Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Praha Uhříněves

Ministerstvo zemědělství ČR
Vědecký výbor výživy zvířat

SOUČASNÉ POZNATKY VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT VE VZTAHU K BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ A K ŽIVOTNÍMU PROSTŘEDÍ

2012

Sborník z konference

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i.
Praha Uhříněves

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ ČR
VĚDĚCKÝ VÝBOR VÝŽIVY ZVÍŘAT

MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

SOUČASNÉ POZNATKY VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT VE VZTAHU K BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ A K ŽIVOTNÍMU PROSTŘEDÍ

Sborník z konference

18. května 2012

Praha Uhříněves

ISBN 978-80-7403-095-6

OBSAH

EFSA slaví 10. výročí své existence **5**
Ing. Petr Beneš

Nanotechnologie a jejich význam v krmivářském průmyslu - význam doporučení EFSA pro ČR **8**
Dr. Ing. Pavel Tvrzník, a kol.

Rostliny s antinutričními a toxickými látkami vyskytující se potenciálně v pícninách v ČR **14**
doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc., Ing. Bohumír Šimerda

Probiotika ve výživě telat **20**
doc. Ing. Eva Vlková, Ph.D. a kol.

Problematika fosforu v praktickém chovu slepic **25**
prof. Ing. Miloš Skřivan, DrSc.

Stravitelnost kyseliny fytové a fytasová aktivita u drůbeže **27**
prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.

EFSA SLAVÍ 10. VÝROČÍ SVÉ EXISTENCE

Ing. Petr Beneš

Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor bezpečnosti potravin, Těšnov 17, 117 05 Praha 1

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority – EFSA) hraje již od roku 2002 klíčovou roli při hodnocení rizik v oblastech bezpečnosti potravin a krmiv v Evropské unii. Využijme této příležitosti ke krátkému ohlédnutí za uplynulými deseti lety činnosti EFSA, během kterých Úřad aktivně podporoval rozhodování orgánů EU v oblasti veřejného zdraví rozsáhlou vědeckou činností a přispěl tak k ochraně evropských spotřebitelů. Připomeňme si, jaké byly důvody vzniku EFSA v roce 2002, kam směřuje a jaký je jeho vztah k oblasti výživy zvířat.

Vznik a vývoj EFSA

Ustavení EFSA v roce 2002 bylo reakcí na celou řadu potravinových krizí v Evropě (dioxiny, BSE) a bylo součástí celkové rekonstrukce přístupu Evropské unie k ochraně obyvatel před možnými riziky souvisejícími s potravinovým řetězcem. Nový systém zajištění bezpečnosti potravin v EU byl vystaven na principu nezávislosti hodnocení rizik (risk assessment) na řízení rizik (risk management) s tím, že veškerá rozhodování musí být vědecky podložená.

Prvotním úkolem Úřadu bylo vytvořit vlastní vnitřní strukturu nezbytnou pro úspěšné zvládnutí svěřených úkolů. Jejím základem jsou vědecké panely a vědecký výbor, sestavené z nezávislých odborníků vybraných na základě jejich odborných znalostí a zkušeností. Klíčovou oblastí se pro další rozvoj stala spolupráce s členskými státy, bez jejichž významné spolupráce by EFSA nemohl existovat. Důležitou roli v tomto ohledu hrají Poradní sbor, jenž tvoří zástupci jednotlivých členských států a v roli pozorovatelů také zemí kandidátských a Focal Points (česky „koordinační místa pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA“ – v ČR zajišťuje jeho činnost Úřad pro potraviny - Odbor bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství), jejichž úkolem je podporovat členy Poradního sboru a zajišťovat oboustrannou spolupráci a komunikaci mezi EFSA a organizacemi a jednotlivci v členských státech.

Intenzivně se v uplynulých deseti letech také rozvíjela spolupráce mezi EFSA a vědci či vědeckými institucemi. Již více než 3 tisíce vědců z celého světa bylo zařazeno do Databáze expertů EFSA (34 z ČR) a téměř 400 vědeckých institucí z celé EU spolupracuje s EFSA podle čl. 36 (Nařízení EP a Rady č. 178/2002). Členské státy také sdílejí své vědecké výstupy prostřednictvím Platformy na výměnu informací (Information Exchange Platform – IEP). Za tři roky existence bylo do IEP vloženo již téměř 1000 dokumentů.

Jak se v uplynulých deseti letech vyvíjela EU (počet členských států vzrostl z 15 na 27, počet obyvatel vzrostl až na 490 mil.), zvýšil se i objem úkolů, kterými se EFSA musí zabývat. Současně se intenzivně vyvíjela i oblast výzkumu a výroby potravin a v té souvislosti se objevila nová témata – např. GMO, nanotechnologie. Změnám ve svém okolí se nutně musel přizpůsobit i EFSA. V roce 2011 došlo ke změně organizační struktury EFSA, která nyní lépe odpovídá skutečným potřebám Úřadu a současně přispěje ke zvýšení efektivity jeho práce.

Během 10 let své existence EFSA

- ✓ poskytoval vědecké poradenství, jež přispělo ke snížení výskytu případů salmonelózy v EU o téměř 50 % mezi lety 2004 a 2009;
- ✓ posoudil více než 3000 zdravotních tvrzení, čímž přispěl k ochraně zájmů spotřebitelů před klamavým označováním potravinářských produktů a nepravdivou reklamou;
- ✓ opětovně zhodnotil bezpečnost většiny potravinářských barviv schválených k používání v EU v rámci úkolu přehodnotit bezpečnost potravinářských aditiv;
- ✓ každoročně analyzoval data o zoonózách a antimikrobiální rezistenci u zvířat a v potravinách poskytnutá členskými státy, jakož i data o expozici spotřebitelů reziduím pesticidů;
- ✓ vyvinul celou řadu vodítek pro žadatele předkládající žádosti o schválení regulovaných produktů (např. doplňkových látek v krmivech) a také vodítka pro hodnocení rizik v různých oblastech (např. nanotechnologie);
- ✓ zveřejnil více než 2500 vědeckých výstupů, jež byly základem pro rozhodování v oblasti bezpečnosti potravin a krmiv;
- ✓ soustředil více než 1500 nezávislých odborníků pro hodnocení rizik;
- ✓ implementoval jeden z nejrobustnějších systémů k zajištění nestrannosti vědeckého poradenství, což bylo potvrzeno nezávislým srovnáním;
- ✓ zvýšil počet zaměstnanců z 30 v roce 2002 na 450;
- ✓ vyvinul struktury pro efektivní spolupráci a výměnu informací mezi všemi členskými státy a navázal efektivní spolupráci se všemi zúčastněnými subjekty (stakeholders);
- ✓ úzce spolupracoval s dalšími organizacemi EU (ECDC, EMA, ECA) a také mimo EU, ve snaze rozvíjet celosvětově spolupráci v oblasti hodnocení rizik.

Role EFSA v oblasti výživy zvířat

EFSA se při své činnosti věnuje také krmivům a jejich bezpečnosti. Ve spolupráci s Evropskou komisí provádí Vědecký panel pro přídatné látky nebo látky přidávané do krmiv (FEEDAP Panel) hodnocení bezpečnosti každého nového aditiva, které je předloženo ke schválení. Společnosti, jež zamýšlí uvést takovou látku na trh, podávají EFSA příslušnou žádost obsahující podrobnou specifikaci aditivní látky, podmínky použití, kontrolní metody a data demonstrující její účinnost a bezpečnost. Členové Panelu předloženou žádost a poskytnutá data přezkoumají s ohledem na zdraví zvířat a lidí. Zkoumají se také dopady na životní prostředí, vč. posouzení možnosti vlivu reziduí na půdu, podzemní a povrchové vody. Současně, Referenční laboratoř Společenství (v tomto případě JRC) posuzuje analytické metody používané k určení přítomnosti aditiva v krmivu a jeho případných reziduí v potravině.

Dalším úkolem EFSA ve vztahu k výživě zvířat je provádět hodnocení rizik ve specifických oblastech, jako jsou kontaminace krmiv v EU regulovanými produkty (např. kokcidiostatika, GMO) nebo zakázanými produkty (složky živočišného původu). V těchto specifických oblastech se na hodnocení bezpečnosti podílí i další vědecké panely EFSA, konkrétně Vědecký panel pro GMO (GMO Panel), Vědecký panel pro kontaminanty (CONTAM Panel) a Vědecký panel pro biologická rizika (BIOHAZ Panel).

V obecné rovině je FEEDAP Panel autorem celé řady vodítek pro vyjasnění vědeckého přístupu k hodnocení rizik krmných aditiv. K 30. 4. přijal v roce 2012 již 31 vodítek a vědeckých stanovisek, jež jsou dostupná na webových stránkách Úřadu. Celkově jich za dobu existence EFSA bylo již více než 350.

Kam EFSA směřuje?

Za deset let existence EFSA se svět změnil. V současné době Úřad čelí novým výzvám a očekáváním, souvisejícím např. s demografickými a klimatickými změnami a také s globalizací obchodu. EFSA se vyvinul v organizaci schopnou řešit komplikovaná témata, aniž by přestal vnímat detaily. Ostatně, Strategický plán 2009 – 2013 i Vědecká strategie 2012 - 2016 zdůrazňují, že se Úřad bude stále více zabývat multi-disciplinárním poradenstvím v oblastech, jako je zdraví a výživa zvířat. EFSA bude nadále rozvíjet proaktivní přístup k identifikaci a hodnocení nově se objevujících rizik, což bude vyžadovat více spolupráce s členskými státy a organizacemi EU.

Autorita Úřadu je založena na důvěře evropských spotřebitelů a spolupracujících organizací v kvalitu práce EFSA, tedy v úroveň vědecké podpory pro přijímání opatření evropskými manažery rizika. Tato důvěra je současně odrazem toho, jakým způsobem EFSA během deseti let své existence dokázala zavést hodnoty, na kterých byla založena: vědeckou excelenci, schopnost reagovat na podněty, nezávislost, transparentnost a otevřenost.

Oslavy 10. výročí

V průběhu roku 2012 bude EFSA u příležitosti svého jubilea organizovat, ať samostatně, či ve spolupráci s členskými státy, celou řadu odborných akcí. Vrcholem oslav bude vědecká konference v listopadu v Parmě, jíž by se podle očekávání mělo zúčastnit na 500 účastníků z celého světa. Tato konference bude zaměřena na představení klíčových oblastí nové vědecké strategie EFSA.

Také Česká republika se připojí k oslavám 10. výročí existence EFSA a to organizací konference o komunikaci a vnímání rizika spotřebiteli, která se uskuteční na podzim 2012. Na její organizaci bude Koordinační místo pro spolupráci s EFSA České republiky spolupracovat s kolegy z Kontaktného bodu Slovenskej republiky pre EFSA, který je součástí tamějšího Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka. Cílem konference bude diskuse o významu včasné, přesné a vědecky podložené komunikace o tématech v oblasti bezpečnosti potravin a také o nutnosti vzdělávání spotřebitelů.

V rámci internetových stránek www.bezpecnostpotravin.cz byla vytvořena samostatná sekce „10. výročí založení EFSA“, ve které budou průběžně zveřejňovány související informace.

Přejme EFSA do dalších deseti let existence hodně úspěchů při řešení zadaných úkolů, aby neztratil odhodlání zajistit bezpečnost evropských potravin.

NANOTECHNOLOGIE A JEJICH VÝZNAM V KRMIVÁŘSKÉM PRŮMYSLU - VÝZNAM DOPORUČENÍ EFSA PRO ČR

[1]Dr. Ing. Pavel Tvrzník, [2]Mgr. Ing. Eva Mrkvicová, Ph.D., [2]prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc., [2]prof. Ing. Ladislav Zeman, CSc.

[1]MIKROP ČEBÍN a.s., Čebín 416, 664 23

[2]Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Od roku 2004 do roku 2011 se výskyt slov nanotechnologie a nanomateriály v odborném tisku zvýšil asi 8x, podle naší analýzy 20 odborných časopisů. Z toho je zřejmé, že česká odborná společnost považuje oblast nanotechnologií za zajímavou a vhodnou k řešení. Oblast zemědělství byla a je s tímto slovním spojením jen ve velmi malé souvislosti. Mnohem častěji se tato slova vyskytují v biomedicínském výzkumu. Nejčastěji se výrazy nanotechnologie a nanomateriály vyskytují v souvislosti s elektronikou a počítači a pro většinu lidí je toto slovní spojení synonymem pro tento obor.

