosti na časopis *Scientia agriculturae bohemoslovaca*, který až do roku 1992 vycházel v Ústavu vědeckotechnických informací Praha, vydává od roku 1994

Česká zemědělská univerzita v Praze

časopis

## **SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMICA**

Časopis si zachovává původní koncepci reprezentace naší vědy (zemědělství, lesnictví, potravinářství) v zahraničí a jeho obsahem jsou původní vědecké práce uveřejňované v angličtině s rozšířenými souhrny v češtině.

Časopis je otevřen nejširší vědecké veřejnosti a redakční rada nabízí možnost publikace pracovníkům vysokých škol, výzkumných ústavů a dalších institucí vědecké základny.

Příspěvky do časopisu (v angličtině, popř. v češtině či slovenštině) posílejte na adresu:

**Česká zemědělská univerzita v Praze  
Redakce časopisu *Scientia agriculturae bohemica*  
165 21 Praha 6-Suchdol**

# SURVIVAL OF MODEL BACTERIAL STRAINS AND HELMINTH EGGS IN THE COURSE OF MESOPHILIC ANAEROBIC DIGESTION OF PIG SLURRY

## PREŽÍVANIE MODELOVÝCH BAKTERIÁLNYCH KMEŇOV A VAJÍČOK HELMINTOV V PRIEBEHU ANAERÓBNEJ STABILIZÁCIE TEKUTÝCH EXKREMENTOV OŠÍPANÝCH

P. Juriš<sup>1</sup>, F. Tóth<sup>2</sup>, A. Lauková<sup>3</sup>, P. Plachý<sup>1</sup>, P. Dubinský<sup>1</sup>, J. Sokol<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Parasitological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic*

<sup>2</sup>*Institute of Experimental Veterinary Medicine, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*

<sup>3</sup>*Institute of Physiology of Farm Animals, Košice, Slovak Republic*

<sup>4</sup>*State Veterinary Administration of the Slovak Republic, Košice*

**ABSTRACT:** The effect of methanogenesis on the survival of model bacterial strains (*Escherichia coli* EC 5, *Staphylococcus aureus* SA 11, *Enterococcus faecium* CCM 4231) and non-embryonated helminth eggs (*Ascaris suum*) was investigated in pig slurry. Two pilot-plant experiments were carried out in two anaerobic digesters (800 and 1 000 litre) in a mesophilic thermal range (35–37 °C). The mean hydraulic retention time of the digesters was 20 days. The methanogenesis process was monitored by determining the following chemical parameters: pH, N-NH<sub>3</sub>, total dry matter (kg/day), organic matter (kg/day) production of methane by supplied and degraded organic matter (m<sup>3</sup>/kg). The results obtained allow us to state that the anaerobic stabilization of pig slurry in the mesophilic temperature range resulted in total devitalization of model bacterial strains *E. coli* EC 5 and *Ent. faecium* CCM 4231. *St. aureus* SA 11 cells, exposed to the above mentioned conditions, were also reduced in their number from 10.04 to 3.27 and from 8.69 to 2.77 log cfu/ml. It is assumed that the longer retention time of excrements in the digester could also result in total devitalization of *St. aureus* SA 11 cells. From the microbiological point of view, the above mentioned facts indicate a sufficient hygienization effect of the anaerobic fermentation on the contaminated pig excrements. The survival of *A. suum* eggs was little affected by the 20-day anaerobic mesophilic digestion of pig slurry. Only 17 or 18% (F1, F2) of the non-embryonated *A. suum* eggs were damaged after the 20-day exposure.

pig slurry; anaerobic mesophilic digestion; survival; *Escherichia coli* EC 5; *Staphylococcus aureus* SA 11; *Enterococcus faecium* CCM 4231; non-embryonated *Ascaris suum* eggs

**ABSTRAKT:** V poloprevádzkových experimentoch v dvoch anaeróbných fermentoroch (800 a 1 000 l), ktorých pracovný režim prebiehal v mezofilnom teplotnom pásme (35–37 °C) sa sledoval vplyv metanogenézy tekutých exkrementov ošipaných na vitalitu modelových mikrobiálnych zárodokov (*Escherichia coli* EC 5, *Staphylococcus aureus* SA 11, *Enterococcus faecium* CCM 4231) a neembryonovaných vajíčok *Ascaris suum*. Doba zdržania tekutých exkrementov ošipaných bola u oboch fermentorov 20-dňová. Sledovaním vybraných chemických parametrov: pH, N-NH<sub>3</sub>, celkovej sušiny (kg/deň), organických látok (kg/deň), produkcie metánu na privedené organické látky (m<sup>3</sup>/kg), bol monitorovaný priebeh anaeróbnej stabilizácie. Na základe výsledkov možno konštatovať, že vplyvom anaeróbnej stabilizácie tekutých exkrementov ošipaných v mezofilnej teplotnej oblasti došlo k totálnej devitalizácii modelových bakteriálnych kmeňov *E. coli* EC 5 a *Ent. faecium* CCM 4231. Počty *St. aureus* SA 11 sa po tejto expozícii redukovali z 10,04 na hodnotu 3,27 (F1) a z 8,69 na hodnotu 2,77 log cfu/ml (F2). Je predpoklad, že predĺžením doby zdržania exkrementov vo fermentore by došlo aj u kmeňa *St. aureus* k totálnej devitalizácii. Z vyššie uvedeného vyplýva, že anaeróbná stabilizácia má z aspektu mikrobiologického dostačujúci hygienizačný efekt na kontaminované exkrementy ošipaných. Vitalita vajíčok *A. suum* v priebehu 20-dňovej anaeróbnej stabilizácie tekutých exkrementov ošipaných nebola preukázane ovplyvnená. Po 20-dňovej expozícii bolo devitalizovaných len 17 resp. 18 % (F1, F2) neembryonovaných vajíčok *A. suum*.

tekuté exkrementy ošipaných; anaeróbná stabilizácia; prežívanie; *Escherichia coli* EC 5; *Staphylococcus aureus* SA 11; *Enterococcus faecium* CCM 4231; neembryonované vajíčka *Ascaris suum*

## INTRODUCTION

The increase in farm animal stocks results in the production of excessive amounts of organic manure in the form of slurry, dung, and dung water in some areas which, considering the environmental protection regulations, cannot be applied to the soil. Litterless technologies of rearing, mainly on large-scale farms for pigs, poultry and cattle, cause considerable accumulation of excrements of farm animals in the form of slurry which, contrary to completely recyclable dung, may have considerable effects on the living environment. The untreated and difficult to store slurry from litterless houses for farm animals contributes with its odour, risk of seepage into ground water, and contamination of surface water to the evident decrease of the quality of the environment (Strauch, 1991; Venglovský et al., 1994; Borsó, 1994). Moreover, it can serve as a medium of spreading of numerous pathogens.

One of the possible approaches of solving these problems consists in the utilization of various methods of the treatment of slurry. The purpose of this treatment of slurry is the improvement of its properties and handleability at simultaneous preservation of its manuring value. The objective of the treatment methods is to treat the liquid component of the excrements, obtained after separation, to such a degree that it can be applied to the soil or discharged into water courses. During the treatment the dissolved organic substances undergo oxidation and change to biomass which has to be removed from the treatment process. The difficult to decompose portion of the excrements consists of fibres composed of cellulose, hemicellulose and lignin (Zapletal, 1988). The dry matter content, which is usually in the range of 4.5–7.0% in dung water and higher than 9.5% in liquid manure, is important in view of the subsequent treatment. The content of organic matter in this medium is a multiple of the common concentration of organic contaminants in sewage. The properties of slurry also depend on the animal species that produce the slurry in question.

The anaerobic stabilization is a process during which, under the action of microorganisms, the organic substances are decomposed at the development of biogas. The aerobic and anaerobic processes differ not only in the organisms which induce and carry out the reactions but also in the products which are obtained in these processes. The final products of aerobic stabilization are  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{NO}_3^-$ . One of the disadvantages of anaerobic stabilization is the relatively high concentration of organic substances in the effluent and lower effectiveness of the treatment in comparison with the aerobic process (Dohányoš and Záborská, 1991; Ondrašovičová et al., 1994; Ondrašovič et al., 1994).

The aim of this study was to determine the effect of methanogenesis in pilot-scale experiment in the mesophilic thermal range on long-term survival of selected model bacterial strains and helminth eggs.

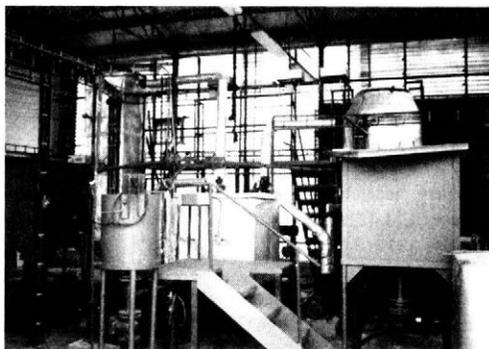
## MATERIAL AND METHODS

Liquid manure (fugate) from a large-capacity farm, not subjected to any previous treatment, was used in anaerobic stabilization experiments (methanogenesis). The process took place in two pilot-plant anaerobic digesters (F1: with a bed – 800 l, F2: without a bed – 1 000 l, Institute of Experimental Veterinary Medicine, Ivanka pri Dunaji, Slovakia, Fig. 1) operating in a mesophilic thermal range (35–37 °C). Stabilized sludge from a sewage treatment plant, pretreated anaerobically, was injected into the digester.

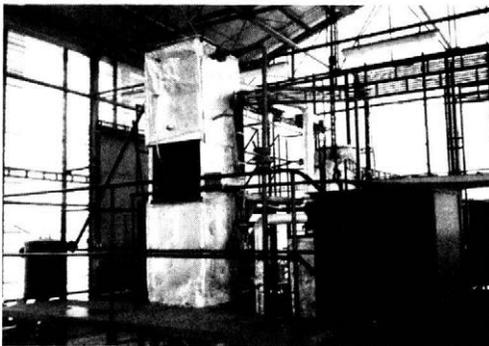
A gas meter PL (Východočeské plynárny k. p. Skuteč, Czech Republic) was used to measure the volume of the produced gas.