V roce 2010 vzbudila pozornost nejen odborné, ale i laické veřejnosti informace o zveřejněné zprávě Výboru pro vědu a technologii britské Sněmovny lordů zaměřené na aplikaci nanotechnologií při výrobě potravin (existuje ještě i předchozí zpráva o této problematice z roku 2004). Také EFSA se věnovala v roce 2011 této problematice s cílem zajistit co nejlepší postupy při zavádění nanotechnologických metod a postupů do potravinářské či krmivářské praxe.

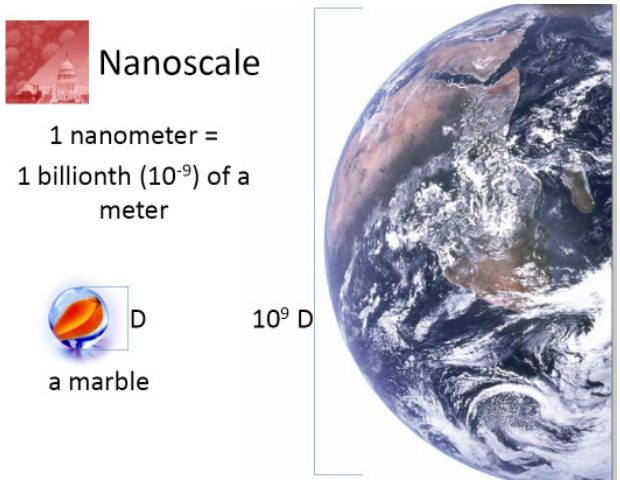
Ve své zprávě nazvané „Nanotechnology and Food“ Výbor uvádí, že průhlednost a čestnost jsou klíčovými složkami zajišťující víru veřejnosti jak v bezpečnost potravin, tak v rozvoj vědy a technologií. Tvrdí se zde též, že současná malá ochota potravinářských firem k zveřejňování informací o probíhajícím výzkumu aplikace nanomateriálů a nanotechnologií v potravinách, může vést k negativní reakci veřejnosti (PRNKA, 2012).

Zpráva zdůrazňuje, že existují významné mezery ve znalostech o mechanismech, kterými nanomateriály atakují lidský organismus, a proto **není** v současné době **možné předvídat možná rizika škodlivého působení** jednotlivých nanomateriálů. Řešením je podpora koordinovaného výzkumu rizik státem. Výbor také navrhl, aby pro zlepšení informování veřejnosti agenturou FDA (Food Standards Agency) se zřídil veřejně přístupný registr potravin a potravinářských obalů obsahujících nanomateriály. Výbor je toho názoru, že takové opatření bude více přispívat k orientaci veřejnosti než např. požadavek, aby všechny potraviny obsahující nanomateriály byly speciálně označeny.

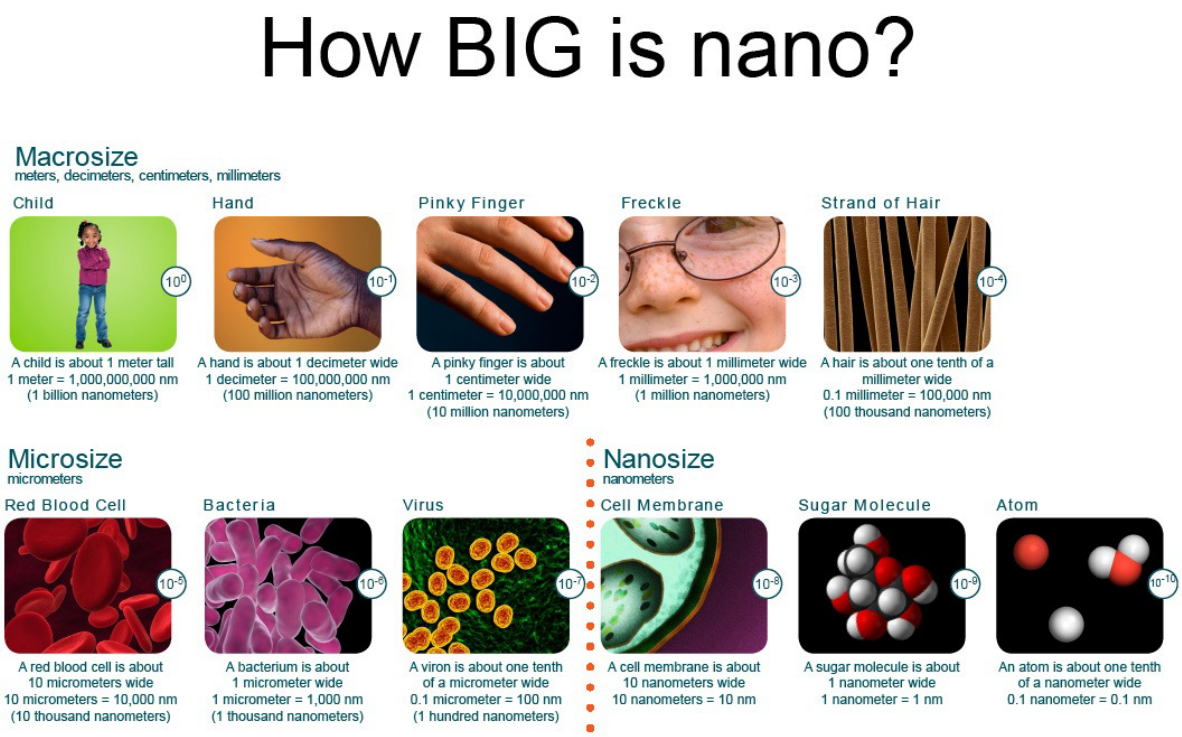
Definice nanomateriálů

Nanomateriály jsou částice o velikosti 1-100 nanometrů. Čistě geometricky má předpona "nano" (řecky: trpasličí) velikost, která je 1000 krát menší než stávající mikrometr (1nm odpovídá miliontině mm). Jeden nanometr (jedna miliardtina metru) je délka jedné malé molekuly. Nejčastěji se k tomu používají částice zlata, stříbra a mědi. Koloidní stříbro je dnes nejvíce využíváno vzhledem k jeho vlastnostem a to je dobrá vodivost, chemická stálost a katalytická a antibakteriální aktivita.

Podle všeobecného informačního zdroje (Wikipedia.com) se jako **nanotechnologie** obecně označuje technický obor, který se zabývá tvorbou a využíváním technologií v měřítku řádově nanometrů (obvykle cca 1–100 nm), tzn. 10^{-9} m (miliardtiny metru), což je přibližně tisícina tloušťky lidského vlasu. Pro názornou ukázku o jaký se asi jedná rozměr ukazují následující obrázky (zdroj: Agriculture, USDA)



Z obou obrázků a jejich měřítka je zřejmé, že se jedná o velmi malé subjekty zkoumání.



Nanomateriály se v krmivářském průmyslu vyskytují jednak jako součást obalových materiálů (různé pytle na skladování aditiv a krmiv), jako dobré skladovací obří vaky, jako ochranné prostředky pro obsluhu, jako nosiče nebo markery látek užívaných ke krmení zvířat. Jako cílený nosič, přenášející určité druhy aditiv se mohou uplatnit například při posílení imunitního systému zvířat.

Historie

Jako jeden ze zakladatelů nanotechnologie (třebaže ještě nepoužil toho slova) je označován Richard Feynman, který základní myšlenky představil ve své slavné přednášce nazvané *Tam dole je spousta místa* (*There's Plenty of Room at the Bottom*), kterou v roce 1959 přednesl na výroční schůzi Americké společnosti fyziků pořádané na Caltechu. V 70. letech 20. století americký inženýr **Kim Erik Drexler napsal text týkající se** nanotechnologií „*Stroje stvoření*“, v němž líčil svět miniaturních „assemblerů“, jak tyto stroje nazýval, které se mají umět samy rozmnožovat, přestavovat, zdokonalovat, opravovat, navzájem komunikovat a skládat ve větší celky. Předpověděl tím vznik nanorobotů a jejich použití a to

jen na základě svých znalostí a tehdy nových poznatků o funkci DNA. **Nanorobot** je nanotechnologický stroj o velikosti několika nanometrů (miliontin milimetru). Jen pár nm široké motory, robotické ručičky, které mohou hýbat i pouhými atomy (www.wikipedia.com).

1) Medicínské nanotechnologie – jedná se o lehce odbouratelné nanoobaly, nanostroje, nanovlákna v tkáňovém inženýrství (zkouší se náhrady kostní tkáně, kloubních chrupavek, šlach, svalů, kůže a dokonce i nervové tkáně).
2) Nanoroboti – nanotechnologické stroje (či nanoroboti) využívající i jiné než biochemické principy, pokud budou použity například v rámci diagnostiky nebo chirurgického zásahu.
3) Textilní nanotechnologie – např. goretex- látka propustná pro vodní páry, ale nikoliv pro vodu v kapalném skupenství. Přidání nanočástic některých kovů, např. stříbra do hmoty před výrobou textilního vlákna. Vyrobená příze získává další vlastnosti jako například antibakteriálnost.
4) Akumulátorové nanotechnologie – pomocí uhlíkových nanotrubiček a papírové hmoty napuštěné tekutou solí je možné sestavit akumulátor či kondenzátor (viz http://www.zive.cz/clanky/nanotechnologie-papirove-baterie-pro-elektroniku/sc-3-a-137632/default.aspx).
5) Antibakteriální účinnost – například pomocí ultratenkých povrchových úprav. Podle zdroje (http://www.debold.cz/antibakterialni-ochrana-2) je jednou z velmi důležitých oblastí využití nanotechnologií účinnost proti bakteriím. Antibakteriální ochrana - jednou z důležitých a řekněme převratných funkcí ultratenkých povrchových úprav je, že dokážou ničit bakterie. Tento stav nastává následovně. Vrstva SiO_2 je nastavena silně kationicky, proto vykazuje antibakteriální účinky. Vzhledem k této vlastnosti vede v důsledku iontově výměnných reakcí s buněčnými stěnami mikroorganismů k oslabení buněčných stěn. Tím dochází k zamezení buněčného dělení a mikroorganismus již nemůže dále růst.

Vědecké práce ukazují i na vážná zdravotní a ekologická rizika nanotechnologií. **Nanočástice mohou zabíjet rybí embrya -** Otčenášková (2010) popisuje situaci, kdy nanočástice mohou zabíjet rybí embrya. Stříbrné nanočástice se s úspěchem začaly používat jako prostředek k hubení bakterií. Podle nové studie ale mohou být nebezpečné pro některé vodní živočichy. Nanočástice vyrobené ze stříbra jsou populární součástí materiálů pro výrobu outdoorového prádla, které nezapáchá ani po několika dnech nošení, a najdeme je i v detergentech a prostředcích určených k likvidaci bakterií. Dopad stříbrných nanočástic na životní prostředí ale není příliš prostudován a jejich používání omezuje jen několik málo předpisů. Vědci testovali účinky roztoků stříbrných nanočástic na různých vývojových stádiích rybek střevlí *(Pimephales promelas)*. To může vyvolat závažné malformace včetně krevních výronů do hlavy a otoků, které vedou k úhynu rybích larev. (Zdroj: Purdue University).

Nanoapokalypsa - Vize uskutečnění nanotechnologie samozřejmě hrozí i totální apokalypsou. Roboti by mohli přestat poslouchat, nebo by lidé začali konstruovat nanorobotické viry.

Propagátor nanotechnologií, Američan Richard Errett Smalley, roku 2003 skepticky prohlásil, že naděje nanorobotů „*je iluzorní*“. Tento skvělý futurolog v roce 1996 získal Nobelovu cenu za objev fullerenů, nového druhu kulovitých molekul, které se staly základem dnešních nanotechnologických materiálů.

Nanomateriály mají zvláštní vlastnosti, které se liší od vlastností téhož materiálu v makrosvětě. Čím jsou částice menší, tím větší je nepoměr v množství atomů, které leží na povrchu (a mnohou reagovat s prostředím), k množství atomů, které jsou skryty uvnitř nanočástice. Například v částici o velikosti 30 nm je 5 procent z atomů na povrchu, u 10 nanometrů je to už 20 procent a 50 procent u částice velikosti 3 nanometrů. Protože chemické reakce vždy probíhají na povrchu materiálů, jsou nanočástice

proto mnohem reaktivnější, než větší částice stejného materiálu. Navíc tato vlastnost může být také markantně ovlivněna tvarem nanočástice, takže nanoplátky, či nanotrubičky patřičné velikosti budou mít většinu atomů na svém povrchu a tudíž připravených k okamžité chemické reakci.

Význam pro zemědělství

V jakých oblastech můžeme v nejbližší době očekávat přínos z oboru nanovědy:

1) **Bezpečnost potravin a biobezpečnost** - Nanosenzory pro detekci patogenů a kontaminantů mohou pomáhat vyrábět, zpracovávat a transportovat potraviny mnohem bezpečněji než dosud. Tyto malé částečky mohou napomáhat při kontrole kvality potravin. Nanosenzory mohou detekovat patogeny mnohem dříve a bezpečněji, než tomu bylo v minulosti. Již před 4 roky Na Li aj. (2008) vyvinuli rychlou metodu, kterou dokázali detekovat melamin v mléce pomocí nanočástic na bázi zlata (tzv. nanozlato). Při pozorování kontaminovaných vzorků, pak mléko s doplňkem melaminu se zbarvuje do fialova. Při nemoci šílených krav (BSE) dokázal prof. Craighead z Cornell University pomocí nanoscalovatelného rezonátoru (Scanning electron micrograph of the nanoscale resonator - o velikosti 16 mikrometrů) detekovat nemoc dříve a rychleji než dosavadní postupy.
2) **Materiálové vědy** – celá škála materiálu citovaných v použité literatuře.
3) **Zpracování potravin a vývoj nových produktů** – příkladem může být **balení mléka do inteligentních obalů**, které pomocí zabudovaných senzorů zbarví obal při kontaminaci nebo porušení skladovacích podmínek odlišně. Jako senzory v této oblasti se nabízejí teplota, čerstvost, vyzrálost, aj. Při demonstraci pro veřejnost je vidět „mléko čerstvé“ v obalu modré barvy a „mléko narušené“ v tomtéž obalu barvy nahnědlé. Jiným příkladem mohou být **plastikové obaly** obsahující stříbrné nanočástice (které jsou antimikrobiální), které uchovávají potraviny v čerstvém stavu mnohem déle než obvyklé obaly. Prof. Tzeng z Clemson University experimentoval s kuřaty, která dostávala v krmivu nanočástice (ty se vázaly na patogeny a způsobily jejich nefunkčnost v trávicím traktu drůbeže). Kuřata takto chovaná byla zdravější a bezpečnější pro výživu člověka. Otázka je, co bude dál? Podle „European Nanotechnology Gateway forum“ se lze domnívat, že v budoucnu bude ideální spojení nanobiosenzorů s GPS (Global position system) pro monitorování úrody v reálném čase. Existuje případ (vinice Pickberry v Sonoma County, California), kdy nanobiosenzory kontinuálně informovaly o vlhkosti, síle větru, vodě v půdě a teplotě. Majitel pak mohl reagovat závlahou a postřiky na situaci a následně zvýšit výnos. Jiný případ je využití nanostrukturovaného oxidu hliníku (NSA) v procesu úpravy jadrných krmiv a následně včasnému varování při výskytu škodlivého hmyzu (Prof. Weaver, Montana State University). Nanomateriály již pronikly i do aplikací hnojiv (obalovaných) a v této oblasti brzy budou nenahraditelné. Typický občan českého státu se asi nejvíce potěší zprávou **o možnosti udržet pivo v čerstvém** (vynikajícím) **stavu** v plastových nádobách, místo 11 týdnů, déle jak 30 týdnů. Také v tomto případě aplikace nanouhlíkatých sloučenin zabránila oxidaci a barva a kvalita piva nedoznala žádných změn. Degustační zkoušky neprokázaly chuťové rozdíly. Izraelská firma Sherman Idustries prodává „Canola Active **Oil**“, v němž jsou rozpuštěny mikrokapsle vitaminů, minerálií a nebo fytochemické látky, které se nerozpustí v oleji a člověk může konzumovat vitaminy i ve smažených potravinách (např. francouzské brambůrky). **Zmrzlina** je vlastně podchlazená emulse mléčného tuku a vody. Jak koloidní tuk disperguje, rozhoduje o kvalitě a chutnosti. Teoreticky by se mohl snížit nanočásticemi tukové emulse obsah lipidů ve zmrzlině z dnešních 8-16 % na asi 1 % a přitom by zákazník nepoznal chuťový rozdíl.

EFSA – Zemědělství a potraviny

S přítomností nanočástic v potravinářském průmyslu se setkáváme stále častěji a jejich užití má nejen vášnivé příznivce, ale i zaryté odpůrce. Výzkumní pracovníci chtějí nanotechnologie použít v udržitelné produkci potravin, při redukci znečištění životního prostředí, při rychlejší a přesnější diagnostice, v nových léčebných technikách, aj.

Nanotechnologie mohou pomoci zlepšit množství, kvalitu a trvanlivost potravin, např. hovězího masa. Tyto speciální vlastnosti umožňují využití nanočástic v různých „atraktivních“ oborech: od mikroelektroniky k medicíně, ale také při docela „obyčejné“ výrobě potravin. I když většina zamýšleného využití nanotechnologií v potravinářské výrobě je stále ještě v oblasti výzkumu. Ale na zavedení některých aplikací zřejmě nebudeme muset dlouho čekat. Odborníci předpovídají, že dojde k jejich využití ve všech fázích výroby potravin, a to od primární produkce (v zemědělství a zahradnictví), až po aplikace ve zpracovatelském (potravinářském) průmyslu.

Využití nanotechnologií může přispět k produkci bezpečnějších a zdravějších potravin a také jejich výroba může být mnohem šetrnější k životnímu prostředí. Potravinářské přísady zabalené do vhodně zvoleného nanoobalu by mohly nejen zlepšit chuť, strukturu a soudržnost potravin, ale také zvýšit jejich stabilitu a tím značně prodloužit trvanlivost potravin.

EFSA vědoma si rizika a výhod z nanomateriálů se rozhodla v roce 2011 k tomu zaujmout stanovisko a definovat způsoby, jak bude povolování nových materiálů regulovat a kontrolovat. Pro budoucnost je asi toto rozhodnutí velmi cenné a budeme jistě svědky toho, že se tato směrnice bude měnit a upravovat v souvislosti s novými poznatky. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) již v roce 2009 navrhl pro posuzování rizika při používání nanomateriálů využívat stejný systém, jaký je používán pro klasické potraviny. Vědecké posouzení rizika potenciálního nebezpečí probíhá ve čtyřech krocích:

1. identifikace možného nebezpečí
2. charakterizace nebezpečí
3. hodnocení expozice
4. charakterizace rizika

V současné době existuje jen velmi málo údajů o expozici nanomateriálů a s tím související toxicitou. Nebylo by správné vyvozovat závěry o toxicitě nanomateriálů z údajů o vlastnostech materiálů v „ne-nano formě“. Chování a reaktivita jsou v mnohých případech naprosto odlišné.

EFSA doporučuje zaměřit se na sběr většího množství dat, na vytvoření vhodných testovacích metod a zpracování specifických studií za účelem získání dalších znalostí pro lepší možnosti posouzení rizika nanočástic. Dobré reference jsou při posuzování bezpečnosti nanomateriálů nezbytným předpokladem pro schválení jejich využití v potravinářském průmyslu (Marcinková a Beran, 2011).

Závěry

Nanotechnologie se budou v zemědělství využívat a je jen otázkou času, zda se i naše podniky, firmy, potravinářské či krmivářské společnosti do tohoto programu zařadí. EFSA jako kontrolní orgán zatím správně nastavila pravidla monitoringu, kontroly a legislativy.

Použitá literatura

Zpráva Food Safety Authority of Ireland „The Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industries“, 2008.

Zpráva European Food Safety Authority "The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies onFood and Feed Safety", February 2009.

Stránky Informačního centra bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství České republiky. Na stránce najdete různé informace o nanotechnologiích a nanomateriálech v souvislosti s jejich používáním v potravinářství. Stránku spravuje Ing. Alexandra Kvasničková. www.bezpecnostpotravin.cz

Zpráva „Aplikace nanotechnologie v potravinářství“, kterou v lednu 2008 zpracovala Ing. Alexandra Kvasničková. Zpráva je stále velmi aktuální.

Zpráva evropské informační sítě Nanoforum „Nanotechnology in Agriculture and Food" 4/2006, zpracovali J.Tiu a M. Morrison.

Zpráva PEN (Project on Emerging Nanotechnologies) „Nanotechnology in Agriculture and Food Production – Anticipated Applications“, 9/2006, zpracovali J. Kuzma a P. VerHage.

Zpráva FoE (Friends of Earth) „Out of the Laboratory and on to Our Plates – Nanotechnology in Food and Agriculture“, 4/2008, zpracovali G.Miller a R.Senjen.

Zpráva "FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications", Řím, 6/2009.

Otčenášková M.: Nanočástice mohou zabíjet rybí embrya [online]. Český rozhlas, 2010-3-3, [cit. 2010-03-04]. Dostupné online. (čeština).

Materiály zveřejněné na http://www.nanotechnologie.cz/ zejména jednotlivé roční zprávy zpracovávané kolektivy autorů: Prnka T., Shrbená J., Šterlink K., Blažka M., Hronek F., Chvojka M. a dalších.

Hošek, J.: Úvod do nanotechnologie, ČVUT v Praze, Fakulta strojní, skriptum, dostupné http://www.nanotechnologie.cz/storage/Hosek_Nanotechnologie_2010.pdf a z https://eobchod.cvut.cz/

ANONYM1: http://nanomedicina.sweb.cz/#1

ANONYM2: Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed. EFSA Journal 2011; 9 (5), 2140 [36 pp.].

ANONYM3: www.bezpecna-krmiva.cz stránka popisuje oblast krmivářské legislativy a částečně se věnuje i nanotechnologiím.

Další citace jsou uvedeny přímo v textu.

Práce byla zpracována s podporou projektu VZMSM 6215648905

ROSTLINY S ANTINUTRIČNÍMI A TOXICKÝMI LÁTKAMI VYSKYTUJÍCÍ SE POTENCIÁLNĚ V PÍCNINÁCH V ČR

[1]doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc., [2]Ing. Bohumír Šimerda

[1]Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

[2]Delacon Biotechnik ČR spol. s r. o., ., Bohdíkovská 2438/7, 787 01 Šumperk

Při běžném procesu zpracování čerstvých travních porostů, sena, siláže a vegetabilních granulátů nelze zpravidla zabránit určité kontaminaci těchto zdrojů, způsobené neúmyslnou přítomností některých rostlin, které jsou běžnou součástí lučních ekosystémů (často zanedbaných špatnou sečí), obsahujících však látky působící antinutričně, anebo toxicky. Tato toxicita může být jak potenciální (projeví se výrazně jen v případě oslabených zvířat nebo chovů), nebo reálná (manifestující svůj účinek zcela jednoznačně). Pokud při hodnocení těchto vegetabilních zdrojů nemá zainteresovaný personál dostatečnou zkušenost a znalosti a pokud je obsah těchto rostlin ve zpracovávané surovině vyšší než ~2 %, může dojít k pozorovatelnému negativnímu ovlivnění bezpečnosti krmivového řetězce. Účinky mohou být tiché – od antinutričních efektů, způsobujících nedokonalé využití krmné dávky, přes ovlivňování důležitých biochemických procesů v průběhu intermediárního metabolismu zvířat až po výraznou a markantně pozorovanou toxicitu, doprovázenou někdy i morfologickými změnami zvířecího těla, především u potomstva; některé toxické látky významně ovlivňují reprodukční aparát anebo plod. Zpravidla bývá matoucí, že některé rostliny jsou toxické v čerstvém stavu, po silážování anebo usušení se jejich toxicita ztrácí (jindy však se může po zapaření významněji objevit), nebo se v případě některých zvířat toxicita neprojeví, zatímco u jiných zvířat je dobře pozorovatelná (přežvýkavci x nepřežvýkavci). S tímto negativním ovlivněním krmivového řetězce však velmi úzce souvisí ovlivnění potravního řetězce, protože některé metabolity toxických látek mohou negativně ovlivňovat organoleptické vlastnosti konečných produktů a snižovat tak kvalitu potravin, anebo být dokonce toxičtější pro člověka než pro zvířata.