Dry matter, organic substances, total nitrogen, lower fatty acids and ammonia were determined according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1980). The pH value was measured using a digital pH meter mfd by Radelkis equipped with a glass electrode. To detect the microbial survival, the following model strains were used: *Escherichia coli* EC 5, *Staphylococcus aureus* SA 11, and *Enterococcus faecium* CCM 4231 (Institute of Animal Physiology SAS, Košice, Slovakia). The selection of model bacte-

F1



F2



1. Two pilot-plant anaerobic digesters (F1: with a bed – 800 l, F2: without a bed – 1 000 l, Institute of Experimental Veterinary Medicine, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic)

I. The survival of model strains *Ent. faecium* CCM 4231, *E. coli* EC 5 and *St. aureus* SA 11 during anaerobic mesophilic digestion of pig slurry in the fermentor of 800 l volume (log cfu/ml)

Exposure (Day)	<i>Escherichia coli</i> EC 5	Control	<i>St. aureus</i> SA 11	Control	<i>Ent. faecium</i> CCM 4231	Control
1	7.30	6.76	10.04	8.15	9.51	6.73
6	6.12	5.97	9.11	8.13	7.06	6.66
11	2.65	4.30	7.76	7.09	4.51	3.53
17	1.02	3.02	5.79	5.34	2.11	1.07
18	0	2.02	5.61	5.06	0	0
20	0	0	3.27	2.97	0	0

rial species used in the experiments was based on the knowledge that these bacterial strains are natural components of animal excrements (Khalaf and Muhlammad, 1989). The pig slurry was inoculated with 1 liter of a 24 hr culture of individual model strains ( $10^{10}$  cfu/ml) cultivated in Nutrient Broth No. 2 as well as in Todd-Hewith Broth (Imuna, Šarišské Michaľany, Slovakia).

The total number and survival of the model bacterial strains were observed during the entire experiment in 1–3 day intervals. Samples were diluted in a saline solution (ratio 1 : 9). Individual dilutions (100 µl) were spread on appropriate selective media.

The total number of *E. coli* EC 5 strains was determined on MacConkey agar (Imuna). *St. aureus* SA 11 strain was grown on Mannitol Salt Agar (oxid). Selective medium for faecal streptococci (Imuna) with an addition of 20 g of pure agar, 60 g of sodium chloride and 10% of defibrinated sheep blood per 1000 ml was used for determination of *Ent. faecium* CCM 4231 strain.

Non-stabilized excrements inoculated with the same model bacterial strains and stored at laboratory temperature were used as control samples.

Model, non-embryonated eggs of *Ascaris suum*, obtained by dissection of the distal uterine end of adult female *A. suum* were used in the experiments. The viability of *A. suum* eggs was determined by their cultivation at 26 °C for 21 days until embryonation.

Non-stabilized excrements inoculated with non-embryonated *A. suum* eggs and stored at laboratory temperature were used as control samples.

## RESULTS

The anaerobic stabilization process was monitored by determining the following chemical parameters: pH, N-NH<sub>3</sub>, total dry matter (kg/day), organic substances (kg/day) production of methane by supplied and degraded organic matter (m<sup>3</sup>/kg).

Results of the testing of the effect of anaerobic stabilization on model microbial strains are summarized in Tabs. I and II. The total growth inhibition of *E. coli* EC 5 and *Ent. faecium* CCM 4231 strains was recorded on days 18 and 20 of the anaerobic mesophilic stabiliza-

tion. *St. aureus* SA 11 strain was not eliminated completely at the end of experiment (20th day), although the growth of this strain was suppressed during the stabilization process in both digestors (Tabs. I and II). Therefore the total number of SA 11 strains decreased from the initial 10.04 to 3.27 or 8.69 to 2.77 (log cfu/ml).

The most pronounced devitalization effect of the process of anaerobic stabilization was observed in the strain EC 5. As soon as on day 9 of the stabilization in the fermentor No. 1 marked inhibition of its growth was detected in comparison with the non-stabilized control sample (from 3.86 to 4.49 log cfu/ml).

The results obtained suggest that the prolongation excrement retention in an anaerobic digester could achieve complete devitalization of *St. aureus* SA 11 cells. Regarding the results, it was revealed that Gram-negative, aerobic or facultatively anaerobic bacteria are more susceptible to this technological process than the facultatively anaerobic, Gram-positive species.

The proportion of viable and damaged eggs of *Ascaris suum* expressed in per cent, observed in the course of anaerobic digestion of pig slurry, is illustrated in Tab. III. The 20 day period of action of the fermentation process in a stable temperature range 35–37 °C resulted in devitalization of only 17 or 18% (F1, F2) of the *Ascaris suum* non-embryonated eggs present in the slurry.

## DISCUSSION

Mesophilic temperature range of 35–37 °C is favourable for the growth of facultatively anaerobic microorganisms, which include all tested strains *E. coli*, *St. aureus* and *Ent. faecium*. The principal factor for the further survival of these strains is their transfer into anaerobic conditions during methanogenesis. Their survival is determined primarily by the presence of certain substances in culture medium. Thus e.g., *St. aureus* inevitably requires uracil for its anaerobic growth, some other strains require in addition biotin and pantothenic acid. The same situation is with the other strains tested. The supposition is that the disappearance of these substances from culture medium entails the destruction of pathogens. The effect of mesophilic tem-

II. The survival of model strains *Ent. faecium* CCM 4231, *E. coli* EC 5 and *St. aureus* SA 11 during anaerobic mesophilic digestion of pig slurry in the fermentor of 1 000 l volume (log cfu/ml)

Exposure (Day)	<i>Escherichia coli</i> EC 5	Control	<i>St. aureus</i> SA 11	Control	<i>Ent. faecium</i> CCM 4231	Control
1	6.78	5.90	8.69	8.63	8.19	8.69
6	5.77	5.30	8.60	8.16	5.18	8.0
11	2.30	3.0	8.0	8.0	3.10	7.03
17	1.02	1.60	7.07	7.14	2.14	4.77
18	0	1.60	5.47	4.45	1.10	4.49
20	0	0	2.77	4.15	0	2.77

III. Survival of non-embryonated *Ascaris suum* eggs in the course of anaerobic mesophilic digestion of pig slurry

Exposure (Day)	F1, volume 800 l			F2, volume 1 000 l		
	viable	damaged	% (n = 2)	viable	damaged	% (n = 2)
1	90.0	90.0	10.0	95.5	4.5	4.5
6	91.5	8.5	8.5	94.0	6.0	6.0
11	87.5	12.5	12.5	92.0	8.0	8.0
17	84.5	15.5	15.5	91.5	8.5	8.5
18	83.5	16.5	16.5	84.5	15.5	15.5
20	82.0	18.0	18.0	83.0	17.0	17.0
Controls	92.5	7.5	7.5	95.0	5.0	5.0

perature on the survival of microorganisms is therefore not decisive. This is supported also by control results in strain *E. coli* EC 5, with the increase from 3.8 to 4.49 log cfu/ml. Mesophilic temperatures are favourable both for the activity of methanogenous microorganisms and for the survival of pathogens during methanogenesis. The time of survival of facultatively anaerobic microorganisms is, however, determined by the presence of vital nutrients. It is then more understandable that thermophilic temperature range at 48 °C (Carrington, 1992) even more shortens the time for destruction of *Salmonella* strains to 1.4 days, compared to 1.6 days at 35 °C at mesophilic range.

Olsen et al. (1985) observed that *Mycobacterium tuberculosis* survived for 21 days in cattle slurry subjected to anaerobic stabilization, their initial number being  $3.3 \cdot 10^3$ – $2.7 \cdot 10^4$ . The prolongation of the retention time to 28 days resulted in their total disinfection. Eggs of helminths also exhibit high tenacity in the environment. The time of survival of some bacteria (*Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *St. aureus*) at anaerobic storage of slurry was observed by Larsen and Munch (1983).

The bacteria investigated were disinfected within several hours under thermophilic conditions, within several days under mesophilic conditions and after several weeks in the low temperature range. This implies that from the practical point of view the anaerobic stabilization, which occurs in the mesophilic temperature range, has no marked lethal effect on helminth eggs.

In addition, Kearney et al. (1993) observed the survival of some bacteria (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter jejuni*) in the course of anaerobic mesophilic stabilization in a digester of volume 210 m<sup>3</sup> at the mean hydraulic retention time 24 days. Of all germs observed in the environment of the digester the least resistant was *Yersinia enterocolitica* with the decimation time T<sub>90</sub> equal to 18.2 days, more resistant was *E. coli* with T<sub>90</sub> 76.9 days, and the most resistant was *Campylobacter jejuni* with T<sub>90</sub> 438.6 days.

Black (1982) stated that the vitality of eggs of the genus *Ascaris* was preserved in the course of anaerobic stabilization at the temperature 35 °C. Only 23% eggs were devitalized. The data of the author mentioned above correspond to our results which were obtained in the pilot plant experiment. After a 20-day exposure (at 35–37 °C) in an anaerobic digester only 18% non-embryonated *A. suum* eggs were devitalized.

Animal excrements are considered to be lifeless vectors of the transfer of agents of various diseases. They contain a wide range of microorganisms. It was determined that approximately 10<sup>10</sup> microorganisms are found in 1 g of slurry dry matter and out of that 3–4% are pathogenic or potential pathogenic microorganisms. The floor of an animal house becomes in this way the pool of all infectious agents which occur in the confined house and on animals. For this reason, in the case of all the infections which arise in the livestock, manure and slurry should be considered as infected. Be-

sides these infections which must be reported, a whole range of other infectious diseases, which commonly occur in farm animals, enters the manure and slurry via animal excrements. In view of protection of the environment from dangerous infections one must keep in mind that it is necessary to determine experimentally the optimum exposure time (retention time of the excrements in the digester) needed for anaerobic stabilization of liquid excrements of farm animals which occurs in various temperature zones. This exposure time must ensure a reliable hygienization effect. It is a well known fact that the temperature level of the stabilization process affects directly the disinfection of pathogenic germs.