Pro poznání rizik, spojených s přechodem toxických rostlin do krmiva, resp. rostlin, které se v zemědělské praxi mohou jevit jako problematické, je vhodné mít dostatečné množství informací na odborné úrovni současné doby, které budou pro uživatele fungovat jako základní zdroj umožňující kvalifikovanou a rychlou orientaci v problému a zároveň bude zřejmé, jaký postup zvolit v případě nálezu potenciálně toxické rostliny. V uvedených případech je pro běžného terénního pracovníka důležité, aby provedl odpovídajícím způsobem odběr vzorku, správně jej uskladnil, transportoval a přiložil formulář, který bude se vzorky odeslán na místo identifikace. Kvalitní zpracování formuláře významně zkracuje dobu analýzy vzorku, a tím může v konkrétním případě snížit ztráty.

Z těchto důvodů byla vytvořena metodická příručka zahrnující 41 rostlin na úrovni druhu, které se na teritoriu České republiky vyskytují běžně až zřídka (ale i při řídkém výskytu mohou být zdrojem nepříjemných zdravotních komplikací u zvířat v chovech), která podává praktický pohled na možnou intoxikaci a způsob, jak ji řešit. V příručce nejsou zahrnuty pícninářské zdroje používané běžně k přípravě krmných směsí (chrastice, jílky, kostřavy, extrahované sójové šroty, lněné pokrutiny, řepkové a bavlníkové výlisky aj.), protože se předpokládá znalost obsahu nepříznivě působících látek v těchto rostlinách a jejich případné projevy, a proto není manifestace takových účinků překvapením. Nejsou také uvedeny všechny rostliny s antinutričními účinky, protože hodnocení účinků některých z nich není ještě uzavřeno, anebo jejich kontakt se zvířetem může být poměrně nečetný.

Hlavní druhy rostlin, které mohou být zdrojem antinutričních anebo toxických účinků

Bez chebdí (*Sambucus ebulus*)
Blín černý (*Hyoscyamus niger*)
Bolehlav plamatý (*Conium maculatum*)
Čičorka pestrá (*Coronilla varia*)
Děhel lesní (*Angelica silvestris*)
Devětsil zvrhlý (*Petasites hybridus*)
Durman obecný (*Datura stramonium*)
Hadinec obecný (*Echium vulgare*)
Jestřabina lékařská (*Galega officinalis*)
Kokotice druhy (*Cuscuta epithymum*, *C. europaea*)
Komonice bílá (*Melilotus albus*)
Komonice lékařská (*Melilotus officinalis*)
Kostival lékařský (*Symphytum officinale*)
Krabilice mámivá (*Chaerophyllum temulum*)
Kručinka barvířská (*Genista tinctoria*)
Kýchavice druhy (*Veratrum album* ssp. *album, V. album* ssp. *lobelianum*)
Lilek druhy (*Solanum tuberosum, S. nigrum* ssp. *nigrum*)
Ocún jesenní (*Colchicum autumnale*)
Oměj druhy (*Aconitum vulparia, A. callybotryon*)
Ostrožka polní (*Consolida regalis*)
Otočník evropský (*Heliotropium europeum*)
Pilát lékařský (*Anchusa officinalis*)
Pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*)
Pryskyřník prudký (*Ranunculus acris*)
Pryšec chvojka (*Tithymalus cyparissias*)
Rozpuk jízlivý (*Cicuta virosa*)
Řepeň durkoman (*Xanthium strumarium*)
Starček druhy (*Senecio vulgaris, S. jacobea, S. ovatus*)
Štírovník růžkatý (*Lotus corniculatus*)
Tolita lékařská (*Vincetoxicum hirundinaria*)
Trýzel malokvětý (*Erysimum cheiranthoides*)
Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)
Vlnice chlupatá (*Oxytropis pilosa*)
Vratič obecný (*Tanacetum vulgare*)
Zemědým lékařský (*Fumaria officinalis*)

Prognóza a závažnost intoxikací

Posouzení možného průběhu nežádoucích účinků obsahových látek rostlin na živočišný organismus vyžaduje klasifikační stupnici, jejíž jednotlivé prvky jsou uvedeny v textu metodiky, aby uživateli bylo hned od začátku naprosto zřejmé, jak rychle a zásadně v případě intoxikací postupovat. Tato stupnice hodnocení obsahuje prognózu vývoje intoxikace u zvířete s popisem jeho stavu, závažnost intoxikace a popis výskytu rostliny v oblastech zkrmování, resp. přímého přístupu.

Prognóza*	Popis stavu	Závažnost**	Popis
Výborná	Intoxikace je vzhledem k průběhu velmi mírná, i bez terapie dochází k rychlému uzdravení.	1	Toxická rostlina je v populaci poměrně vzácná, anebo se vyskytuje na místech, kde je zvířatům běžně nedostupná.
Dobrá	Intoxikace je mírná, k uzdravení dochází jen po terapeutickém zásahu, chronické patologické změny jsou malé.	2	Rostlina se vyskytuje relativně běžně, ale buď není běžně zkrmována, anebo dojde po úpravách ke snížení obsahu toxických metabolitů.
Špatná	Intoxikace je výrazná, i přes terapii (je-li možná, anebo je-li známa) dochází k úhynu do 50 % jedinců. Chronické změny jsou statisticky významné.	3	Rostlina je v přírodě běžná, je výrazně toxická, zvířata k ní mají přístup jen v určitých obdobích vegetace.
Fatální	Intoxikace je masivní, i přes terapii (je-li možná, nebo je-li známa) dochází k úhynu více než 50 % jedinců. Chronické změny jsou markantní, neodstranitelné, zvířata jsou z chovatelského a uživatelského hlediska prakticky nevyužitelná.	4	Rostlina je buď běžná, anebo ne zcela běžná, ale může do volné přírody široce diseminovat a při vhodných podmínkách se množit, je výrazně toxická a přitom je snadné, aby se dostala do píce.

* Prognóza: předpověď průběhu a zakončení intoxikace, ať už bez léčby nebo po ní.

** Závažnost intoxikace vychází z dostupnosti toxického vegetabilního materiálu.

Rozsah informací o jednotlivých toxických rostlinách v metodické příručce

Popis: základní botanický popis rostliny, zahrnující 3 barevné fotografie; na základě těchto údajů lze rostlinu bez významných problémů identifikovat.

Poznávací znaky: výrazné morfologické znaky rostliny (barva, tvar květu a listu, zápach) případně jiné zajímavosti, které usnadní poznání.

Výskyt: charakteristický výskyt, typ půd, na kterých se rostlině dobře daří, četnost výskytu, případně upozornění na známá místa výskytu v ČR.

Toxické látky a jejich stabilita: uvádí hlavní toxickou látku (látky) a jejich stabilitu v čerstvé rostlině a v průběhu sušení a silážování; zároveň je uveden případný charakteristický zápach, který je s tímto procesem konzervace spojen.

Příznaky, průběh intoxikace, osud látky (látek) v organismu: popisuje druh zvířete a pícninu, která může být nejčastějším zdrojem jeho intoxikace, příznaky otravy (s uvedením časového horizontu, případně s interakcemi několika toxických látek, které se v rostlinném materiálu vyskytují. Bývá také uveden mechanismus toxicity, na základě kterého (podle farmakologických znalostí) je možné snáze volit antidotum.

Intoxikační dávka: podle literární dostupnosti zahrnuje limitní dávku pro jednotlivé druhy hospodářských zvířat, která může navodit smrt zvířete, případně LD_{50}, rozdíl mezi akutní a chronickou intoxikací.

Příležitost k intoxikaci: způsob příjmu toxického materiálu (přímé spásání, seno atd.).

Citlivost živočišných druhů: je v některých případech zásadní.

Možnost terapeutického zásahu: podání léčivých přípravků, případně volba terapeutického postupu.

Prognóza, stupeň závažnosti: podává rámcovou informaci o možné záchraně zvířat.

Příklad toxikologicky významné rostliny:

Ocún jesenní (*Colchicum autumnale* L., Ocúnovité-Colchicaceae)

Popis:

Rostlina vytrvalá, za květu 10-20 cm, za plodu 10-30 cm vysoká, hlíza hluboko (-30 cm) v půdě, 3-7 x 3-4 cm velká, obalená hnědými šupinami; květy po 1-3(-7), světle fialové, vyčnívající z hnědých šupin 10-20 cm nad povrch půdy. Okvětí je nálevkovité, pravidelné nebo slabě souměrné, volné cípy vnitřní eliptické až mírně kopinaté, vnější podlouhle obvejčité, uvnitř pýřité. Tyčinky nedosahují vrcholu květu, prašníky jsou podlouhle čárkovité, oranžově žluté, semeníky (3), čnělky 3 zdéli perigonu, blizny jsou podlouhlé, po čnělce sbíhavé. Listy se vyvíjejí na jaře současně s prodlužující se lodyhou, která vynáší nad zem podlouhle vejčitou tobolku, obklopenou podlouhle kopinatými špičatými listy, 2,5- 6,5 x 2-6 cm velkými. Semena jsou četná, černohnědá, téměř kulovitá, do 2 mm v průměru.

Kvete v srpnu až listopadu, plodí v květnu až červnu.

Poznávací znaky:

Kvete v pozdním létě (srpen-září) bez listů, listy a plody přináší na jaře (duben-květen), charakteristická fialová okvětí.

Výskyt:

Četný na vlhkých lukách, slatinách a v lužních lesích na propustných, živných, hlubokých, neutrálních až slabě kyselých hlinitých půdách. Je to nížinný až horský typ, v ČR běžný.

Toxická část:

Celá rostlina; prakticky přichází v úvahu nadzemní část.

Toxické látky a jejich stabilita:

Tropolonové alkaloidy (~30, hlavní kolchicin): květy 1,2-2,0 % (z toho 60-70 % kolchicinu), semena 0,5-1,2 % (z toho 65 % kolchicinu), hlízy 0,1-0,6 % (z toho 60 % kolchicinu), nať 0,60-0,70 % (z toho 60-70 % kolchicinu), počítáno na sušinu.

Sušením toxicita výrazně neklesá pokud se k sušení nepoužije teplota vyšší než 50 °C.

Příznaky, průběh intoxikace, osud látky v organismu:

Intoxikace je nejprve tichá, působení látky je pozvolné, první příznaky se projeví až po 3-6 hodinách, smrt nastává v závislosti na dávce nejdříve za 12 hodin, spíše však déle. Při akutní otravě se objevuje nejprve nutkání k vrhnutí, potom vrhnutí, koliky v zažívacím ústrojí, křečovité močení (někdy tomu odpovídající postoj zvířete), výměty bývají hlenovité až vodnaté, často krvavé. Krev se objevuje také v moči, nastává velká ztráta tekutin, elektrolytový rozvrat s možností šoku, hypotenze, tachykardie, celkové tonicko-klonické křeče, ztráta šlachového reflexu (zasažení CNS). Zvíře je neklidné a obtížně zklidnitelné, nevnímá překážky, střídavě se objevují křeče končetin. Cirkulační kolaps, respirační a srdeční selhání jsou ukončeny smrtí zvířete.

Intoxikační dávka:

Pro odhad intoxikace lze počítat s dávkou LD_{50} 0,2-0,3 $mg.kg^{-1}$ p. o. Kolchicin LD_{50} myš: 6 $mg.kg^{-1}$ p. o., 2 $mg.kg^{-1}$ i. p.

Příležitost k intoxikaci:

Pastva, siláže, úsušky.

Citlivost živočišných druhů:

Zvířata reagují na kolchicin různě; dosud nebyl prokázán rozdíl v účinku mezi monogastrickými a polygastrickými živočichy (spíše se zdá, že polygastři budou v důsledku regurgitace citlivější). Kočkovité šelmy jsou na kolchicin citlivé zhruba stejně jako člověk (např. kočka LD_{50} 0,25 $mg.kg^{-1}$ p. o.), hlodavci jsou méně citliví (např. křeček LD_{50} > 150 $mg.kg^{-1}$ p. o.). Kolchicin a jeho degradační

produkty podléhají enterohepatálnímu oběhu, vylučování je pozvolné, především stolicí, z malé části močí. Kolchicin přechází do mléka a zhoršuje tak jeho kvalitu.

Možnost terapeutického zásahu:

Neúčinná. Aktivní uhlí pro adsorpci (v suspenzi), 5% roztok síranu sodného (p. o.)

Prognóza, stupeň závažnosti:

Prognóza je nepříznivá. Po objevení prvních příznaků je jed inkorporován v buňkách, kde inhibuje tvorbu dělicího vřeténka při dělení jádra v metafázi (tvorbou tubulin-kolchicinového komplexu) zastavuje regeneraci všech orgánů s vysokou rychlostí dělení buněk (kostní dřeň, epitel trávicího ústrojí ad.). Závažnost 4.

Možnost prevence intoxikací

Znalost profilu rostlin v travních porostech, které jsou využívány ke spásání a k sečím současně s botanickou znalostí toxických rostlin, které mohou být jejich součástí, vytváří velmi účinný nástroj, jak těmto komplikacím ve výživě zvířat předcházet. Ochranu před intoxikací však nelze redukovat na časté dotazy kolik rostlin může zvíře zkonzumovat, aby nedošlo k otravě, případně kolik rostlin může být na jednotce plochy. Údaje o kvantitativním obsahu toxických látek uváděné v literatuře se pohybují vždy v rozmezí, které bývá dosti široké a závisí na vegetační a denní době, geografické lokalitě, ontogenetickém stadiu rostliny, růstových podmínkách a často také na chemické rase. Proto nelze bez kvantitativní analýzy toxických látek kvalifikovaně určit míru toxicity určité rostliny na konkrétním stanovišti. Ideálním postupem je eliminace toxických rostlin z pastvin (je-li to možné), případně úprava zelené píce takovým způsobem, aby se výskyt toxických látek maximálně snížil (silážováním atd.).

Dostupnost Metodické příručky

Metodická příručka s názvem *Rostliny s antinutričními a toxickými látkami vyskytující se potenciálně v pícninách v ČR j*e dostupná na www stránkách VÚŽV: http://www.vuzv.cz/index.php?p=vedecky_vybor&site=default a v sekretariátu Vědeckého výboru pro výživu zvířat, Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Přátelství 815, Praha Uhříněves.

Literatura

Blaschek, W. et al.: HagerROM 2010: Hager´s Enzyklopädie der Arzneipflanzen und Drogen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft/Springer Verlag, Stuttgart 2011.

Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L., Martinec, Z., Měrka, V.: Přírodní toxiny a jedy. Galén-Karolinum, Praha 2004.

Kalač, P., Míka, V.: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997.

Knight, A. P., Walter, R. G.: A Guide to Plant Poisoning. Teton NewMedia, Jackson 2001.

Roth, L., Daunderer, M., Kormann, K.: Giftpflanzen-Pflanzengifte. Ecomed, 3. vyd., Landsberg/Lech 1988.

PROBIOTIKA VE VÝŽIVĚ TELAT

doc. Ing. Eva Vlková, Ph.D., Ing. Věra Bunešová, Ing. Šárka Ročková, Ing. Jiří Killer, Ph.D., prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos (FAO/WHO, 2002). Při využívání probiotik jako krmných aditiv je důležité nejen vhodné načasování jejich aplikace, ale také výběr správného mikroorganismu. Jako probiotikum by měly být používané mikroorganismy přirozeně se vyskytující v trávicím traktu, nejlépe izolované ze stejného živočišného druhu, kterému jsou aplikovány a měly by pocházet od zdravých jedinců (Gilliland, 2001). Dodržení druhové specifity je velice důležité, protože schopnost adheze bakterií na střevní stěnu je často hostitelsky specifická. Nejčastěji používané probiotické mikroorganismy pro přežvýkavce jsou bakterie rodů *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, a dále také kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a plísně *Aspergillus oryzae* (Anadón et al., 2006; Soccol et al., 2010). V posledních letech se rozšířil i zájem o zkrmování bifidobakterií (Shim et al., 2005), protože se jedná o pravidelnou součást mikroflóry trávicího traktu telat na mléčné výživě (Vlková et al., 2008).

Účinek probiotik na přežvýkavce byl dokumentován mnoha studiemi, avšak mechanismus jejich působení není vždy plně objasněn. Volba vhodných probiotických druhů je také značně závislá na stáří hostitele při aplikaci. Jejich výběr je rozdílný pro mladé přežvýkavce, kdy ještě nejsou rozvinuty předžaludky a pro dospělé jedince. Probiotika upravují složení střevní mikroflóry pozitivním směrem, posilují rezistenci organismu hostitele proti kolonizaci nežádoucími patogenními bakteriemi a snižují tak riziko výskytu průjmových onemocnění, což je významný problém zejména u mláďat (Moore, 2004). Dále posilují slizniční imunitu hostitele, čímž přispívají ke zlepšení celkového zdravotního stavu zvířat (Choct, 2009). Napomáhají také v konverzi a resorpci živin, což vede ke zvýšení přírůstku (Khalid et al., 2011). U dospělých přežvýkavců je účinek probiotických mikroorganismů směřován na prostor bachoru, kde probíhá převážná část trávení, osvědčilo se zejména užívání kvasinek *Saccharomyces cerevisce* (Stella et al., 2007). Kvasinky jsou rovněž přidávány do krmné dávky telat v období odstavu, kdy přispívají k rozvoji celulolytických bakterií, podporují degradaci vlákniny a zvyšují produkci mikrobiálních proteinů (Khalid et al., 2011). **Probiotika je vhodné zahrnout do krmné dávky ve stresujících obdobích jako je doba odstavu, začátek laktace nebo změna složení krmné dávky** (Chaucheyras-Durand and Durand, **2010). Je možno volit mezi preparáty jednodruhovými či vícedruhovými. Kosin a Rakshit (2006) uvádějí, že kombinace více probiotických kmenů je efektivnější než podávání pouze jednoho kmene. Důvodem je synergické působení takového probiotika, kdy se kombinují různé mechanismy účinku a také zlepšení schopnosti kolonizace trávicího traktu hostitele.**

Cílem této práce bylo stanovit druhové zastoupení bifidobakterií trávicího traktu mláďat přežvýkavců a vybrat vhodné kmeny po vytvoření vícedruhového probiotického preparátu pro telata.

Materiál a metody

Pomocí modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru (Oxoid) s přídavkem mupirocinu a ledové kyseliny octové (Rada a Petr, 2000) byly izolovány bifidobakterie z trávicího traktu telat a jehňat na mléčné výživě. Izoláty byly identifikovány na úroveň rodu pomocí detekce enzymu fruktózo-6-fosfát

fosfoketolázy (F6PPKtest), fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a rodově specifické polymerázové řetězové reakce (PCR). K druhové identifikaci a charakterizaci kmenů byly použity testy systému API (BioMérieux, Francie), druhově specifická PCR, náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), repetitive PCR (repPCR) a sekvenace genů 16S rDNA a *hsp*60 (Bunešová et al., 2012). Byly také stanoveny funkční a probiotické vlastnosti izolatů v *in vitro* podmínkách (Vlková et al., 2009).

Směs 10 bifidobakterií s vhodnými vlastnostmi (probiotická směs), ze kterých byli připraveni rifampicin rezistentních mutanti (RRBif), byla podána telatům ve věku 2 dnů ve dvou extenzivních chovech (farma Chov Charolais s.r.o., Mšec – Háje a farma SACH s.r.o., Vlašim) a v jednom chovu intenzivním (farmě Dvorec, Vrčeňská zemědělská a.s., Vrčeň). Telata v extenzivních chovech byla porozena na pastvě a sála mléko od matky. Mláďata z farmy Dvorec byla ustájena v individuálních boxech, v prvních 4 dnech byla krmena mlezivem, dále pak mlékem od dojnic. Od 7. dne věku jim bylo podáváno granulované krmivo a byl umožněn volný přístup k vodě. Každá pokusná skupina čítala 10 telat, stejně velká skupina mláďat bez probiotické intervence sloužila jako kontrola. Přežívání podaných bakterií a ovlivnění dalších bakteriálních skupin trávicího traktu bylo sledováno kultivačně na selektivních médiích v týdenních intervalech. Identita podaných bifidobakterií byla potvrzena metodou RAPD a sekvenací.

V letech 2009 a 2011 byla všem narozeným telatům z farmy Chov Charolais s.r.o. (extenzivní odchov) plošně podávána probiotická směs. V roce 2010 byla telata rozdělená do dvou skupin. Skupině 20 kusů byla podána probiotika, zbytek telat sloužil jako kontrola. Bylo sledováno přežívání bifidobakterií v trávicím traktu, zdravotní stav telat, stanoveno % úhynů a náklady na antibiotickou léčbu. Výsledky byly porovnány s údaji získanými ve stejném chovu v předchozích letech, kdy aplikace probiotik neprobíhala.

Výsledky a diskuze

Existuje velmi málo studií zabývajících se druhovým zastoupením bifidobakterií u přežvýkavců. Z našich výsledků identifikace izolátů mláďat přežvýkavců vyplynulo, že jejich druhové zastoupení se u telat a jehňat liší. Nejpočetnějším druhem byl u obou skupin stanoven *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*. Jak u telat, tak jehňat byl nalezen *B. choerinum*, pouze u telata *B. longum* ssp. *suis* a *B. thermophilum* a naopak pouze u jehňat *B. pseudocatenulatum* a *B. pseudolongum* ssp. *globosum*. Zatímco druhy *B. animalis* ssp. *animalis* a *B. pseudolongum* ssp. *globosum* jsou běžnou součástí střevní mikroflóry mnoha živočišných druhů, některé bifidobakterie jsou považovány za hostitelsky specifické (Russell et al., 2011). Lukáš et al. (2007) detekovali *B. animalis* pomocí gelové elektroforézy v denaturačním gradientu u telat od prvního dne života. Také *B. thermophilum* je běžnou součástí střevní mikroflóry telat na mléčné výživě (Mitsuoka, 1969). Ovšem *B. choerinum* a *B. longum* ssp. *suis* jsou uváděny jako typické bakterie trávicího traktu prasat (Russell et al., 2011) a druh *B. pseudocatenulatum* jako specifický pro člověka (Leahy et al., 2005). Naše výsledky ukazují, že některé druhy bifidobakterií nemusí být hostitelsky specifické a mohou se vyskytovat u více než jednoho živočišného druhu. Ripamonti et al. (2011) uvádějí, že nejčastěji izolovaným druhem u telat je *B. ongum*, k identifikaci použili ribotypizace, ale autoři neuvádějí konkrétní poddruh.