## REFERENCES

- BLACK, I. M.: Survival rates of parasite eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1982: 1138–1143.
- BORSO, F. – CHIUMENTI, R. – CAPELLI, S. – DE PREZ, DONANTONI, L. – NARDELLI, S. – FARINA, L.: Pig waste management and environmental health – a case studied in Northern Italy. Study from Dipartimento di Produzione Vegetale Tecnologie Agrarie, Università di Udine, Italy, 1994: 1–11.
- CARRINGTON, E. G.: Inactivation of *Salmonella* sp. during anaerobic digestion of sewage sludge. *J. Appl. Biotech.*, 1982: 331–334.
- DOHÁNYOS, M. – ZÁBRANSKÁ, J.: Intensification and stimulation of the anaerobic stabilization of sludge. *Scientific Papers of Prague Inst. of Chem. Tech.*, **F28**, 1991: 159–167.
- KEARNEY, T. E. – LARKIN, M. J. – FROST, J. P. – LEVETT, P. N.: Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J. Appl. Bact.*, 1993: 215–219.
- KHALAF, S. H. – MUHAMMAD, A. M.: Studies on faecal streptococci in the river Tigris. *Microbios*, **57**, 1989: 99–103.
- LARSEN, H. E. – MUNCH, B.: Practical application of knowledge on the survival of pathogenic and indicator bacteria in aerated and non-aerated slurry. In: Proc. of a Joint Workshop of Expert Groups of the CEC DVG and FAO. Stuttgart, 1983: 20–31.
- OLSEN, J. E. – JORGENSEN, J. B. – NANSEN, P.: On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion. *Agricult. Wast.*, **13**, 1985: 273–280.
- ONDRAŠOVIČ, M. – PARA, L. – VARGOVÁ, M.: Changes of some chemical and microbiological parameters of slurry storage and after addition of chemical disinfectants. *Živoč. Vyr.*, **39**, 1994: 365–374.
- ONDRAŠOVIČOVÁ, O. – ONDRAŠOVIČ, M. – PARA, L. – VARGOVÁ, M. – BODNÁR, P.: Chemical and microbiological examination of rendering plant wastewaters. In: Proc. 8th Int. Cong. Anim. Hyg. September 12–16, 1994, St. Paul, Minnesota, USA, 1994: 104–107.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: American Public Health Association, Washington, 1980.
- STRAUCH, D.: Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **10**, 1991: 813–846.
- VENGLOVSKÝ, J. – JURÍŠ, P. – VARGOVÁ, M.: Hygienic aspects of pig feedlot waste management. In: Proc. Sem., Stuttgart-Hohenheim, 1990: 38–48.
- ZAPLETAL, Z.: Technology of biogas preparation. *Processing of Hydroprojekt*, Prague, 1988.

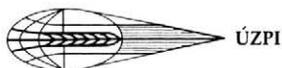
Arrived on 6th September 1995

---

### Contact Address:

MVDr. Peter Juríš, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/633 14 11–13, fax 095/633 14 14

---



ÚZPI

## ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

(Slezská 7, 120 56 Praha 2, fax: 02/25 70 90)

vydává v roce 1996 v edici **STUDIJNÍ INFORMACE** tyto publikace:

### Řada **ROSTLINNÁ VÝROBA**

Kulturní rostliny jako plevel následných plodin (*Kohout V.*)  
Ochrana proti chorobám a škůdcům slunečnice (*Jirátko J. a kol.*)  
Význam hořčiku pro výživu rostlin, zvířat a člověka (*Baier J. a kol.*)  
Důsledky nedostatečného hnojení (*Flohrová A.*)  
Síra a její význam pro výživu rostlin (*Zelený F.*)  
Hospodaření na nevyužívané zemědělské půdě (*Kapitola P.*)  
Biologická ochrana proti houbovým chorobám rostlin (*Prokinová E.*)  
Vliv závlah odpadními vodami na životní prostředí (*Šálek J.*)

### Řada **ŽIVOČIŠNÁ VÝROBA**

Vitamíny ve výživě hospodářských zvířat (*Schneiderová P.*)  
Moderní výživové látky (*Janiček J.*)  
Pastevní odchov a výkrm mladého skotu (*Doležal O.*)  
Nový systém hodnocení N-látek ve výživě přežvýkavců (*Homolka P.*)

### Řada **ZEMĚDĚLSKÁ TECHNIKA A STAVBY**

Stavby a technologie pro ŽV a omezování emisí (*Konopásek V.*)  
Nové typy žacích strojů (*Kumhála F. – Roh J.*)  
Úprava vzduchu v zemědělských objektech (*Kic P.*)  
Technika a kvalita zavlažování (*Růžička M.*)

## INTERACTIONS OF *LACTOBACILLUS* SPP. AND ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* UNDER *IN VITRO* AND *IN VIVO* CONDITIONS

### EFEKT *LACTOBACILLUS* SPP. PROTI ENTEROPATOGÉNNYM *ESCHERICHIA COLI* V PODMIENKACH *IN VITRO* A *IN VIVO*

A. Bomba<sup>1</sup>, R. Nemcová<sup>1</sup>, R. Kaštel<sup>2</sup>, R. Herich<sup>1</sup>, J. Pataky<sup>1</sup>, M. Čížek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

<sup>2</sup>University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

**ABSTRACT:** In the present study, the effect of *Lactobacillus* spp. against enteropathogenic *Escherichia coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> under *in vitro* and *in vivo* conditions has been compared and the effect of inoculation of *Lactobacillus* spp. upon the colonization of both the jejunum and ileum by enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> in 9 gnotobiotic pigs has been observed. Under *in vitro* conditions, the strain *Lactobacillus* spp. showed the inhibition of  $2.1 \pm 0.1$  mm against enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>. Two days after the inoculation, the enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>, inoculated to the control group of gnotobiotic pigs (E), colonized the mucosa of both jejunum and ileum of gnotobiotic pigs at counts of 6.41 and 6.08 log 10/cm<sup>2</sup>, respectively. In experimental group (L-E), the counts of adhered enteropathogenic *E. coli* in the identical sections of the small intestine, following the inoculation by *Lactobacillus* spp., amounted to 6.35 and 6.43 log/cm<sup>2</sup>, respectively. In both groups, numbers of *E. coli* in the intestinal content of both jejunum and ileum were nearly the same (group E 9.03 and 9.31 log 10/ml; group L-E 8.97 and 9.11 log 10/ml). Two to five days after *E. coli* inoculation, *Lactobacillus* spp. counts adhered to the jejunal wall ranged from 5.4 to 6.49 log 10 cm<sup>2</sup>, in the ileum they ranged from 6.05 to 6.77 log 10 cm<sup>2</sup>. In the jejunal content, the lactobacilli counts ranged from 6.81 to 8.86 log 10/ml and in the ileum from 8.5 to 8.98 log 10/ml. Two days after the *E. coli* inoculation, the concentration of lactic acid in the content of jejunum in gnotobiotic pigs of the groups E and L-E was 16.3 mmol/l and 23.6 mmol/l, respectively. The concentration of acetic acid in the jejunum of the pigs of E and L-E groups was 15.9 mmol/l and 19.6 mmol/l, respectively. Similarly, the higher concentrations of both acids were found also in the ileum of the L-E pigs. The results obtained indicate that the used strain of *Lactobacillus* spp. which has been preventively inoculated to gnotobiotic pigs, did not prevent the adhesion of enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> to the mucosa of both jejunum and ileum also despite of the demonstrated inhibitory effect against enteropathogenic *E. coli* under *in vitro* conditions and despite good adherent ability *in vivo*. In both groups of animals, the diseases with pronounced clinical signs as well as losses have occurred.

bacterial interactions; gnotobiotic pig; *Lactobacillus* spp.; enteropathogenic *E. coli*; colonization; digestive tract

**ABSTRAKT:** V predloženej práci bol porovnávaný efekt *Lactobacillus* spp. proti enteropatogénnym *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> v podmienkach *in vitro* a *in vivo* a bol sledovaný vplyv inokulácie *Lactobacillus* spp. na kolonizáciu jejúna a ilea enteropatogénnymi *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> u deviatich gnotobiotických ciciakov. Použitý kmeň *Lactobacillus* spp. v podmienkach *in vitro* vykazoval voči enteropatogénnym *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> inhibíciu  $2,1 \pm 0,1$  mm. Enteropatogénne *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> inokulované kontrolnej skupine gnotobiotických ciciakov (E) kolonizovali, dva dni po inokulácii, sliznicu jejúna a ilea gnotobiotických ciciakov v počtoch 6,41 a 6,08 log 10/cm<sup>2</sup>. V pokusnej skupine (L-E) dosiahla populácia adherovaných enteropatogénnych *E. coli* v rovnakých úsekoch tenkého čreva, po predchádzajúcej inokulácii *Lactobacillus* spp., počtom 6,35 a 6,43 log 10/cm<sup>2</sup>. Aj počty *E. coli* v črevnom obsahu jejúna a ilea oboch skupín boli približne rovnaké (skupina E 9,03 a 9,31 log 10/ml, skupina L-E 8,97 a 9,11 log 10/ml). Dva až päť dní po inokulácii *E. coli*, adherovali *Lactobacillus* spp. na stenu jejúna v počtoch 5,4–6,49 log 10/cm<sup>2</sup> a v ileu 6,05–6,77 log 10/cm<sup>2</sup>. V obsahu jejúna sa počty laktobacilov pohybovali v rozpätí 6,81–8,86 log 10/ml a v ileu 8,5–8,98 log 10/ml. Koncentrácia kyseliny mliečnej, dva dni po inokulácii *E. coli*, bola v obsahu jejúna gnotobiotických ciciakov skupiny E 16,3 mmol/l a v skupine L-E 23,6 mmol/l. Koncentrácia kyseliny octovej v jejúne dosiahla u ciciakov skupiny E 15,9 mmol/l a v skupine L-E 19,6 mmol/l. Podobne aj v ileu boli zistené vyššie koncentrácie oboch kyselín u ciciakov skupiny L-E. Dosaiahnuté výsledky poukazujú na to, že použitý kmeň *Lactobacillus*

spp., ktorý bol preventívne inokulovaný gnotobiotickým ciciakom, nezabránil adherencii enteropatogénnych *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> na sliznicu jejúna a ilea aj napriek preukázanému inhibičnému efektu proti enteropatogénnym *E. coli* v podmienkach *in vitro* a dobrej adhenčnej schopnosti *in vivo*. U oboch skupín zvierat došlo k ochoreniu s výraznými klinickými príznakmi a úhynu.

bakteriálne interakcie; *Lactobacillus* spp.; enteropatogénne *E. coli*; kolonizácia; tráviaci trakt

## INTRODUCTION

Pathogenic *E. coli* present the most frequent diarrhoea-causing agents in young animals (Tzipori, 1981). Employing probiotics seems to be a very efficacious method of preventing and treating diseases caused by pathogenic microorganisms, mainly the diarrhoeic syndrome in the young of farm animals.

Some authors explain the antibacterial effects of probiotics to result from the production of organic acids (lactic, acetic and formic acids) and a decrease in pH (Abel, 1977); the production of hydrogen peroxide, free radicals and their bacteriostatic or bactericidal effect (Piard and Desmazeaud, 1991); the production of natural antibiotic substances – bacteriocins (Vandenbergh, 1993); competitive exclusion (Chauviere et al., 1992) and antienterotoxin activity (Mitchell and Kenworthy, 1976).