Probiotická směs byla podána mláďatům ve věku 2 dnů na farmě Chov Charolais s.r.o. došlo k navýšení celkového množství bifidobakterií ze 6,70 log KTJ/g ve 2 dnech na 9,11 log KTJ/g v 5. dni věku telat. Byly stanoveny statisticky významně vyšší počty bifidobakterií oproti kontrole a to v 7. dni věku na hladině významnosti $P > 0,01$ a $P > 0,05$ ve věku 14, 21, 42 a 56 dní. Kmen, který byl reizolován a určen pomocí RAPD jako *B. longum* ssp. *suis* přežíval v trávicím traktu po dobu 25 dnů a kmen *B. animalis* ssp. *animalis* pak dokonce až 54 dnů. Poslední stanovení bylo provedeno v 56. dni věku telat, tedy 54 dní po podání a dodaná probiotika byla stále přítomna, ale již v počtech pouze 2,42 log KTJ/g. Po ošetření probiotiky u této pokusné skupiny došlo také k snížení počtů *E. coli*, tento

rozdíl však nebyl statisticky významný. Během pokusu počty bifidobakterií převyšovaly počty bakterií *E. coli* a celkových koliformních bakterií. Bylo pozorováno také vyšší zastoupení laktobacilů oproti kontrole, rozdíl byl průkazný (P > 0,05) ve 28. a 42. dni věku telat. Uvedené výsledky byly potvrzeny v dalším pokusu, kdy byla telatům na farmě SACH s.r.o. (Vlašim) podána opět směs 10 kmenů RRBif. Jedná se o další farmu s extenzivním odchovem telat. Ještě 3 týdny po podání dosahoval počet dodaných bifidobakterií 9,34 log KTJ/g, po 4 týdnech byl 5,97 KTJ/g a k úplnému vymizení RRBif došlo po 6 týdnech. Podobně jako u telat z farmy Chov Charolais s.r.o., měly dodané probiotické bakterie vliv na snížení množství koliformních bakterií a naopak, laktobacily byly zaznamenány ve vyšších počtech než u kontrolní skupiny bez probiotické intervence.

Odlišných výsledků bylo dosaženo při podání probiotické směsi telatům v intenzivním odchovu na farmě Dvorec (Vrčeňská zemědělská a.s., Vrčeň). Po aplikaci nedocházelo k dlouhodobému přežívání kmenů. Počet přežívajících RRBif byl týden po aplikaci 6,20 log KTJ/g, po 14 dnech jen 3,37 log KTJ, po dalších 7 dnech už nebyly RRBif detekovány. Žádná ze sledovaných skupin bakterií nebyla podanými bifidobakteriemi ovlivněna. Z výsledků vyplynulo, že i při použití směsi 10 kmenů bifidobakterií, které byly původně izolované z trávicího traktu telat, nemusí nutně docházet k jejich trvalé kolonizaci. Dobu jejich přežívání neovlivňuje pouze věk při podání, ale zásadní roli hraje způsob odchovu a výživy telat.

Výsledky vlivu plošného podávání probiotické směsi telatům na farmě Chov Charolais s.r.o. na úhyn, nutnost antibiotické léčby a náklady spojené s touto léčbou shrnuje tabulka 1. Ve skupinách telat s probiotickou intervencí (v tabulce zvýrazněno tučně) došlo ke snížení úhynů až o 5 % a náklady na antibiotickou byly nulové nebo zanedbatelné. Dodané bifidobakterie přežívaly v trávicím traktu telat v počtech minimálně 5 log KTJ/g po dobu 25-50 dní. K většině úhynů docházelo v důsledku průjmových onemocnění, další nejčastější příčinou úhynů byla respirační onemocnění. Naše výsledky potvrzují výsledky jiných autorů, kteří uvádějí, že probiotika ovlivňují nejen složení střevní mikroflóry a mají tak vliv na snižování % úhynů v důsledku průjmových onemocnění, ale podporují také imunitní systém, což vede k větší odolnosti organizmu k respiračním onemocněním (Ripamonti et al., 2011).

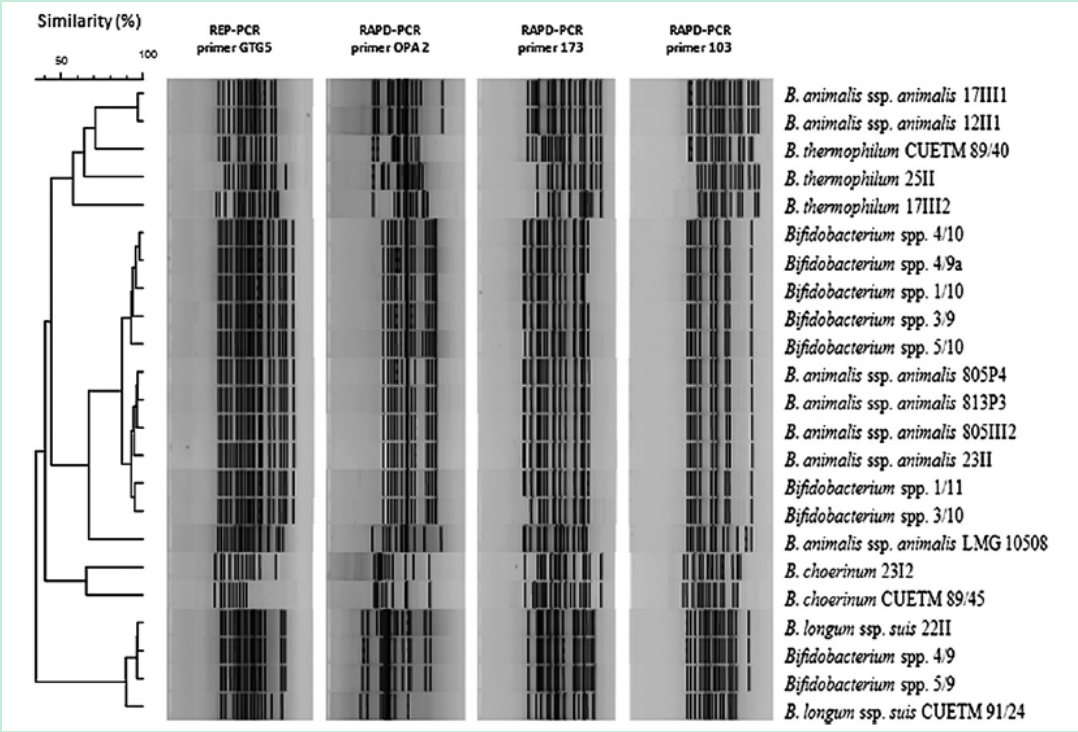
Tabulka 1: **Vliv aplikace probiotické směsi na úhyn a náklady na antibiotickou léčbu telat**

rok	podaná probiotika	počet narozených telat	úhyn	telata léčena antibiotiky	náklady na léčbu (v tis. Kč)
2006	-	77	9 %	47 %	9
2007	-	77	8 %	55 %	11
2008	-	95	9 %	65 %	16
2009	**+**	**126**	**4 %**	**4 %**	**1**
2010	-	114	7 %	66 %	19
2010	**+**	**20**	**0 %**	**5 %**	**1**
2011	**+**	**64**	**0 %**	**0 %**	**0**

Při identifikaci re-izolovaných bifidobakterií na kmenovou úroveň se osvědčila metoda RAPD. Z obrázku 1 je patrné, že kmeny nejdéle přežívající v trávicím traktu telat patří k druhu *B. animalis* ssp. *animalis* (přežívající kmeny: 4/10, 4/9a, 1/10, 3/9, 5/10, 1/11, 3/10) a *B. longum* ssp. *suis* (přežívající kmeny: 4/9, 5/9). Podané bifidobakterie identifikované jako *B. thermophilum* a *B. choerinum*, ale i kmeny *B. animalis* ssp. *animalis* 17III1 a 12II1 nebyly schopny dlouhodobě přežívat v trávicím traktu pokusných

zvířat i přes to, že se jednalo o bakterie původně izolované z intestinálního traktu telat. Naše výsledky tedy ukazují, že schopnost kolonizace je vlastnost nikoliv druhově, ale spíše kmenově specifická.

Obrázek 1: **Dendogram podobnosti fingerprintových profilů (repPCR a RAPD) podaných (17III1, 12II1, 25II, 17III2, 805P4, 813P3, 805III2, 23II, 23I2, 22II) a přežívajících (4/10, 4/9a, 1/10, 3/9, 5/10, 1/11, 3/10, 4/9, 5/9) bifidobakterií.**



Závěr

Nejpočetnějším druhem bifidobakterií trávicího traktu mláďat přežvýkavců na mléčné výživě byl stanoven *B. animalis* ssp. *animalis*, ale druhové zastoupení dalších bifidobakterií je u telat a jehňat rozdílné. Kombinace několika nezávislých metod se ukázala být vhodnou pro identifikaci bifidobakterií až na úroveň kmene a bylo možné určit nejdéle přežívající kmeny po podání směsi 10 probiotických bakterií. U telat odchovávaných přirozeným způsobem bylo zaznamenáno daleko lepší přežívání dodaných bifidobakterií než u telat v intenzivním odchovu. Probiotická směs významně snížila úhyny a náklady na léčbu telat. I když bakterie přežívaly dlouhodobě, nebyly schopny trvale kolonizovat trávicí trakt i přes to, že se jednalo o bakterie telecího původu.

Literatura

Anadón A., Martínez-Larranaga M.R., Aranzazu-Martínez M. (2006): Probiotics for animal nutrition in the European Union, Regulation and safety assessment, Regulatory Toxicology and Pharmacology 45, 91–95.

Bunešová V., Domig K.J., Killer J., Vlková E., Kopečný J., Mrázek J., Ročková Š., Rada V. (2012): Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. Anaerobe 18: 166-168.

Chaucheyras-Durand F., Durand H. (2010): Probiotics in animal nutrition and health. Benefic Microb 1: 3–9.

Choct M. (2009): Managing gut health through nutrition. Brit Poultr Sci 50: 9–15.

FAO/WHO 2002: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food [cit. 2011-08-05]. Dostupné z: ftp;//ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.

Gilliland S.E. (2001): Probiotics and prebiotics. In: Applied Dairy Mikrobiology, Marth, E.H., Steele, J.L. (eds.), Marcel Dekker, New York, 327–343.

Khalid M.F., Shahzad M.A., Sarwar M., Rehman A.U., Sharid M., Mukhtar N. (2011): Probiotics and lamb performance: A review. Afr J Agr Res 23: 5198-5203.

Kosin B., Rakshit S.K. (2006): Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. Food Technol Biotechnol 44: 371-379.

Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.F., van Sinderen D. (2005): Getting better with bifidobacteria. J Appl Microbiol 98: 1303–1315.

Lukáš F., Koppová I., Kudrna V., Kopečný J. (2007): Postnatal Development of Bacterial Population in the Gastrointestinal Tract of Calves. Folia Microbiol 52: 99–104.

Mitsuoka T. (1969): Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstarakt von Menchen und Tieren. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig A210: 52–64.

Moore J. (2004): The use of probiotics in the calf: An overview. Cattle Pract 12: 125–128.

Rada V., Petr J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. J Microbiol Meth 43: 127–132.

Ripamonti B., Agazzi A., Bersani C., de Dea P., Pecorini C., Pirani S., Rebucci R., Savoini G., Stella S., Stenico A., Tirloni E., Domeneghini C. (2011): Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. Anaerobe 17: 97-105.

Russell D.A., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. (2011): Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. Int J Food Microbiol 149: 88-105.

Shim S.B, Verstegen M.W.A., Kim I.H., Kwon O.S., Verdonk J.M.A.J. (2005): Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. Arch Anim Nutr 59: 419–427.

Soccol C.R., de Souza Vandenberghe L.P., Spier M.R., Medeiros A.B.P., Yamaguishi C.T., de Dea Lindner J., Pandey A., Thomaz-Soccol V. (2010): The potential of probiotics: a review. Food Technol Biotechnol 48: 413-434.

Stella A.V., Paratte R., Valnegri L., Cigalino G., Soncini G., Chevaux E., Dell'Orto V., Savoini G. (2007): Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. Small Rum Res 67: 7–13.

Vlková E., Grmanová M., Rada V., Homutová I., Dubná S. (2009): Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. Czech J Anim Sci 54: 552-565.

Vlková E., Rada V., Trojanová I., Killer J., Šmehilová M., Molatová Z. (2008): Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. Arch Anim Nutr 62: 359–365.

PROBLEMATIKA FOSFORU V PRAKTICKÉM CHOVU SLEPIC

prof. Ing. Miloš Skřivan, DrSc.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves, Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce

Souhrn

Faktoriálním pokusem (2 x 2) byl sledován vliv kontrastního obsahu nefytátového fosforu (1.3 and 4.0 g/kg; NPP) a 3-fytázy, Natuphos® (0 and 150 FTU/kg; F) na užitkovost slepic, fyzikální parametry vajec, obsah fosforu (P) ve vaječné skořápce a pH části trávicího traktu nosnic. Dvě stě čtyřicet slepic (ISA Brown) bylo umístěno v obohacených klecích a krmeno pšenično-kukuřično-sójovou krmnou směsí. Byla zjištěna signifikantní interakce kombinace NPP a F pro barvu vaječného žloutku (P = 0.016) a tloušťku skořápky (P = 0.038). Přídavek F významně zvýšil snášku s snížil spotřebu krmiva. Vysoká koncentrace NPP měla negativní vliv na snášku a konverzi krmiva. Slepice krmené krmnou směsí s obsahem 1.3 g/kg NPP měly vyšší užitkovost. Přídavek 150 FTU/kg zvýšil ukazatele vnitřní kvality vajec. Naproti tomu nízký obsah NPP snížil kvalitu bílku, tloušťku a podíl skořápky.

Klíčová slova: fytáza; nefytátový fosfor; slepice; užitkovost

Výzkum probíhá v rámci finanční podpory Ministerstva zemědělství ČR (Záměr č. MZe 0002701404).

Úvod

Rodriques et al. (1998) považuje 0,35 % a 0,25 % využitelného P (AP) v krmné směsi (KS) na začátku a na konci snášky ve 2. snáškovém cyklu za adekvátní pro snášku a kvalitu vajec. Pšeničná KS obsahující 0,27 % AP a kukuřičná KS s 0,30 % AP bez přídavku fytázy (F), při 3,5 % vápníku a příjmu 115 g KS/den, zajistí vysokou snášku i kvalitu vajec (Skřivan et al., 2010). Proti KS s vyšším obsahem P se sníží vylučování P trusem a tím i znečišťování životního prostředí. Ještě vyššího efektu možno dosáhnout přídavkem fytázy. Tak lze dále snížit obsah P v KS. Fytáza zvýší nejen stravitelnost fytátového P, ale i vápníku, stopových prvků a aminokyselin (Liu et al., 2007).

Cílem pokusu bylo zjistit rozdíly v užitkovosti slepic a kvalitě vajec při velmi nízkém a naopak vysokém obsahu nefytátového fosforu (NPP 1,3 nebo 4,0 g/kg) v krmné směsi s nízkým přídavkem nebo bez přídavku fytázy.

Materiál a metodika

Dvě stě čtyřicet slepic ISA Brown ve věku 44 týdnů bylo zařazeno do 4 skupin se 6 klecemi (opakováními) po 10 slepicích ve skupině. Světelný den byl 16 S : 8 T. Intenzita světla 10 lx ve střední etáži. Faktoriální pokus 2 x 2 měl 2 úrovně NPP (1,3 a 4,0 g/kg) a 2 zastoupení F (0 a 150 FTU/kg). Natuphos® (3-fytáza, EC 3.1.3.8 z *Aspergillus niger*) byl zdrojem F. Poměr kukuřice a pšenice v KS byl 1 : 1. V 1 kg KS bylo 11,5 MJ AME_N, 165 g N-látek a 35 g vápníku. Pokus probíhal po dobu 12 týdnů. Počet vajec byl sledován denně, snáška a spotřeba krmiva na klec byla počítána týdně. Fyzikální parametry vajec byly měřeny třikrát během pokusu, celkem 540 vajec. Vejce byla vážena 1 den v týdnu. Barva žloutku byla měřena dle stupnice DSM. Byly používány následující přístroje: Instron 3360 (nedestrukční a destrukční pevnost skořápky), atomový absorpční spektrometr Solar M6 (vápník v KS a ve skořápce) a pH metr 3350 Jenway. Fosfor v KS a ve skořápce byl stanoven dle AOAC 965.17.

Ke statistickým výpočtům byla zvolena 2 faktorová ANOVA s GLM. Hlavními efekty byla koncentrace NPP, přídavek F a intetrakce NPP x F.

Výsledky a diskuse

Redukce NPP v KS (1,3 g/kg) zvýšila snášku (P<0,001) a snížila spotřebu krmiva na 1 kg vajec (P=0,02). Přídavek F zvýšil hmotnost vajec (P<0,001) a snížil spotřebu krmiva na 1 kg vajec (P<0,019). Vejce snesená slepicemi, které dostávaly KS s nízkým obsahem P, měla slabší skořápku (interakce NPP a F; P=0,038) a světlejší žloutky (interakce P=0,016). Vysoký obsah NPP (4 g/kg) zvýšil ukazatele kvality bílku, výšku žloutku, tloušťku, hmotnost a podíl skořápky. Pevnost skořápky neovlivnil. Při nízkém obsahu P v KS působila F v kladném směru silněji na kvalitu vaječné skořápky, než při vysokém zastoupení P. Bílkoviny vaječného bílku obsahují fosfor. Tudíž silná redukce P v KS mohla být příčinou poklesu ukazatelů kvality bílku, kterou neodstranil ani přídavek fytázy. Naproti tomu pokles tloušťky, hmotnosti a podílu skořápky, ne však její pevnosti, možno vysvětlit také výrazně vyšší snáškou.

Krmné směsi pro slepice v ČR mají zbytečně vysoký obsah P. Důsledkem jsou vyšší náklady na krmivo, větší znečištění životního prostředí fosforem z trusu a často i nižší užitkovost. Literární doporučení pro AP nebo NPP se pohybují v rozmezí od 0,13 do 0,30 % (Mayer a Parsons, 2011). Značně rozdílné jsou i publikované výsledky pokusů s přídavkem fytáz do KS pro slepice s různým obsahem P. Výraznou roli hraje vápník. Vztahy mezi vápníkem, fosforem a fytázou jsou u slepic velmi komplikované, a to především z důvodu vysoké potřeby vápníku. Ze zde prezentovaných údajů jednoznačně vyplývá, že při nízkém obsahu P je možno očekávat poměrně velký efekt již 150 FTU zvoleného zdroje 3-fytázy, přidané do 1 kg KS.

Závěr

Autor prezentuje první výsledky kombinace obsahu nefytátového fosforu a přídavku fytázy do krmných směsí pro nosnice. Silné, dle našeho názoru hraniční, snížení koncentrace fosforu výrazně zvýšilo snášku, a to zejména při poměrně nízkém přídavku fytázy. Současně však klesly některé ukazatele vnitřní kvality vajec a skořápky, bez poklesu její pevnosti. Měření pH v části trávicí trubice prokázalo, že ve voleti a v gyzzardu byly hodnoty pH příznivé pro aktivitu zvolené 3-fytázy. Výsledky daného pokusu ještě nejsou vhodné k aplikaci v praxi. Ve výzkumu se pokračuje.

Literatura

Liu N., Liu G.H., Li F.D., Sands J.S., Zheng A.J., Ru Y.J. (2007): Efficacy of phytases on egg production and nutrient digestibility in layers fed reduced phosphorus diets. Poult. Sci., 86, 2337-2342.

Mayer P. Parsons C. (2011): The efficacy of phytase enzyme fed to Hy-Line W-36 laying hens from 32 to 62 weeks of age. J. Appl. Poult. Res., 20, 126-142.

Skřivan M., Englmaierová M., Skřivanová V. (2010): Effect of different phosphorus levels on the performance and egg quality of laying hens fed wheat-and maize-based diets. Czech J. Anim. Sci., 55, 420-427.

Skřivan M., Marounek M. (2011): Korekce nadměrného obsahu fosforu v krmných směsích pro slepice v ČR. Certifikovaná metodika (MZE) VÚŽV, s. 11.

STRAVITELNOST KYSELINY FYTOVÉ A FYTASOVÁ AKTIVITA U DRŮBEŽE

prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves, Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce

Kyselina fytová (*myo*-inositolhexafosforečná) je hlavní formou fosforu (P) v semenech rostlin. Je dobře stravitelná u přežvýkavců. Zvířata s jednoduchým žaludkem mají nedostatečnou aktivitu fytasy v trávicím traktu, proto jsou jejich diety doplňovány přídavkem mikrobiální fytasy za účelem zlepšení stravitelnosti fytátového P. Fytasovou aktivitu různého stupně mají také některá krmiva. U pšenice a ječmene je fytasová aktivita vysoká, u kukuřice a olejnin nízká (Eeckhout a De Paepe, 1994). Při neúplném využití fytátového P u drůbeže a prasat přechází mnoho P do exkrementů a stává se příčinou znečistění povrchových vod fosforem. Proto je kyselina fytová a fytasová aktivita předmětem stálého zájmu. V dalším textu je popis několika experimentů, uskutečněných ve VÚŽV a ÚŽFG AV ČR, které s problémem kyseliny fytové a fytasové aktivity u drůbeže souvisí. Ve všech jsme ke stanovení kyseliny fytové používali námi vyvinutou metodu na základě kapilární isotachoforesy (Dušková a kol. 2001). V prvním experimentu, který zde uvádíme, jsme srovnali stanovení fytasové aktivity cereálií, olejnin a luštěnin obvyklou metodou kolorimetrickou s metodou isotachoforetickou (Marounek a kol. 2011).

Obvyklá metoda stanovení fytasové aktivity je založena na měření fosfátu uvolněného z fytátu při inkubaci za definovaných podmínek. Fytasová aktivita se vyjadřuje molárním množstvím fosfátu uvolněného za 1 minutu jednotkovým množstvím vzorku (1 kg). Isotachoforetická (ITP) metoda naproti tomu měří úbytek fytátu za 1 minutu jednotkovým množstvím vzorku při inkubaci za definovaných podmínek. Oba přístupy, tj. měření produktu enzymové reakce i měření úbytku substrátu jsou oprávněné, nelze však čekat číselnou shodu výsledků protože molekula fytátu obsahuje 6 molekul esterově vázané kyseliny fosforečné. Fytátový P stanovujeme metodou kapilární elektroforesy, po extrakci jemně rozemletých vzorků 0,95 M HCl. Celkový P stanovujeme vanadomolybdenanovým činidlem po spálení vzorků při 550 ^{o}C (AOAC, 2005).

Tabulka 1: **Obsah fosforu (P), fytátového P a fytasová aktivita ve vzorcích cereálií, olejnin a luštěnin**

Vzorek	P (g/kg DM)		Fytátový P (% P)	Fytasová aktivita	
	celkový	fytátový		kolorimetricky (U/kg)	ITP (U'/kg)
Pšenice	3,34	2,01	60,2	1137	180
Ječmen	3,61	1,81	50,1	840	47
Žito	3,11	2,49	80,1	2114	208
Oves	3,90	1,34	34,4	61	56
Kukuřice	2,51	2,01	80,1	282	10
Otruby (pšenice)	11,2	7,83	70,0	1395	92
Pohanka	5,22	1,81	34,7	95	4
Proso	4,19	1,90	45,3	269	21
Merlík	5,02	1,35	26,9	941	147

Čirok	3,38	2,37	70,1	265	11
Rýže	3,48	2,34	67,2	292	20
Soja	8,91	3,72	41,8	150	12
Slunečnice	9,17	4,20	45,8	431	18
Řepka	7,28	3,25	44,6	331	20
Len	5,58	4,12	73,8	100	17
Hrách	5,48	2,77	50,5	200	29
Lupina bílá	4,65	3,84	82,6	111	10
Fazole	4,57	1,66	36,3	69	45
Čočka	4,61	1,97	42,7	161	20

U je fytasová aktivita uvolňující 1 µmol fosfátu/min

U' je fytasová aktivita degradující 1 µmol fytátu/min

Další tabulka srovnává fytasové aktivity krmných směsí:

Tabulka 2: **Obsah fosforu (P), fytátového P a fytasová aktivita ve vzorcích krmných směsí pro drůbež**

Krmná směs	P (g/kg DM)		Fytátový P (% P)	Fytasová aktivita	
	celkový	fytátový		kolorimetricky (U/kg)	ITP (U'/kg)
Pšenice-kukuřice-soja	5,94	3,06	51,5	1152	114
Pšenice-kukuřice-soja	6,67	3,33	49,9	1127	166
Pšenice-kukuřice-soja	8,02	3,53	44,0	760	146
Kukuřice-soja	4,52	1,76	38,9	181	16
Kukuřice-soja	5,17	1,76	34,0	127	9
Kukuřice-soja	7,20	1,79	24,9	151	10

U je fytasová aktivita uvolňující 1 µmol fosfátu/min

U' je fytasová aktivita degradující 1 µmol fytátu/min

Nejvyšší fytasovou aktivitu mělo žito, následované pšeničnými otrubami, pšenicí a krmnými směsmi s pšenicí. Ve většině ostatních vzorků byla aktivita nízká. Isotachoforetická metoda je časově náročnější než metoda kolorimetrická, je však vhodná u vzorků s aktivitou nízkou a s vysokým pozadím anorganických fosfátů. Také ji neovlivňují fosfáty uvolněné z organických fosfátů fosfatasami. Nálezy obou metod jsou číselně rozdílné, ale signifikantně korelují ($r = 0,86$; $P < 0,001$). Fytátový P představoval v průměru 54,6% celkového P, tj. většinu P přítomného ve vzorcích. Nejvyšší podíl fytátového P měla lupina bílá (82,6%) a nejnižší merlík (26,9%). Ravindran a kol. (1995) uvádějí, že v semenech obilnin, luštěnin a olejnin se podíl fytátového P na celkovém P pohybuje od méně než 40% do 85%.