The present knowledge obtained when studying the micro-ecology of the digestive tract as well as the inter-relationships of the microflora indicate that the bacterial interactions under *in vivo* conditions may have a different mechanism from that under *in vitro* conditions.

Gnotobiotic animals present the optimum model for the exact investigation into the interactions of natural microflora and pathogens under *in vivo* conditions since they enable to study the inter-relationships of the microorganisms.

The aim of our work was to compare the interactions of *Lactobacillus* spp. and enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> under *in vitro* and *in vivo* conditions as well as to observe the effect of *Lactobacillus* spp. inoculation upon the colonization of digestive tract in gnotobiotic pigs.

The testing of inhibitory effect of *Lactobacillus* spp. against *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> under *in vitro* conditions was done by the well method of Czarnocka-Rocznikowa and Kujawa (1983). The inhibitory effect of *Lactobacillus* spp. against enteropathogenic *E. coli* *in vivo* was evaluated on gnotobiotic animals.

Nine gnotobiotic pigs were included in the experiment. They were obtained by hysterectomy and reared in the isolators. The animals were divided into two groups. In the group E there were four and in the group L-E five animals, reared in two isolators in groups.

Group E of pigs was inoculated at 5 days of age with enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>. The group L-E was inoculated with *Lactobacillus* spp. at the age of 2, 3 and 4 days. On day 5 this group was inoculated with

enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>. Each inoculum contained  $1 \times 10^8$  germs in 1 ml. The animals received it at a dose of 2 ml. The strain of *Lactobacillus* spp. was isolated from the gut mucosa of the pig and strain *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> from the rectal swab of diarrhoeic pigs.

In both groups, 2 animals were sacrificed at the age of 7 days. In the L-E group, a pig at the age of 8 days immediately before the perishing, as well as 1 animal at the age of 10 days were sacrificed. Another pig in this group as well as 2 animals from the group E could not be sacrificed because of their sudden perishing.

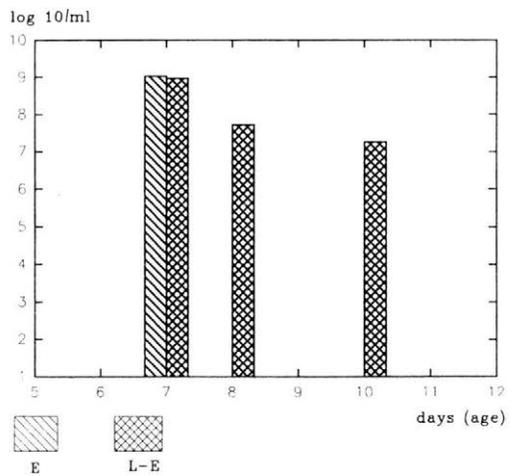
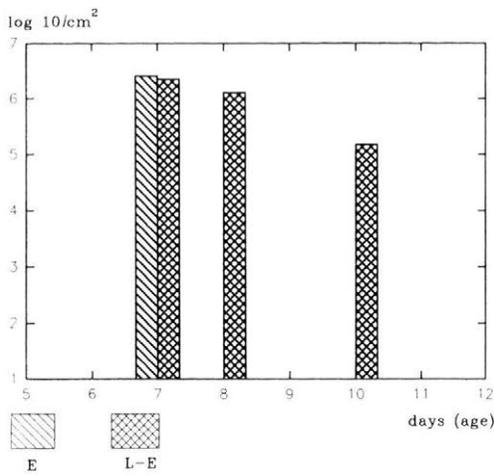
When testing the inhibitory effect of the strain used under *in vitro* conditions using the well method, the tested strain of *Lactobacillus* spp. showed the inhibition  $2.1 \pm 0.1$  mm (the size of the inhibitory zone) against enteropathogenic *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>.

In the experiment on gnotobiotic pigs, the number of enteropathogenic *E. coli* adhered to the mucosa of the jejunum at the age of 7 days in groups E and L-E amounted to  $6.41 \log 10/\text{cm}^2$  and  $6.35 \log 10/\text{cm}^2$ , respectively (Fig. 1). At the age of 8 and 10 days, the numbers of *E. coli* colonizing the mucosa of the jejunum in gnotobiotic pigs of group L-E were 6.1 and  $5.2 \log 10/\text{cm}^2$ . *E. coli* adhered to the mucosa of the ileum at the age of 7 days in groups E and L-E in counts of  $6.1 \log 10/\text{cm}^2$  and  $6.4 \log 10/\text{cm}^2$ , respectively. At the age of 8 and 10 days, the *E. coli* counts on the mucosa of the ileum in pigs of the group L-E amounted to 6.5 and  $5.9 \log 10/\text{cm}^2$ , respectively.

In the content of jejunum, the *E. coli* counts in pigs of the group E were  $9.0 \log 10/\text{ml}$  at the age of 7 days. In group L-E, from day 7 to day 10 of age, the *E. coli* counts ranged from 8.97 to  $7.26 \log 10/\text{ml}$  (Fig. 2). In pigs of the group E, at the age of 7 days the numbers of *E. coli* in the content of the ileum were  $9.3 \log 10/\text{ml}$ . In group L-E from day 7 to 10 of age, the numbers of *E. coli* decreased from  $9.1 \log 10/\text{ml}$  to  $8.4 \log 10/\text{ml}$ .

In pigs of the group L-E, the counts of lactobacilli adhered to the wall of jejunum decreased from  $6.5 \log 10/\text{cm}^2$  at the age of 7 days to  $5.4 \log 10/\text{cm}^2$  at the age of 10 days. In the content of the jejunum, the lactobacilli counts decreased from 8.9 to  $6.8 \log 10/\text{cm}^2$  (Fig. 3). The population of lactobacilli adhered to the mucosa of the ileum at the age of 7, 8 and 10 days amounted to 6.6; 6.8 and  $6.1 \log 10/\text{cm}^2$ , respectively; in the content of ileum the values being 9.0; 8.9 and  $8.5 \log 10/\text{cm}^2$ , respectively.

Lactic acid (LA) level in the content of jejunum of E pigs at the age of 7 days was 16.3 mmol/l. In group



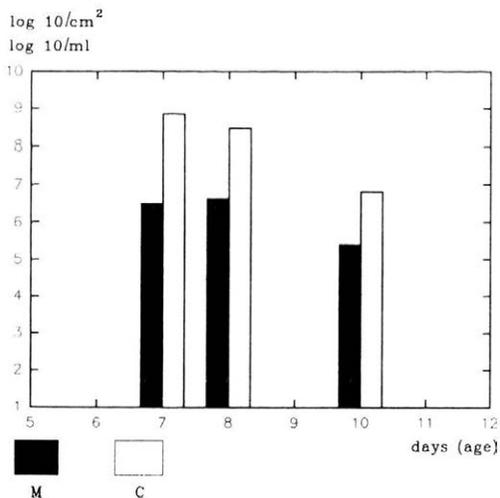
1. Colonization of jejunal mucosa by *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> in gnotobiotic pigs

2. Population of *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> in the jejunal content of the gnotobiotic pigs

Legend to Figs. 1 and 2:

E = group of pigs inoculated by *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>

L-E = group of pigs inoculated by *Lactobacillus* spp. and *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup>



3. Colonization of jejunal mucosa and population of *Lactobacillus* spp. in the jejunal content of gnotobiotic pigs

Legend:

M = mucosa, C = content

L-E, it decreased from 23.6 mmol/l at the age of 7 days and 24.5 mmol/l at the age of 8 days to 3.5 mmol/l at the age of 10 days. In E pigs, the level of acetic acid in the content of jejunum was 15.9 mmol/l at the age of 7 days. In L-E pigs it decreased gradually from 19.6 mmol/l at the age of 7 days to 6.0 mmol/l at the age of 10 days.

The results obtained by several authors point out to the unequal mechanism of bacterial interactions under

*in vitro* and *in vivo* conditions and they also spur on to study these problems as a whole. The strain of *Lactobacillus* spp. used in the present study showed a pronounced inhibition against *E. coli* 08:K88<sup>+</sup>Ent<sup>+</sup> (2.1 mm in average). The inhibition was quantified by the size of the inhibitory zone. The observation of the interactions of the identical strains in gnotobiotics while at first *Lactobacillus* spp. and subsequently *E. coli* were inoculated to germ-free pigs, has not confirmed the inhibitory effect of lactobacilli found *in vitro*. The *E. coli* counts adhered to intestinal mucosa as well as in the content of jejunum and ileum were nearly the same both in the group of gnotobiotic pigs, to which merely *E. coli* had been inoculated and in the group where *Lactobacillus* spp. had been applied preventively.

It can be concluded on the basis of our results that competition for adhesion receptors on intestinal mucosa is unlikely to play a decisive part in the mechanism of the inhibition of the enteropathogenic *E. coli* adherence to the intestinal mucosa by lactobacilli. Our previous results suggest that significantly higher levels of organic acids produced by lactobacilli in the mucosal film in comparison with the small intestine content may form the efficient inhibitory barrier against digestive tract pathogens (Bomba et al., 1995).

The results obtained can also be used for the selection of strains for probiotic purposes. The results of our study point to the fact that the efficacy of the bacterial strain which had been chosen for probiotic purposes should be tested not only by *in vitro* methods but also by *in vivo* ones. The gnotobiotic animals present an optimum experimental model to verify the inhibitory effect of probiotics against pathogens *in vivo* as they

enable the selective observation of mutual interactions. The gnotobiotics exceedingly facilitate also the determination of the adherence ability of bacterial strains *in vivo*.

In the following study the attention will be paid to the selection of lactobacilli strains with good adherence ability and considerable inhibitory effect against pathogens of the digestive tract in pigs using *in vitro* and *in vivo* methods.

#### Acknowledgements

We wish to thank Mrs. V. Novotná for translating the manuscript into English.

#### REFERENCES

BABEL, F. J.: Antibiosis by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 60, 1977: 815–821.  
BOMBA, A. – KAŠTEL, R. – GANCARČÍKOVÁ, S. – NEMCOVÁ, R. – HERICH, R.: The effect of lactobacilli inoculation on organic acids levels in the mucosal film and

the small intestine content in gnotobiotic pigs. *Berl. Munch. Tierärztl. Wschr.*, 1995 (in press).

CZARNOCKA-ROZCZNIKOVÁ, B. – KUJAWA, K.: Hamujacny wpływ pałeczek mlekowych przewodu pokarmowego cieląt na patogenne dla bydła szizepy *Escherichia coli*. *Med. Weter.*, 39, 1983: 346–349.

CHAUVIÈRE, G. – COCONNIER, M. H. – KERNEIS, S. – DARFENILLES-MICHAND, A. – JOLY, B. – SERVIN, A. L.: Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) by heat killed *Lactobacillus*. *Fems. Microbiol. Lett.*, 1992: 213–218.

MITCHEL, I. DeG. – KENWORTHY, R.: Investigations on a metabolite form *Lactobacillus bulgaricus*, which neutralizes the effect of enterotoxin from *Escherichia coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bacteriol.*, 41, 1976: 163–174.

PIARD, J. C. – DESMAZEAUD, M.: Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 1991: 525–541.

TZIPORI, S.: The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Vet. Res.*, 108, 1981: 510–514.

VANDENBERGH, P. A.: Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 1993: 221–238.

Arrived on 15th September 1995

---

#### Contact Address:

MVDr. Alojz Bomba, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/374 29, 360 87, fax 095/633 18 53

---

## IMMOBILIZATION IN ALGINATE GELS

## IMOBILIZACE V ALGINÁTOVÝCH GELECH

M. Jankovský, L. Vašáková

*Czech University of Agriculture, Praha, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Summarization of literary data on immobilization in calcium alginates as published in the last two years. The review focuses on those papers in which the new knowledge of immobilized enzymes, cells and tissues expands their biotechnological applications.

alginates; immobilization; enzymes; cells; tissues

**ABSTRAKT:** Byly sumarizovány literární údaje o imobilizaci ve vápenatých alginátech tak, jak byly publikovány v průběhu asi dvou let. Rešerše je směřována na ty práce, ve kterých nové poznatky o imobilizovaných enzymech, buňkách a tkáních rozšiřují možnosti jejich biotechnologické aplikace.

algináty; imobilizace; enzymy; buňky; tkáň

## ÚVOD

K dávno známým aplikacím látek, tvořících koloidní systémy typu gel, jako je želatina, agar a další, patřily i algináty v potravinářských technologiích. Jejich indiferentnost vůči živým buňkám vyústila nakonec ve snahu vytvářet z nich „lože“ pro prostorovou determinovatelnost suspenzního prostoru, obsahujícího mikroorganismy nebo živé buňky rostlin i živočichů. V současné době je poznatků o „imobilizovaných“ buňkách tolik, že si logicky vynutily i práce sumární. Jejich zaměření je různé. Za nejzajímavější lze považovat aplikace „imobilizátů“ v rozvíjejících se biotechnologických procesech.

Na toto téma byla například uveřejněna rozsáhlá rešeršní práce (P r a s , 1992), zdůrazňující právě tento typ aplikace. Najdeme v ní opodstatněné tvrzení, že jen velice malý podíl enzymatického potenciálu rostlin je dosud využíván k selektivní přeměně prekurzorů na hledané sloučeniny. Je zřejmé, že imobilizace aktivních buněk či tkání může být klíčem k propracované průmyslové formě nejrůznějších biotechnologických procesů, do této doby nejen neuskutečněných, ale ani nepředpokládaných. Prasova práce je zaměřena na možnosti přeměny prekurzorů na farmaceuticky významné látky s využitím stereospecificity enzymatických přeměn. Její existence byla impulsem k pokusu shrnout následné poznatky, jejichž šíře autory tohoto přehledu někdy až udivila.

Přesto hlavním tématem většiny prací zůstává imobilizace buněk, tkání a enzymů. Jsou studovány i sekundární vlivy, jako je například vliv ošetření kvasinek

před imobilizací v alginátech pro využití jejich invertázy (P í r a aj., 1991).

## OBECNÉ POZNATKY

Imobilizované tkáň nebo buňky jsou velmi vhodným objektem pro ty typy výzkumných metodik, které na volné buňky nelze aplikovat. Imobilizace umožňuje využít například „scanning“ elektronové mikroskopie některých plísní pěstovaných za různých podmínek (F e d e r i c i aj., 1991).

Vzrůst viskozity alginátů z *Pseudomonas aeruginosa* byl pozorován při přidávku mucinu a exopolysacharidů z *Pseudomonas cepacia* (A l l i s o n a M a t t h e w s , 1992). Zároveň se snižuje difuze a antimikrobiologická aktivita imobilizovaných buněk.

Polyfaktoriální analýzy vlivu koncentrace alginátu sodného, chloridu vápenatého a buněk kvasnic na stabilitu získaného gelu a imobilizaci buněk provedli J a m u n a aj. (1992a, b). Koncentrace alginátu a chloridu spolu s dobou tvorby gelu mají zřetelný vztah ke stabilitě gelu, koncentrace imobilizovaných buněk ovlivňuje stabilitu gelu nejednoznačně.

Rozsáhlá je práce autorů K u r i l l o v a aj. (1992) zabývající se vlastnostmi vytvrzených vápenatých pektátů jako loží pro imobilizaci buněk.

J o u e n n e aj. (1993) agarové lože obsahující různá množství (od  $10^3$  do  $10^6$  buněk v 1 ml agaru) *Escherichia coli* inkubovali v živném médiu a jejich vývoj a množení sledovali ve srovnání s volnými buňkami. Imobilizované buňky rostly exponenciálně s vyšším

koefficientem než buňky volné (0,0115 a 0,0145 oproti 0,011) bez zřetelné závislosti na počáteční koncentraci.

## IMOBILIZACE NA JINÝCH MATERIÁLECH

Imobilizace buněk je možná i na jiných ložích. Polyamidová vlákna (kaprolaktamová), sloužící jako lože pro *Streptomyces rochei* 303 se ukázala jako velmi vhodná pro degradaci polychlorfenolů v koncentraci 1 g v litru a při průtoku 80 ml/h. Po 75 dní byl systém schopen degradovat polychlorfenoly intenzitou 36 mg PCF na den a gram nosiče (Golovleva aj., 1993). Jako zvláštnost byly v literatuře uvedena možnost imobilizace buněk *Leuconostoc mesenteroides* v porézní nerovné oceli (Elsayed aj., 1992). V kontinuálním bioreaktoru pro studium degradace fenolů při teplotě 35 °C bylo použito granulovaného aktivního uhlí (GAC). Kultura bakterií velmi dobře rostla na nosiči a vytvořila vrstvu na granulích (Cráik aj., 1992). Účinnost lože se pohybovala kolem 20 mg fenolu na mg lože a den. Byla provedena měření mechanických vlastností.

## IMOBILIZACE SLOUČENIN

Zajímavá publikace o imobilizovaných látkách ve vápenatém alginátu (Siragusa aj., 1992) uvádí zvýšenou účinnost kyseliny mléčné a octové (asi 2%) na inokulované *Listeria monocytogenes* (Lm) v libovém mase. Účinnost imobilizovaných kyselin je o mnoho řádů vyšší.

## IMOBILIZACE ENZYMŮ

Aminoacyláza (3.5.1.14) při imobilizaci ve vápenatém alginátu je vhodným producentem fenylalaninu z N-acetyl fenylalaninu. Byly proměřeny optimální podmínky (Lee aj., 1992a, b) a ověřeno, že enzym ztrácí asi 10 % aktivity po deseti cyklech. Potažení povrchu polyetylenimem se neosvědčilo. Lože z vápenatého alginátu, připravené při pH 7 a stabilizované poly-L-lyzinem, bylo použito pro imobilizaci aminoacylázy (Lee a Lee, 1993). Lože je stabilní, aktivita enzymu vysoká. Biotechnologické využití imobilizovaných buněk kvasnic, resp. jejich enzymů zasahuje i neběžné příklady, jako je štěpení cellobiázy beta-glukosidázou, zachycenou v kombinovaném loži propylenglykolalginátu a kostní želatiny. Lože má sférický tvar (Woodward a Cappas, 1992).

## IMOBILIZACE MIKROORGANISMŮ

### Imobilizace kvasinek

Počet případů imobilizace kvasinkových buněk trvale roste. Liší se často pouze typem využívaného enzymu, což lze ovlivnit specifikací podmínek (Ramakrishna aj., 1992).

Optimalizace průběhu reakcí v bioreaktorech, „vzbudivých“ buňkami kvasnic imobilizovaných ve vápe-

natém alginátu, vyžaduje studium fyzikálních vlastností médií procházejících reaktorem v závislosti na jejich hmotnostním průtoku. Zvláště reaktory s fluidní imobilizovanou fází vyžadují přesné dodržování podmínek toku médií. Výpočty a experimenty v této oblasti se zabývala studie autorů Bejar aj. (1992).

Pokusy s kontinuální fermentací v reaktoru s imobilizovanými *Saccharomyces cerevisiae* v kapsulích o průměru 1 mm, ve kterých byla sledována kinetika, ukázaly (Vives aj., 1993), že kinetika biochemické přeměny je velmi podobná pro volné a imobilizované buňky.

Imobilizované schizosacharomycety v alginátovém loži byly s úspěchem využity pro štěpení (rozklad) kyseliny jablečné. Metodika byla zkoumána z hlediska možnosti využití v biotechnologických pochodech (Taillandier aj., 1991).

### Imobilizace bakterií mléčného kvašení

Imobilizace mléčných bakterií v alginátovém gelu byla využita pro výrobu kyseliny mléčné (Dong aj., 1991). Lipáza buněk, imobilizovaných v analogickém loži, je schopna katalyzovat hydrolytické reakce i ve dvoufázovém systému voda – organické rozpouštědlo (Hertzberg aj., 1992).

Zajímavá je studie o uvolňování imobilizovaných buněk *Lactococcus lactis*, původně imobilizovaných v loži alginátu vápenatého. *Lactococcus*, imobilizovaný pro tvorbu jogurtu, uvolňoval při intenzivním využití zpočátku  $1 \times 10^6$ , později  $3 \times 10^7$  CFU/ml. Na uvolňování buněk nemělo vliv omytí lože mezi šaržemi, počáteční koncentrace alginátu, ani koncentrace buněk. Zato silně počet buněk závisel na kyselosti dávky. Pokrytí lože poly-L-lyzinem se ukázalo jako úspěšné teprve po dvojím opakování (kontrolováno v průběhu pěti dávek), ale snížilo acidifikační produktu. Ponoření lože do etanolu zničilo buňky povrchových vrstev, ale acidifikační aktivita zůstala zachována (Champagne aj., 1992a).

Při výrobě mléčných kvašených výrobků (jogurtu) pomocí *Lactococcus lactis* subsp. biovar *diacetylactis* byla vyzkoušena metodika imobilizovaných buněk ve dvouvrstevném loži z vápenatého alginátu. Z pasterizované smetany o obsahu 31 % tuku byl po inokulaci volnými buňkami získán produkt ve třikrát kratším čase, přičemž počet volných buněk v produktu byl o dva až tři řády nižší. Proces vyžaduje ošetření produktu pro zvýšení stálosti (Prevost a Divies, 1992).

Buňky *Lactococcus lactis* byly imobilizovány ve vápenatém alginátu a vneseny do růstového média. Po určité etapě růstu byla biomasa lyofylozována. Byl sledován podíl buněk, které přežily (62–79 %). Dále byly sledovány senzory vlastnosti, proteolytická aktivita a tvorba kyselin ve srovnání s buňkami jenom imobilizovanými a buňkami volnými. Imobilizované buňky přežily lépe než volné, zvláště za přítomnosti sacharózy a vitamínu C. Stabilita při teplotě 45–55 °C byla vyšší pro buňky lyofylozované imobilizované. Produkované sýry byly rovněž lepší z buněk IFD (imobilizované

freeze drying), právě tak jako byla vyšší odolnost proti fágům (Champane aj., 1992b).

Pěstování laktobacilů v loži vápenatého alginátu se jeví jako jedna z cest, jak získat koncentrát buněk bez odstřeďování nebo odfiltrování z média. Pokusy autorů Morin aj. (1992) ukázaly, že komerční médium Gold Complete není ovlivňováno přidávkou vápníku, zatímco při náhradě média extraktem z kvasnic nebo masa se jeho účinnost zvyšila.

### Jiné mikroorganismy a jejich imobilizace

U mikroorganismů *Bacillus subtilis* a *Serratia marcescens* byla po jejich imobilizaci studována rychlost difuze proteázy alginátovým ložem. Byl vytvořen i matematický model děje (Longo aj., 1992). Difuzní koeficienty jsou podobné jako u nízkomolekulárních látek.

Optimalizací podmínek činnosti imobilizovaného acetobakteru se zabývali Fumi aj. (1992).

Že by imobilizace měnila vlastnosti imobilizovaných mikroorganismů není běžný jev. Byl prokázán u *Tetrahymena thermophila*, kdy vápenatým alginátem obalené buňky měly dvojnásobnou délku oproti suspendovaným buňkám neošetřeným a měnila se i jejich aktivita ve tvorbě enzymů (Kiy a Tiedtke, 1993).

Britští vědci Mollah a Stuckley (1993) vyzkoušeli kontinuální reaktor s imobilizovanými bakteriemi *Clostridium acetobutylicum* ve vápenatém alginátu a zjistili, že maximální konverze glukózy dosahovala 0,72 g/l/h. Ve stejných jednotkách byla nejnižší produkce 0,12 a trvale udržitelná 0,58 g rozpouštědel z 1 l za hodinu. Vypadá to na málo, ale při objemu suspence 1 000 l by činila standardní produkce více než 4 kg za 8 h bez vysokých nároků na energii.

Novinkou v imobilizaci mikroorganismů v alginátech je použití stronciového alginátu (Zakaria aj., 1993). Lipolytické bakterie *Pseudomonas* byly imobilizovány za účelem produkce lipáz. Výsledky byly označeny za výborné, optimální byl 3% gel s 20% obsahem buněk. V 72hodinovém cyklu bylo lože recyklováno po dobu 24 dní, kdy jeho pevnost klesla na nulu. Recyklace byla doprovázena (prováděna) aerací.

*Aspergillus oryzae*, produkovaný ze spor, byl inkorporován do vápenatého alginátu a použit pro produkci „kojové“ kyseliny. Kyselina byla zakoncentrována na hodnotu 83 g v litru, kdy začíná krystalovat. Kultura byla po izolaci přenesena do čerstvého média. Produkce je vysoká – vyšší proti volným organismům, ale intenzita imobilizátů klesá po třetí dávce (opakování) – Kwak a Rhee (1992a).

Konidie *Aspergillus oryzae* byly imobilizovány ve vápenatém alginátu s cílem získat imobilizovaný biokatalytický systém pro tvorbu „kojové“ kyseliny (orig. kojic acid). Produkt po přečištění měl vysokou aktivitu a konverze glukózy na cílovou sloučeninu byla vysoká. Účinnost je závislá na podmínkách růstu a silně závislá na koncentraci dusíku v médiu (Kwak a Rhee, 1992b).

Při imobilizaci *Escherichia coli* v loži vápenatého alginátu bylo zjištěno, že dochází ke změnám ve složce

ní izolovaných mastných kyselin (MK) lipidů z imobilizovaného mikroorganismu. Jelikož je zastoupení MK typické pro jednotlivé mikroorganismy, jsou změny ve složení MK zavádějícím artefaktem. Příčinou byly nečistoty alginátu odstranitelné extrakcí chloroformem a etanolem (Diefenbach aj., 1992a, b).

Stormo a Crawford (1992) navrhli velmi úspěšnou metodu pro imobilizaci (modelové *Flavobacterium*), spočívající ve vstříkávání suspence buněk do vodné fáze, kde želatinací či zesílením matrice vznikají disperzní částice suspence. Imobilizované buňky mají stejnou aktivitu jako volné.

Inkorporace buněk *Pseudomonas fluorescens* do alginátového gelu před jejich rozptýlením do půdy silně zvyšuje jejich životaschopnost a buňky déle přežívají (Vanelas aj., 1992). Zvýšení je prokazatelné a kolonizace rhizoplanu je možná i po sedmi týdnech od vnesení buněk do půdy.

Zvláštní aplikace alginátů byla provedena při pokusu připravit suchý inokulační materiál ze rhizobií (*Arachis hypogaea*), imobilizovaných ve vápenatém alginátu s peralitem. Připravené granule s obsahem  $9 \cdot 10^{10}$  rhizobií na gram jsou stabilní po dobu šesti měsíců, kdy obsah klesá na  $8 \cdot 10^{10}$ . Granule nemají kontaminanty a jsou dobře skladovatelné (Hegde a Brahmaraakash, 1992).

Jako modelový systém pro zjištění vlivu alginátů na fyziologii mykobakterií si autoři Smith aj. (1993) zvolili konverzi propenu na 1,2-epoxypropan, vyžadující NADH za přítomnosti glukózy a za její absence. Pokud byla glukóza přítomna, nebyl žádný rozdíl mezi volnými a imobilizovanými buňkami. Za nepřítomnosti glukózy byl rozdíl v aktivitě nakonec přičten Ca iontům, nikoli alginátu.

*Proteus vulgaris* imobilizovaný v alginátu, kappa-carrageenanu, chitosanu, polyuretanu a polyakrylamid acylhydrazidu vykázal nižší aktivitu, s výjimkou poslední jmenovaného lože. V chitosanu a polyuretanu se podařilo obnovit aktivitu a použití imobilizované buňky několikrát sobě. Po třiceti cyklech se snížila aktivita asi o 30–40 % (Karsten a Simon, 1993).

Samotný růst počtu mikroorganismů při jejich kultivaci není imobilizací ve vápenatém alginátu pozitivně ovlivňován a je závislý na kvalitě živního média. Morin aj. (1992) ověřili, že při dávkové kultivaci v mléce či v komerčně používaném živném médiu (Gold Complete, Nordica) nevzrůstal prokazatelně počet buněk (původní počet  $3,3\text{--}7,8 \cdot 10^{10}$  g) v dalších dávkách. Vzrostl počet volných buněk a po třetí dávce tvořil více jak 50 % celkového počtu. Přitom komerční Gold médium bylo vhodnější než mléko. Přesto považují technologii s použitím imobilizovaných buněk za vhodnou pro průmyslové využití.

### IMOBILIZACE BUNĚK A TKÁNÍ ROSTLIN

Mezofylové protoplasty cukrové řepy včleněné do lože vápenatého alginátu a kultivované v Schenk-Hil-

debrant médiu vykazaly vyšší schopnost tvorby kořenů (Schlankstedt aj., 1992).

Sekrece solavetivonu, phytoalexinu, buňkami *Hyoscyamus muticus* byla podstatně zvýšena inkorporací do vápenatého alginátu. Imobilizované buňky zvýšily produkci o 53 % oproti kontrole (Ramakrishna aj., 1993).

Srovnáním výsledků výzkumu v alginátech imobilizovaných buněk *Catharanthus roseus* se zabývá přehledová práce autorů Buitelaar a Tramer (1992). V porovnání se suspenzemi kulturami sledovali zejména produkci alkaloidů, například berberinu. Imobilizované buňky poskytovaly většinou vyšší produkci.

Při imobilizaci buněk *Chlorella salina* ve vápenatém alginátu bylo pomocí radioizotopů kobaltu, manganu a zinku ( $^{60}\text{Co}$ ,  $^{54}\text{Mn}$  a  $^{65}\text{Zn}$ ) zjištěno (Garnerham aj., 1992), že imobilizace zvyšuje prokazatelně akumulaci uvedených kovů. Jejich desorpce je závislá na klesajícím pH.

Při zkoumání intenzity růstu „Kallar gras“ bylo zjištěno (Zecker aj., 1992), že suspendovaný subjekt akumuluje amoniak dvakrát rychleji než imobilizovaný. Pro všechny účely asi nebude imobilizace tkání a buněk optimální.

Vědci, pracující v oblasti biologie rostlinných buněk, by velmi rádi používali metodiku identifikace typů protoplastů v kulturách. V práci autorů Golds aj. (1992) je podobná metodika popsána. Její podstatou je imobilizace protoplastů v agaróze nebo alginátu s použitím polypropylenové sítě jako nosiče. Pomocí počítačem kontrolovaného pohybu mikroskopu lze odlišit jednotlivé protoplasty. Jejich registrace byla modelově provedena na mezofylových protoplastech tabáku a suspenzi protoplastů ječmene.

Kolonie protoplastů slunečnice (*Helianthus annuus* L.) z kotyledonů vykazaly ve vzrůstu závislost na fyzikálních vlastnostech prostředí (Fischer, 1992). Oproti agaróze byly kolonie pěstované v alginátech podstatně kvalitnější.

## IMOBILIZACE BUNĚK A TKÁNÍ HUB

Jsou i poznatky opačné, například mycelia entomopatogenních hub *Metarhizium anisopliae* a *Beauveria bassiana* v 1% vápenatém alginátu produkovala méně konidií a mycelium pomaleji rostlo ve srovnání s mycelii pěstovanými v gelu pšeničného škrobu. Pro alginátový gel je pozitivně vyšší odolnost proti teplotám a proti ozařování slunečním světlem (Pereira a Roberts, 1991).

Imobilizace buněk hub (*Filamentous fungi*) může být využita pro výrobu organických kyselin. Je lepší než aplikace suspenze buněk. Optimum podmínek se liší podle kvality buněk (Vassilev a Vassileva, 1992).

## IMOBILIZACE BUNĚK A TKÁNÍ ŽIVOČICHŮ

V alginátovém gelu byly imobilizovány králičí chondrocyty (Tampoune aj., 1992). Vykázaly standardní jevy činnosti, až na to, že po 38 dnech pro-

dukovaly kolagen typu II – chrupavkový. Výzkum v tomto směru pokračuje.

Analogické problémy řešili Mano aj. (1992). Kultivovali hybridomové buňky myši ve vápenatém alginátu. Ověřili jejich normální funkci včetně nárůstu tkáně za těchto podmínek: 0,8% alginát, viskozita 60–100 cP, přidáno 0,2 % polyakrylátu. Tvorba „antibody“ nepoškozuje alginát po dobu jednoho měsíce, ani buňky nebyly poškozeny. Alginátová imobilizace snad nikdy nepodpoří negativně směřované genetické pokusy, když jedna z publikací (Nebel, 1993) pojednává o imobilizaci moruly myšního zárodku. Zatím není jasné z jakého důvodu.

Polyvinylamin a algináty byly použity jako materiál pro imobilizaci v mikrokapkách pro buňky IW32 (erytroleukemie). Hustota imobilizovaných buněk  $8.10^6/\text{ml}$  je čtyřicetinasobná oproti běžným kulturám a koncentrace erythropoietinu v mikropartiích byla až čtrnáctinasobně vyšší (Wang aj., 1992).

Lidské a zvířecí chondrocyty kultivované v alginátovém loži si zachovávají svoji sférickou stavbu (právě tak jako při kultivaci v agaróze). Produkují aggrecan, glykoprotein, který je ihned asociován v agregáty, izolovatelné z lože. Hausselmann aj. (1992) popisují asociaci agregátů do buněčné matrice a jejich možné změny.

Buňky psích intervertebrálních disků, izolované působením pronázy a kolagenázy, byly imobilizovány do alginátového lože za přítomnosti vápníku a projevovaly některé nové biosyntetické vlastnosti (Maldonado a Oegema, 1992).

Algináty byly použity i pro pokrytí (enkapsulaci) jiných útvarů než buněk. Zekorn aj. (1992) se pokusili pokrýt povrch Langherhansových ostrůvků. Pokryté ostrůvky vykazaly neporušenou aktivitu a jsou vhodným materiálem pro transplantace.

Již zmíněná imobilizace pankreatických ostrůvků do vápenatého alginátu se dočkala další mechanizace. Byla popsána metodika (Wolters aj., 1992) spočívající v rozstříkání připravené suspenze tryskou, kdy vytvořené kapičky jsou stabilizovány v roztoku 0,1 M chloridu vápenatého. Velikost a tvar závisí na rychlosti průchodu vzduchu a na dalších kritériích. V práci jsou hledány optimální podmínky pro mechanizovanou tvorbu kapiček.

## JINÉ APLIKACE

Při imobilizaci hybridoma buněk ve vápenatém alginátu dochází v určité míře k jejich poškození. Pro minimalizaci těchto poškození bylo zkoušeno ošetření buněk chloridem vápenatým. Roztoky chloridu vápenatého o koncentraci 1,3–1,5 % vykazují poškození buněk, které se zvyšováním koncentrace stoupá (Lee aj., 1992b).

Jednou z nových aplikací alginátů se zabývá japonská práce (Yamamoto aj., 1992), ve které autoři popisují značné prodloužení doby vzniku krystalické formy fosforečnanu vápenatého z formy amorfní předavkem alginátu. Zjistili, že alginát byl stejně účinný jako poly-L-glutamát a citrát.

Bezpečnost a přesnost ohřevu potravin v mikrovlnných troubách lze porovnat s použitím immobilizovaných mikroorganismů. Principem je sledování počtu organismů, které přežijí ohřev (H o l y o a k aj., 1993).

## LITERATURA

- ALLISON, D. G. – MATTHEWS, M. J.: Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Bacteriol., 73, 1992: 484–488.
- AKIYAMA, A. – ENDO, H. – NAKAKITA, K. – MURATA, K. – YONEMOTO, Y. – OKAYAMA, K.: Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 1992: 355–356.
- BEJAR, P. – CASAS, C. – GODIA, F. – SOLA, C.: The influence of mass regulation and temperature on the utility of the bioreactor with Ca-alginate. Appl. Biochem. Biotechnol., 34–35, 1992: 467–475.
- BUITELAAR, R. M. – TRAMPER, J.: Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures – Literature, Review. J. Biotechnol., 23, 1992: 111–141.
- CRAIK, S. A. – FEDORAK, P. M. – HRUDEY, S. E. – GRAY, S. M.: Kinetics of methanogenic degradation of phenol by activated-carbon-supported and granular biomass. Biotechnol. Bioeng., 40, 1992: 777–786.
- DIEFENBACH, R. – KEWELOH, H. – REHM, H. J.: Fatty acid impurities in alginate influence the phenol tolerance of immobilized *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1992a: 530–534.
- DIEFENBACH, R. – HEIPIEPER, H. J. – KEWELOH, H.: The conversion of cis into trans unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 – Evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 1992b: 382–387.
- DONG, G. Q. – KAUL, R. – MATTIASSON, B.: Evaluation of alginate – immobilized Lactobacillus-casei for lactate production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1991: 309–314.
- ELSAIED, A. M. M. – ABDULWAHID, K. – COUGHLIN, R. W.: Investigation of production of dextran and dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized within porous stainless steel. Biotechnol. Bioeng., 40, 1992: 617–624.
- FEDERICI, F. – PETRUCCIOLI, M. – FEDERICI, R. G. – MILLER, M. W.: Scanning electron microscopy of Ca-alginate – immobilized aureobasidium – pullulans grown under various culture conditions. Mycologia, 83, 1991: 595–600.
- FISCHER, C. – HAHNE, E.: Structural analysis of colonies derived from sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts cultured in liquid and semi-solid. Media Protoplasma, 169, 1992: 130–138.
- FUMI, M. D. – SILVA, A. – BATTISTOTTI, G. – COLAGRANDE, O.: Living immobilized Acetobacter in Ca-alginate in vinegar production – preliminary study on optimum conditions for immobilization source. Biotechnol. Lett., 14, 1992: 605–608.
- GARNHAM, G. W. – CODD, G. A. – GADD, G. M.: Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella-Salina* immobilized in alginate microbeads. Morph. Sci. Technol., 26, 1992: 1764–1775.
- GOLDS, T. J. – BABCZINSKY, J. – RAUSCHER, G. – KOOP, H. U.: Computer-controlled tracking of single cell development in *Nicotiana tabacum* L. and *Hordeum vulgare* L. protoplasts embedded in agarose alginate films. J. Pl. Physiology, 140, 1992: 582–587.
- GOLOVLEVA, L. A. – ZABORINA, O. E. – ARINBASAROVA, A. Y.: Degradation of 2,4,6-TCP and a mixture of isomeric chlorophenols by immobilized *Streptomyces rochei*-303. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 1993: 815–819.
- HAUSSELMANN, H. J. – AYDELOTTE, M. B. – SCHUMACHER, B. L. – KUETTNER, K. E. – GITELIS, S. H. – THONAR, E.: Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. Matrix, 12, 1992: 116–129.
- HEGDE, S. V. – BRAHMAPRAKASH, G. P.: A Dry granular inoculant of *Rhizobium* for soil application. Plant and soil, 144, 1992: 309–311.
- HERTZBERG, S. – KVITTINGEN, L. – ANTHONSEN, T. – SKJAKBRAEK, G.: Alginate as immobilized matrix and stabilizing agent in a 2-phase liquid system – application in lipase-catalysed reaction. Enzyme Microb. Technol., 14, 1992: 42–47.
- HOLYOAK, C. D. – TANSEY, F. S. – COLE, M. B.: An alginate bead technique for determining the safety of microwave cooking. Lett. Appl. Microbiol., 16, 1993: 62–65.
- CHAMPAGNE, C. P. – GAUDY, C. – PONCELET, D. – NEUFELD, R. J.: *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. Appl. Environ. Microbiol., 58, 1992a: 1429–1434.
- CHAMPAGNE, C. P. – MORIN, N. – COUTURE, R. – GAGNON, C. – JELEN, P.: The potential of immobilized cell technology to produce freeze-dried, phage-protected cultures of *Lactococcus lactis*. Fd Res. Int., 25, 1992b: 419–427.
- JAMUNA, R. – RAMAKRISHNA, S. V.: Continuous synthesis of thermolabile alpha-amylase by bacillus cells immobilized in calcium alginate. Enzyme Microbiol. Technol., 14, 1992a: 36–41.
- JAMUNA, R. – SAI, P. S. T. – VORA, S. – RAMAKRISHNA, S. V.: Optimization of critical parameters for immobilization of yeast cells to alginate gel matrix. J. Ferment. Bioeng., 73, 1992b: 319–322.
- JOUENNE, T. – BONATO, H. – MIGNOT, L. – JUNTER, G. A.: Cell immobilization in composite agar layer microporous membrane structures-growth kinetics of gel-entrapped cultures and cell leakage limitation by a microporous membrane. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 1993: 478–481.
- KARSTEN, G. – SIMON, H.: Immobilization of *proteus vulgaris* for the reduction of 2-oxo acids with hydrogen gas or formate to D-2-hydroxy acids. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 1993: 441–446.
- KIY, T. – TIEDTKE, A.: Effects of immobilization on growth, morphology, and DNA content of the ciliated protozoon *Tetrahymena-Thermophila*. FEMS Microbiol. Lett., 106, 1993: 117–122.
- KURILLOVA, L. – GEMEINER, P. – ILAVSKY, M. – STEFUCA, V. – POLAKOVIC, P. – WELWARDOVA, A. – TOTH, V.: Calcium pectate gel beads for cell entrapment. 4. Properties of stabilized and hardened calcium pectate gel beads with and without cells. Biotechnol. Appl. Biochem., 16, 1992: 236–251.
- KWAK, Y. – RHEE, J. S.: Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca-alginate-immobilized fungal cells. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1992: 578–583.
- KWAK, M. Y. – RHEE, J. S.: Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotechnol. Bioeng., 39, 1992: 903–906.
- LEE, K. H. – LEE, P. M. – SIAW, Y. S.: Studies of L-phenylalanine production by immobilised aminoacylase in stabilized calcium alginate beads. J. Chem. Technol. Biotechnol., 54, 1992: 375–382.

- LEE, G. M. – HAN, B. K. – KIM, J. H. – PALSSON, B. O.: Effect of calcium chloride treatment on hybridoma cell viability and growth. *Biotechnol. Lett.*, 14, 1992b: 891–896.
- LEE, K. H. – LEE, P. M.: Effect of pH on the preparation of poly-L-lysine-stabilized calcium alginate beads for immobilization of aminoacylase. *Biotechnol. Techn.*, 7, 1993: 131–136.
- LONGO, M. A. – NOVELLA, I. S. – GARCIA, L. A. – DIAZ, M.: Diffusion of proteases in calcium alginate beads. *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 1992: 586–590.
- MALDONADO, S. M. – OEGEMA, T. R.: Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J. Orthop. Res.*, 10, 1992: 677–690.
- MANO, T. – MITSUDA, H. – KUMAZAWA, E. – TAKESHITA, Y.: New immobilization method of mammalian cells using alginate and polyacrylate. *J. Ferment. Bioeng.*, 73, 1992: 486–489.
- MOLLAH, A. H. – STUCKEY, D. C.: Maximizing the production of acetone butanol in an alginate bead fluidized bed reactor using *Clostridium-Acetobutylicum*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 56, 1993: 83–89.
- MORIN, N. – BERNIERCARDOU, M. – CHAMPAGNE, C. P.: Production of concentrated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suspensions in calcium alginate beads. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1992: 545–550.
- NEBEL, R. L.: *In vitro* and *in vivo* development of mouse morulae encapsulated in 2-percent sodium alginate or 0.1-percent P-lysine. *Theriogenology*, 39, 1993: 655–667.
- PEREIRA, R. M. – ROBERTS, D. W.: Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econom. Entomol.*, 84, 1991: 1657–1661.
- PIRA, L. – PINTO, C. – ROLZ, C.: The effect of pretreatment on the invertase activity of gel-entrapped yeast biomass. *J. Indust. Microbiol.*, 8, 1991: 247–252.
- PRAS, N.: Bioconversion of naturally occurring precursors and related synthetic compounds using plant cell cultures – Minireview. *J. Biotechnol.*, 26, 1992: 29–62.
- PREVOST, H. – DIVIES, C.: Cream fermentation by a mixed culture of *Lactococci* entrapped in 2-layer calcium alginate gel Beads. *Biotechnol. Lett.*, 14, 1992: 583–588.
- RAMAKRISHNA, S. V. – REDDY, G. R. – CURTIS, W. R. – HUMPHREY, A. R.: Production of solavetivone by immobilized cells of *Hyoscyamus muticus*. *Biotechnol. Lett.*, 15, 1993: 301–306.
- SCHLANGSTEDT, M. – HERMANS, B. – ZOGLAUER, K. – SCHIEDER, O.: Culture of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts in alginate *Callus formation* and root. *Organogen. J. Pl. Physiol.*, 140, 1992: 339–344.
- SIRAGUSA, G. R.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *J. Food Sci.*, 57, 1992: 293–296.
- SMITH, M. R. – DEHAAN, M. A. – DEBONT, J. A. M.: The effect of calcium alginate entrapment on the physiology of *Mycobacterium* sp. strain E3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 1993: 642–648.
- STORMO, K. E. – CRAWFORD, R. L.: Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1992: 727–730.
- TAILLANDIER, P. – RIBA, J. P. – STREHAIANO, P.: Malate degradation by *Schizosaccharomyces* yeast included in alginate beads. *Bioproc. Engng.*, 7 1991: 141–144.
- TAMPONNET, C. – RAMDI, H. – GUYOT, J. B. – LIEVREMONTE, M.: Rabbit articular chondrocytes in alginate Gel-characterisation of immobilized preparations and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 1992: 311–315.
- TSENG, C. H. – YAMAGUCHI, K. – KITAMIKADO, M.: Isolation and some properties of alginate lyase from a Marine Bacterium *Vibrio-Sp* AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries*, 58, 1992.
- UECKERT, J. – NIEMANN, E. G. – FENDRIK, I.: Mixed continuous suspended and immobilized culture of diazotrophic isolates from root-free soil and the endorhizosphere of *Leptochloa fusca* L. Kunth. *Symbiosis*, 13, 1992: 75–84.
- VANELSAS, J. D. – TREVORS, J. T. – JAIN, D. – WOLTERS, A. C. – HEIJNEN, C. E. – VANOVERBEEK, V. S.: Survival of, and root colonization by, alginate – encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following introduction into soil. *Biol. Fertil. Soils*, 14, 1992: 14–22.
- VASSILEV, N. – VASSILEVA, M.: Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. *Mycol. Res.*, 96, 1992: 563–570.
- WANG, F. F. – SHAW, J. F. – WU, C. R. – WANG, Y. J.: Microencapsulation with poly (Vinyl Amine) and alginate. *Biotechnol. Techn.*, 6, 1992: 185–188.
- VIVES, C. – CASAS, C. – GODIA, F. – SOLA, C.: Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in Ca-alginate beads and observations on their growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 1992: 467–472.
- WOLTERS, G. H. J. – FRITSCHY, W. M. – GERRITS, D. – VANSCHILFAGAARDE, F.: A Versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. *J. Appl. Biomater.*, 3, 1992: 281–286.
- WOODWARD, J. – CAPSS, K. M.: Cellobiose hydrolysis by glutaraldehyde-treated beta-glycosidase entrapped in propylene glycol alginate bone gelatin spheres – Scientific Note. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 34, 1992: 341–347.
- YAMAMOTO, K. – KUMAGAI, H. – SAKIYAMA, T. – SONG, S. M. – YANO, T.: Inhibitory activity of alginates against the formation of calcium phosphate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 1992: 90–93.
- ZAKARIA, Z. – RAZAK, C. N. A. – AMON, K. – BASRI, M. – YUNUS, W. M. Z. – SHIRAI, Y. – SALLEH, A. B. – HASHIMOTO, K.: Optimum conditions for the production of lipase by alginate-immobilized bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38, 1993: 429–438.
- ZEKORN, T. – SIEBERS, U. – HORCHER, A. – SCHNETTLER, R. – ZIMMERMANN, U. – BRETZEL, R. G. – FEDERLIN, K.: Alginate coating of islets of langerhans – *in vitro* studies on a new method for microencapsulation for immunoinolated transplantation. *Acta Diabetol.*, 29, 1992: 41–45.

Došlo 2. 6. 1994

*Kontaktní adresa:*

Doc. ing. Miroslav Jan k o v s k ý, CSc., Česká zemědělská univerzita, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika  
Tel. 02/338 27 17, fax 02/34 44 18

## POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrové i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzivy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení 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 a kvalitě práce. Redakce přijímá práce improvaně vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

**Vlastní úprava práce** rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

**Název práce (titul)** nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

**Krátký souhrn (Abstrakt)** musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými věty, nikoliv heslovitě.

**Rozšířený souhrn** prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (většinou názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

**Literární přehled** má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informaci, proč byla práce provedena.

**Metoda** se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál a způsob hodnocení výsledků.

**Výsledky** tvoří hlavní část práce a při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

**Diskuse** obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

**Literatura** musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvích autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

**Klíčová slova** mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslem telefonu a faxu, popř. e-mail.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper. The editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

**Manuscript layout** shall correspond to the State Standard ČSN 88 0220 (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

**Abstract.** It must present information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes and comprise base numerical data including statistical data.

**Introduction** has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

**Review of literature** should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

**Discussion** contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. **References** in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

**Key words** should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number, or e-mail.

# VETERINARY MEDICINE – CZECH

---

Volume 41, No. 5, May 1996

## CONTENTS

Bíreš J., Bartko P., Weissová T., Michna A., Matišák T.: Goat iodopenia as a cause of congenital struma in kids.....	133
Kušev J., Jantošovič J., Šály J., Kozák M.: The effect of vitamin E on the quality of fat component of broiler chicken meat.....	139
Hámpel J., Franz J., Štěpánek J., Toman M.: Enhancement of antibody response to bovine herpesvirus 1 with non-specific immunostimulants.....	143
Juriš P., Tóth F., Lauková A., Plachý P., Dubinský P., Sokol J.: Survival of model bacterial strains and helminths eggs in the course of mesophilic anaerobic digestion of pig slurry.....	149
SHORT COMMUNICATION	
Bomba A., Nemcová R., Kaštel R., Herich R., Pataky J., Čížek M.: Interactions of <i>Lactobacillus</i> spp. and enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> under <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> conditions.....	155
REVIEW ARTICLE	
Jankovský M.: Immobilization in alginate gels .....	159

## VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

---

Ročník 41, č. 5, Květen 1996

## OBSAH

Bíreš J., Bartko P., Weissová T., Michna A., Matišák T.: Jódopénia kôz príčinou kongenitálnej strumy u kozliat .....	133
Kušev J., Jantošovič J., Šály J., Kozák M.: Vplyv vitamínu E na kvalitu tukovej zložky mäsa brojlerových kurčiat .....	139
Hámpel J., Franz J., Štěpánek J., Toman M.: Zvyšovanie protilátkovej odpovedi proti viru BHV-1 nespecifickými imunostimulačnými látkami.....	143
Juriš P., Tóth F., Lauková A., Plachý P., Dubinský P., Sokol J.: Prežívanie modelových bakteriálnych kmeňov a vajíčok helmintov v priebehu anaeróbnej stabilizácie tekutých experimentov ošipanych .....	149
KRÁTKÉ SDĚLENÍ	
Bomba A., Nemcová R., Kaštel R., Herich R., Pataky J., Čížek M.: Efekt <i>Lactobacillus</i> spp. proti enteropatogénnym <i>E. coli</i> v podmienkach <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> .....	155
PŘEHLED	
Jankovský M.: Imobilizace v alginátových gelech .....	159

---

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41, fax: 02/25 70 90 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bř. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1996

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2