V jiném pokuse jsme zjišťovali obsah celkového a fytátového P v exkrementech brojlerových kuřat, stravitelnost P fytátu a retenci P (Skřivan a kol. 2002). Zajímala nás variabilita těchto nálezů. Použili jsme 10 kuřat Ross 208 krmených směsí s extrahovanou sojovou moukou (32,5 %), kukuřicí (29 %) a pšenicí (29 %). Měření proběhla v 2. týdnu věku kuřat. Výsledky jsou v této tabulce:

Tabulka 3: **Obsah fytátového a celkového fosforu v exkrementech kuřat, stravitelnost P fytátu a retence fosforu**

Kuře č.	Koncentrace (g/kg DM)		Stravitelnost P fytátu (%)	Retence P (%)
	P fytátu	Celkový P		
1	6,23	7,22	21,3	72,8
2	3,52	7,15	18,2	57,1
3	6,14	7,98	14,3	67,6
4	5,13	7,36	24,6	38,4
5	4,23	7,11	32,3	66,0
6	6,88	8,73	35,0	73,0
7	7,35	9,71	4,5	28,6
8	5,69	9,04	4,5	74,1
9	5,40	8,10	19,6	59,5
10	8,53	10,03	19,5	58,9
Průměr ± SD	5,91 ± 1,47	8,24 ± 1,09	19,4 ± 10,1	59,6 ± 15,2

Fytátový P představoval v průměru 71,7 % celkového P exkrementů, byl tedy hlavní frakcí sloučenin P. Jeho stravitelnost byla jen 19,4 %. Pohybovala se v širokých mezích od 4,5 % do 35 %. Příspěvek fytasové aktivity krmiva k hydrolýze kyseliny fytové v trávicím traktu byl zjevně stejný, proto příčinou rozdílů mohla být rozdílná aktivita endogenní fytasy nebo rozdílná doba zdržení zažitiny v trávicím traktu. Doba zdržení v trávicím traktu koreluje s hmotností zvířat, ta byla velmi podobná. Větší význam proto přisuzujeme rozdílům v aktivitě fytasy endogenního původu. Tímto směrem jsme se zaměřili v pokusech s nosnicemi.

V prvním pokuse s nosnicemi jsme zjišťovali stravitelnost fytátového P a frakce P v exkrementech nosnic ISA Brown věku 21 a 47 týdnů, krmených dietou s obsahem pšenice (35,3%), kukuřice (30,3%) a extrahované sojové mouky (15,5%). V každé z obou skupin bylo 10 nosnic. Dieta obsahovala 4,99 g P a 1,58 g fytátového P v 1 kg (Marounek a kol. 2008b).

Tabulka 4: **Frakce P v exkrementech, retence P a stravitelnost P fytátu u nosnic věku 21 a 47 týdnů**

	Věk nosnic[1]	
	21 týdnů	47 týdnů
Hmotnost nosnic (g)	1560 ± 34	1916 ± 59*
Složení exkrementů		
celkový P (mg/g DM)	12,3 ± 0,7	14,8 ± 0,6*
fytátový P (mg/g DM)	3,8 ± 0,2	3,4 ± 0,1
fosfátový P (mg/g DM)	5,9 ± 0,7	8,9 ± 0,4*
Retence P (%)	37,4 ± 4,4	27,4 ± 1,9
Stravitelnost P fytátu (%)	38,7 ± 4,2	47,3 ± 3,1

[1]10 nosnic ve skupině
*P < 0,05

Intenzita snášky byla dvojnásobně vyšší u starších nosnic (1,00) než u mladších (0,52). Hlavní frakcí P v exkrementech nosnic byly fosfáty. Jejich koncentrace (rovněž koncentrace celkového P) v exkrementech byla u starších nosnic signifikantně vyšší. V koncentraci fytátového P rozdíl nebyl. Stravitelnost fytátového P byla u starších nosnic nesignifikantně vyšší. To se shoduje s názorem, že kuřata s vyšší hmotností lépe využívají fytátový P než kuřata s nižší hmotností (Punna a Roland, 1996). Příčinou může být delší doba zdržení zažitiny v trávicím traktu těžších ptáků, vyšší endogenní fytasová aktivita či změna střevní mikroflóry daná věkem. Druhý pokus s nosnicemi byl zaměřen na zodpovězení těchto otázek.

Použili jsme 22 nosnic ISA Brown věku 20 týdnů a 22 nosnic věku 47 týdnů, krmených dietou s kukuřicí (59,3 %) a extrahovanou sojovou moukou (20,5 %). Dieta obsahovala 6,01 g P a 2,15 g fytátového P v 1 kg (Marounek a kol. 2008a). Kromě parametrů, které jsme sledovali v předchozím pokuse jsme zjišťovali aktivitu fytasy v jednotlivých sekcích trávicího traktu. Zjišťovali jsme specifickou aktivitu (v 1 g) i celkovou (v dané sekci). Měření fytasové aktivity spočívalo v inkubaci vzorku zažitiny zředěné fyziologickým roztokem s fytátem a následném měření úbytku fytátu.

Tabulka 5: **Frakce P v exkrementech, retence P a stravitelnost P fytátu u nosnic věku 20 a 47 týdnů**

	Věk nosnic[1]	
	20 týdnů	47 týdnů
Hmotnost nosnic (g)	1604 ± 111	1843 ± 146*
Složení exkrementů		
celkový P (mg/g DM)	19 ± 2,7	20 ± 2,2
fytátový P (mg/g DM)	4,5 ± 0,6	3,1 ± 0,2*
fytátový P/celkový P	0,24 ± 0,04	0,15 ± 0,02*
Retence P (%)	27 ± 4	16 ± 5*
Stravitelnost P fytátu (%)	24 ± 9	53 ± 7*

[1]10 nosnic ve skupině
*P < 0,05

Tabulka 6: **Specifická a celková fytasová aktivita v trávicím traktu nosnic věku 20 a 47 týdnů**

Aktivita fytasy	Věk nosnic[1]	
	20 týdnů	47 týdnů
Specifická (v 1 g)		
vole	7 ± 5,2	11 ± 4,8
žaludek	3 ± 2,6	7 ± 4,4*
tenké střevo	14 ± 3,5	11 ± 4,4
mukosa ten. střeva	7 ± 3,7	12 ± 3,7*
slepá střeva	103 ± 9,0	143 ± 6,7*
Celková (v sekci GIT)		
vole	121 ± 85,6	152 ± 127,7
žaludek	47 ± 40,1	102 ± 84,2

tenké střevo	226 ± 120	264 ± 111
mukosa ten. střeva	121 ± 73	176 ± 107
Σ	515 ± 223	694 ± 236
slepá střeva	347 ± 121	632 ± 409*
Celková (v celém GIT)	862 ± 241	1326 ± 318*

[1]12 nosnic ve skupině

*P < 0,05

V tomto pokuse exkrementy starších nosnic obsahovaly signifikantně méně fytátového P a nalezli jsme u nich vyšší specifickou aktivitu fytasy v žaludku, mukose tenkého střeva a v slepých střevech. Celková fytasová aktivita v trávicím traktu starších nosnic byla o 60,5 % vyšší než u nosnic mladších, což lze připsat zejména větší hmotnosti starších nosnic a tudíž delší době zdržení v trávicím traktu. Současně ale starší nosnice měly větší specifickou aktivitu fytasy (vyjma obsahu tenkého střeva), což svědčí o maturaci trávicího traktu a změnách mikroflóry. Existují práce o postnatálním vývoji enzymových aktivit a mikroflory u drůbeže (Huhtannen a Pensack 1965, Tarvid 1995), jejich následný vývoj v dospělosti ale dosud nebyl sledován. Role slepých střev v hospodaření P zůstává nejasná. Pravděpodobně mají význam při hydrolýze kyseliny fytové, otázkou však je, zda se uvolněný fosfát vstřebá. Vyšší retenci P u mladších nosnic lze vysvětlit větší potřebou P pro mineralizaci kostí, jak též předpokládají Carlos a Edwards (1998).

Souhrn

Brojlerová kuřata ve věku 2 týdny měla nízkou stravitelnost fytátového P (19,4% v průměru) a vysoký obsah fytátového P v exkrementech (71,7% celkového P). U nosnic byla stravitelnost fytátového P větší a zvyšovala se s věkem (až 53% ve věku 47 týdnů). Vyšší stravitelnost zřejmě souvisí s větší hmotností starších nosnic a s tím související větší celkovou fytasovou aktivitou přítomnou v trávicím traktu. Starší nosnice měly i vyšší specifickou fytasovou aktivitu obsahu žaludku, slepých střev a mukosy tenkého střeva což naznačuje vývoj trávicích funkcí s věkem a možné změny složení střevní mikroflóry.

Literatura

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 18th Edition. Gaithersburg, MD, 2005.

Carlos A.B., Edwards Jr.H.M.: The effects of 1,25-dihydrocholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. Poult. Sci. 77, 850-858, 1998.

Dušková D., Marounek M., Březina P.: Determination of phytic acid in feeds and faeces of pigs and poultry by capillary isotachophoresis. J. Sci. Food Agr. 81, 36-41, 2001.

Eeckhout W., De Paepe M.: Total phosphorus, phytate phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. Anim. Feed Sci. Tech. 47, 19-29, 1994.

Huhtannen C.N., Pensack J.M.: The development of the intestinal flora of the young chick. Poult. Sci. 44, 825-830, 1965.

Marounek M., Bubancová I., Podsedníček M., Lukešová D., Ramadan M.A.: Activity of phytate dephosporylation in cereals, legumes and oilseeds determined by colourimetric and isotachophoretic method. J. Anim. Feed Sci. 20, 472-479, 2011.

Marounek M., Skřivan M., Dlouhá G., Břeňová N.: Availability of phytase phosphorus and endogenous phytase activity in the digestive tract of laying hens 20 and 47 weeks old. Anim. Feed Sci. Techn. 146, 353-359, 2008a.

Marounek M., Skřivan M., Dlouhá G., Březina P.: Digestibility of phosphorus in laying hens fed a wheat-maize-soybean diet and the excreta phosphorus fractions. J. Anim. Feed Sci. 17, 579-587, 2008b.

Punna S., Roland D.A.: Variation in the utilization of phytate phosphorus within the same strain of broilers. Poult. Sci. 75 (Suppl. 1), 140, 1996.

Ravindran V., Bryden W.L., Kornegay E.T.: Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. Poult. Avian Biol. Rev. 6, 125-143, 1995.

Skřivan M., Kalachnyuk G.I., Dušková D., Skřivanová V., Savka O.G., Marounek M.: Digestibility of phytate phosphorus in broiler chickens determined by isotachophoretic method. Sci. Mess. Lviv State Acad. Vet. Med. 4 (1), 38-42, 2002.

Tarvid I.: The development of protein digestion in poultry. Poult. Avian Biol. Rev. 6, 35-54, 1995.

Název: SOUČASNÉ POZNATKY VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT VE VZTAHU K BEZPEČNOSTI PRODUKTŮ A K ŽIVOTNÍMU PROSTŘEDÍ

Vydal: **Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhříněves

ISBN 978-80-7403-095-6

Vydáno bez jazykové úpravy.

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhříněves