

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

---

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE  
Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie  
Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

a

Koordinační místo pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA v ČR,  
Ministerstvo zemědělství

a

Časopis MASO – odborný časopis pro obor zpracování masa

## XXVI. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

Sborník příspěvků

VETUNI Brno, 5. 6. 2024



Elektronický sborník byl vydán 5. 6. 2024

Editace: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.  
doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D.  
doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.  
Mgr. Alena Zouharová, Ph.D.

ISBN 978-80-7305-957-6

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.

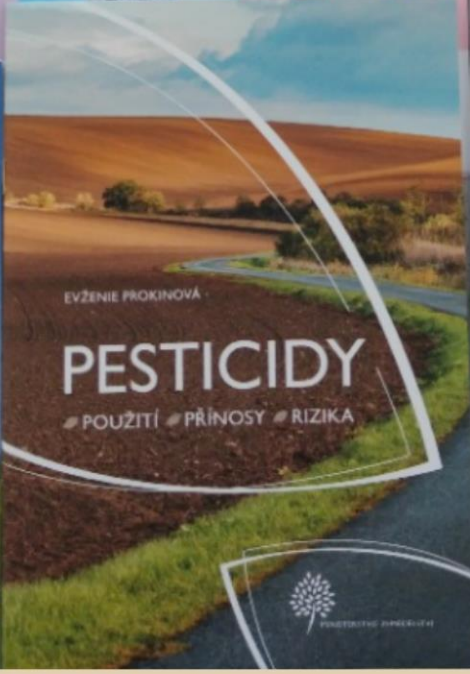


## OZNAČOVÁNÍ POTRAVIN

Infografiky



## MODE TECHNOLO V KOS VÝ A ZEMĚD



## OBSAH

### SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

<b>Use of the fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) for the detection of oxidative stress in dried plant matrices</b> Křištofová, K., Pospiech, M. ....	5
<b>Optimizing Insect Analysis with Raman Spectroscopy: Assessing Polar Solvents Suitability and pH Impact</b> Čaloudová, J., Pospiech, M. ....	8
<b>Production of Soaps of used fried oil and other by-products</b> Zayed, L., Dordevic, D., Tremlova, B. ....	11
<b>Vliv difosforečnanu tetradraselného na vybrané funkční vlastnosti taveného sýra</b> Šantová, K., Vincová, A., Kůrová, V., Kratochvílová, A., Salek, R. N. ....	16
<b>Vliv přídatku citrusové vlákniny na konzistenci termizovaných tvarohových sýrů</b> Vincová, A., Šantová, K., Salek, R. N., Jaššo, M. ....	20
<b>Hodnocení vlivu obsahu šťávy z černého rybízu a furcellaranu na vybrané fyzikálně-chemické, reologické a senzorické vlastnosti fermentovaných syrovátkových nápojů</b> Rejdllová, A., Lorencová, E., Salek, R. N. ....	25

### SEKCE 2: CHOV ZVÍŘAT, VÝŽIVA ZVÍŘAT A BIOCHEMIE

Do této sekce nebyly přihlášeny žádné příspěvky

### SEKCE 3: OCHRANA ZVÍŘAT, WELFARE A ETOLOGIE

<b>Measurement of temperature of the canine eye in relation to the stress</b> Pokorná, V., Kotianová, L., Bedáňová, I., Voslářová, E. ....	33
<b>Assessing the influence of visual contact on acute stress responses during husbandry procedures in Wallachian sheep</b> Kotianová, L., Lakomá, T., Vacušková, Z., Vacuška, D., Voslářová, E., Večerek, V. ....	36
<b>Využití obohacení prostředí u morčat v zájmovém chovu – pilotní studie</b> Vacušková, Z., Vacuška, D., Večerek, V. ....	39
<b>Současná situace v problematice využití enrichmentu v chovech králíků</b> Lakomá, T., Večerek, V. ....	42

<b>Behaviorální projevy psů v průběhu canisterapeutických zkoušek</b> Vacuška, D., Vacušková, Z., Večerek, V. ....	45
<b>Vliv gabapentinu na raná vývojová stádia kapra obecného (<i>Cyprinus carpio</i>)</b> Hesová, R., Doubková, V., Riesová, B., Svobodová, Z., Zicarelli G., Lakdawala, P. ....	48
<b>Vliv pohlaví na chování kříženců masného skotu na zimovišti</b> Procházková, H. ....	51
 <b>SEKCE 4: VEŘEJNÉ A SOUDNÍ VETERINÁŘSTVÍ A TOXIKOLOGIE</b>	
<b>Výskyt glyfosátu a jeho hlavního metabolitu AMPA v řece Labi v období let 2009-2019</b> Koriakina, E., Blahová, J., Svobodová, Z. ....	55
<b>Xenoestrogenní vliv bisfenolu A a jeho analogu bisfenolu F na koncentraci vitellogeninu u pstruha duhového (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)</b> Stoklasová, V., Koriakina, E., Blahová, J., Svobodová, Z. ....	58
<b>Vliv tebukonazolu na vývoj kapra obecného (<i>Cyprinus carpio</i>)</b> Riesová, B., Doubková, V., Hesová, R., Svobodová, Z., Zicarelli, G., Lakdawala, P. ....	61
 <b>SEKCE 5: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE A CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT</b>	
<b>Genomics of multi-resistant <i>Escherichia coli</i> circulating in a colony of gulls: Dynamics of colonizing strains displays importance of longitudinal wildlife studies</b> Růžičková, M., Nešporová, K., Palkovičová, J., Krejčí, Š., Literák, I., Dolejská, M. ....	65
<b>Impact of haemogregarines on differential white blood cell count in tortoises of the genus <i>Testudo</i></b> Živčicová, Ž., Škrábal, J., Široký, P. ....	68
<b>Health issues in farmed African catfish</b> Toulová, I., Mikulíková, I., Papežíková, I., Novotná, H., Baďouchová, H., Palíková, M. ....	71
<b>Microscopic examination genus <i>Dactylosoma</i> in <i>Pelophylax esculentus</i> complex from Slovakia</b> Bondarenko, P., Mikulíček, P. ....	74
<b>Antibiotic resistant <i>Citrobacter</i> spp. in wastewater and surface water</b> Laušová, J., Sukkar, I., Davidová Gerzová, L., Dolejská, M. ....	76
<b>Dynamické změny v plazmidomu a rezistomu v gastrointestinálním traktu kuřat</b> Rysava, M., Palkovicova, J., Cejkova, D., Aytan-Aktug, D., Otani, S., Dolejská, M. ....	79

---

<b>Luňáci červení ze střední Evropy předvádí jedinečnou migrační smyčku přes Jaderské moře</b>	
Škrábal, J., Raab, R., Literák, I. ....	82
<b>Molekulární a sérologická detekce <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato u drobných volně žijících savců</b>	
Kozlíková, E., Bártová, E., Žáková, A. ....	85

# **SEKCE 1**

## **Hygiena a technologie potravin**

## Use of the fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) for the detection of oxidative stress in dried plant matrices

Kateřina Křiřtofov, Matej Pospiech

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

### Summary

*The aim of this work was to detect the level of total oxidative stress in dried plant matrices. Dried leaves of green barley and matcha green tea in powder form were selected for analysis. The samples, fixed on a slide using glycerol gelatin, were incubated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe for 30 min without light access and then analyzed using Leica DM5500 microscope with Leica K5 fluorescence camera and  $\lambda_{ex}$  504 nm;  $\lambda_{em}$  524 nm fluorescence cube. The analysis showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between the control group of dried green barley sample and the group of samples treated with the fluorescent probe, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was also observed in the case of barley and matcha tea samples with probe application. However, in the case of matcha green tea, no significant differences were observed between the samples. The 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe appears to be a sensitive method for the determination of total ROS levels in plant samples, also suitable for dried green barley matrix.*

**Keywords:** *oxidative stress; DCFHDA; fluorescent microscopy; plant matrices*

### Introduction

Oxidative stress can be defined as an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defences of the cell. It is a consequence of an excess of ROS (Kotha et al., 2022). Detection and monitoring of oxidative stress plays a role in the quality control of plant-derived foods during processing and storage. Oxidative reactions can adversely affect the nutritional value, sensory properties and shelf life of foods due to damage to macromolecules such as lipids, proteins and antioxidants (Ehrenbergerova et al., 2009). Dried plant matrices are particularly susceptible to oxidative damage. During drying, loss of antioxidant capacity and generation of ROS can occur due to high temperatures and oxygen exposure. Subsequent storage can also initiate oxidative chain reactions leading to spoilage and deterioration of nutritional and sensory properties. The use of DCFH-DA probes allows monitoring these changes and optimizing processing and storage conditions to minimize oxidative stress (Meitha et al., 2020).

One of the techniques used to detect oxidative stress is the use of the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe. This molecular probe is non-fluorescent until it is deacetylated by cellular esterases to a non-fluorescent compound, which is further oxidized in the presence of reactive oxygen species (ROS) to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Thus, the increased fluorescence of DCF indicates the increased presence of ROS, which are important markers of oxidative stress (Kim, 2020). The DCFH-DA method has a number of advantages such as high sensitivity, ease of use, ability to detect a wide range of ROS and the ability to perform analyses in the presence of cells or high spatial resolution in the case of microscopic imaging techniques (Gomes et al., 2005).



## Material and methods

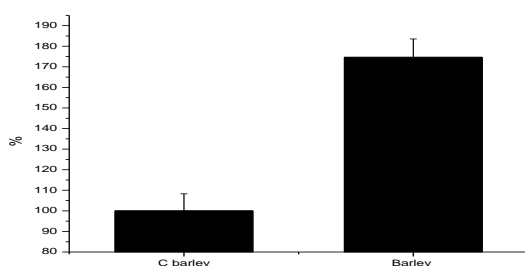
Samples of dried green barley leaf juice and dried matcha green tea leaves in powdered form were selected for analysis. The samples were fixed on a glass slide using glycerol white in the amount of 0.3g. A stock solution of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) was dissolved using dimethyl sulfoxide at a concentration of 20  $\mu\text{M}$ . The samples were washed in phosphate buffered saline (PBS). The DCFH-DA solution was applied to the samples in a volume of 0.5 ml. Subsequently, the samples were incubated for 30 min without daylight. The control did not contain DCFHDA solution. The samples thus prepared were subjected to analysis. Sample preparation and measurements were performed at room temperature with no light access.

Samples were analyzed using a DM5500 microscope with a Leica K5 fluorescence camera. The microscope was equipped with a  $\lambda_{\text{ex}}$  504 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  524 nm fluorescence cube. Samples were imaged through a 40x objective. The images were analyzed using LAS X software (Leica Microsystems, Germany). Statistical analysis of the results was performed using Microsoft Office Excel software - XLSTAT (Lumivero, USA), Kruskal-Wallis test. The significance level was set at 0.05. Results are presented as the mean of 4 measurements.

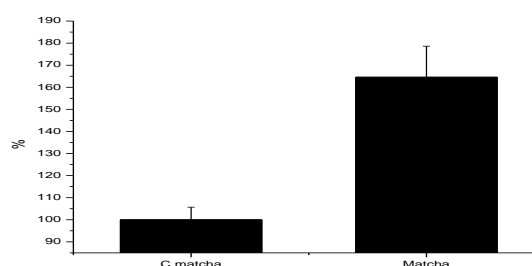
## Results and Discussion

Oxidative stress in dried samples of green barley and matcha green tea was determined using the DCFH-DA fluorescent probe. The fluorescence intensity of the 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) formed after DCFH oxidation served as an indicator of the presence of reactive oxygen species (ROS) inducing oxidative damage.

An increase in fluorescence signal intensity of  $74.65 \pm 8.89\%$  was observed in the group of green barley samples treated with DCFH-DA (Figure 1) compared to the control. In the case of matcha green tea samples, an increase of  $64.7 \pm 5.7\%$  (Figure 2) was observed after DCFHDA application compared to the control. By applying DCFH-DA solution, significant differences of  $p < 0.05$  were observed between green barley tea sample group and control. These interactions were recorded 30 minutes after probe application. A statistically significant difference of  $p < 0.05$  was also recorded between green barley and matcha tea samples after DCFHDA application. The differences between green tea samples showed no statistically significant difference  $p > 0.05$ .



**Graf 1** Fluorence intensity of green barley



**Graf 2** Fluorence intensity of matcha

The significantly higher level of DCF fluorescence in the DCFH-DA treated sample compared to the untreated control indicates the presence of increased oxidative stress and ROS accumulation in green barley shoots. This finding is in line with expectation as DCFH-DA acts as a molecular probe specifically reacting with ROS to produce highly fluorescent DCF. In the case of green barley shoots, their formation could have been

promoted by metabolic processes during germination and growth (Ehrenbergerova et al., 2009).

The measured DCF fluorescence values provide an indication of the level of oxidative stress. A significantly lower level in the control sample without DCFH-DA indicates a natural basal level of ROS, whereas a significant increase in the treated sample indicates higher oxidative stress caused by the exogenously added DCFH-DA probe. The results confirm the suitability of the DCFH-DA probe as an analytical tool for the detection of oxidative stress in plant matrices.

### Conclusion

The aim of this work was to detect the level of oxidative stress using DCFH-DA. Statistically significant differences were found between the sample groups after DCFH-DA treatment and the control samples. Thus, the use of the DCFH-DA fluorescent probe for the detection of oxidative stress in dried plant matrices is a valuable analytical method. This provides an indicator of the degree of oxidative damage that can adversely affect the nutritional value, sensory and shelf life of these products.

### References

- GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2005, vol. 65, no. 2-3, p. 45-80.
- MEITHA, K.; PRAMESTI, Y.; SUHANDONO, S.; CASTILLO, A. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *International Journal of Food Science*. 2020, p. 1-11.
- KIM, H.; XUE, X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *Journal of Visualized Experiments*. 2020, vol. 16.
- EHRENBERGEROVÁ, J.; BŘEZINOVÁ B.; KOPÁČEK, N.; MELIŠOVÁ, J.; HRSTKOVÁ, L.; MACUCHOVÁ, P.; VACULOVÁ, K.; PAULÍČKOVÁ, I. Antioxidant Enzymes in Barley Green Biomass. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2009, vol. 64, no. 2, p. 122–128.
- KOTHA, R. R.; TAREQ, F. S.; YILDIZ, E.; LUTHRIA, D. L. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*. 2022, vol. 11, no. 12.

**Contact address:** Kateřina Křištofová, Mgr., Department of Plant Origin Food Sciences, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21281@vfu.cz

# Optimizing Insect Analysis with Raman Spectroscopy: Assessing Polar Solvents Suitability and pH Impact

Jana Čaloudová, Matej Pospiech

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

## Summary

The main objective of this study was to investigate the suitability of polar solvents and their pH influence on extracting selected edible insects for their detection by Raman spectroscopy. Dried specimens of *Acheta domesticus* (house cricket), *Zophobas morio* L. (superworm), and *Tenebrio molitor* L. (mealworm) were analysed. Extraction utilized four polar solvents at specified pH levels: distilled water (pH 7.0), PBS (Phosphate Buffered Saline; pH 2.4, 7.4, 9.4), TBS (Tris Buffered Saline; pH 7.4), and Citrate Buffer (pH 6), in a 1:5 solvent-to-sample ratio. Raman spectroscopy verified the discernibility of solvents from insect samples, thus validating their appropriateness for detection purposes. Through the recording of Raman spectra of detected insects and subsequent statistical analysis, it was determined that PBS at pH 9.4 was the most suitable solvent, characterized by the highest signal attenuation and optimal peak resolution, even when applied to closely related insect species.

**Keywords:** extraction; distilled water; PBS; TBS; Citrate Buffer; *Tenebrio molitor*; *Zophobas morio*; *Acheta domesticus*

## Introduction

The detection of edible insects in the food industry has garnered significant attention due to escalating concerns regarding food adulteration. Raman spectroscopy, increasingly employed in biological research, is a light scattering technique that produces molecular fingerprints through the distinctive scattering of monochromatic light, typically in the near-infrared (NIR), visible, or ultraviolet (UV) range, depending on the type of analyser. This scattering mechanism relies on the vibrational modes of molecules, enabling inference of the composition and native structure of the samples under investigation (Butler et al., 2016; Woodrow et al., 2024). The selection of a suitable solvent is crucial for sample preparation in Raman spectroscopic analysis. Previous research comparing the suitability of polar and non-polar solvents has indicated that polar solvents are more effective for preparing edible insect samples for analysis. In this study, we aimed to focus on optimizing insect analysis with Raman spectroscopy by assessing the suitability of different polar solvents, focusing on the effect of their pH.

## Material and methodology

Samples of dried specimens of *Acheta domesticus*, *Zophobas morio* L., and *Tenebrio molitor* L. from the commercial market network were analysed. Dried insects were mixed with a hand mixer (Bosch, Germany) and then extracted using four polar solvents at specified pH levels: distilled water (pH 7.0), PBS (Phosphate Buffered Saline; pH 2.4, 7.4, 9.4), TBS (Tris Buffered Saline; pH 7.4), and Citrate Buffer (pH 6), in a 1:5 solvent-to-sample ratio (2 g mixed insects : 10 ml solvent). Extraction was performed in 15 ml centrifuge tubes placed in an ultrasonic water bath (Bandelin, Germany) for 15 min. Subsequently, the sample was centrifuged in a Centric 322A centrifuge (Domel, Slovenia) at 3000 rpm for 30 min, to separate the solid and fatty components and to recover the pure supernatant. Then, the supernatant was collected from the centrifuged sample and filtered through a CA 0.45 µm injection microfilter (Braun, Germany) into 4 ml vials. The sample thus prepared was subsequently analysed by a Raman spectroscope HR-TEC-X2-785 (StellarNet, USA). Since the samples lacked detailed Raman characterization prior to this analysis, spectra were

initially collected over the wavenumber range of 100 to 2000  $\text{cm}^{-1}$ . A laser (Ondax, Germany) with a wavelength of 785 nm, power of 91 mW and 80 % intensity was used. Each of the individual samples was scanned, averaging 8 times. Depending on the sample character, an integration time from 500 to 2000 ms was used. The data were then statistically evaluated using Microsoft Office Excel and XLSTAT software (Lumivero, USA) using discrimination analysis (DA).

### Results and discussion

Polar solvents with different pH were used in the experiment. Raman spectroscopy provides results in the form of a spectral curve in the range of the measuring analyser. The method monitors the shift of the Raman spectroscopy response from the reference value, which occurs due to interactions between the analytes. For each wavenumber, the intensity of the shift is obtained, which is specific to a certain property of the analytes or their chemical structure. It has been confirmed that Raman spectroscopy can separate polar solvent peaks from wavenumbers specific to the insect species detected. It was confirmed that the use of different pH solvents has an effect on the results obtained. Based on the recording of Raman spectra of the detected insect species, it was shown that PBS at alkaline pH 9.4 was the most suitable solvent for insect extraction, as the highest signal attenuation occurred, with the best peak resolution, even for related ZM and TM species (Figure 1). The suitability of the pH of the chosen solvent is also highlighted by the study of Ji et al. (2014), for whom a PBS solution at pH 2.0 was most suitable for the analysis of other animal products (milk powder and chicken meat) by surface-enhanced Raman spectroscopy.

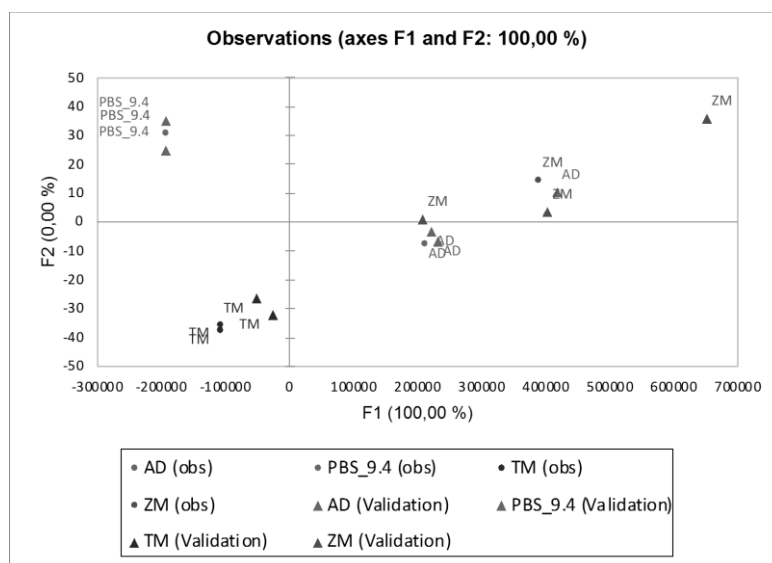


Figure 1: Discrimination analysis of insects dissolved PBS at pH 9.4 (TM – *Tenebrio molitor* L., ZM – *Zophobas morio* L., AD – *Acheta domesticus*)

The results of discrimination analysis for PBS pH 9.4 also showed 100% accuracy for the training sample, 50% for cross-validation, and 80% for the validation sample, indicating good performance of the model on the training data but lower performance on new data. The high accuracy of 100% on the training sample suggests a robust performance of the DA model, albeit with a decrease in accuracy to 50% on cross-validation and an increase to 80% on the validation sample, highlighting the need for further refinement or validation of the model. In contrast, the confusion matrix parameter for the cross-validation results for dissolution in PBS at pH 7.4 was only 33.3% and for PBS at pH 2.4 was only 16.7%. TBS at pH 7.4 performed

in DA also well, achieving 100% accuracy for both the training and validation samples. However, its accuracy dropped significantly to 16.7% when tested on the cross-validation sample. This indicates that while the TBS solution at pH 7.4 is effective for classifying the training and validation samples, it may not generalize well to new, unseen data.

The suitability of Raman spectroscopy for the analysis of the presence and structure of insect proteins is confirmed also in a study by Woodrow et al. (2024). Raman spectroscopy has been shown to be an effective method for in situ characterization of insect tissues. Raman allowed the identification of resilin- and cuticle protein-rich tissues based on differences in their Raman spectra. The study demonstrated that it was possible to identify the Raman spectrum from the outer cuticle, but also penetrate deeper into the sample to identify the characteristic spectrum of naphthalene. This provides evidence of Raman's capability to investigate Raman-active biomolecules within the insect body.

Integrating Raman spectroscopy with other methods, such as fluorescence spectroscopy, which could enable rapid monitoring of the composition of edible insects, may represent a powerful approach for assessing the composition and quality of insect-based foods (Rossi et al., 2021).

### Conclusion

In conclusion, it was shown that Raman spectroscopy can be used to discriminate the detected insect species dissolved in different solvents based on the spectra obtained. The most suitable polar solvent for this method was PBS at pH 9.4, for which the most pronounced distribution of signal peaks was observed. The chosen methodology could be useful in the future for the detection of food adulteration with declared insect content. It is also important to investigate the effect of measuring the Raman spectrum in different settings. The present study in Raman spectroscopy optimization for insect detection contributes to the advancement of methodologies in food safety and quality assurance, with potential implications for broader contexts such as entomophagy and sustainability. To improve the method, it would be useful to increase the number of samples with different insect species and to verify the effect of the matrix of multi-ingredient foods on their detection.

### References

- BUTLER, H. J.; ASHTON, L.; BIRD, B.; CINQUE, G.; CURTIS, K.; DORNEY, J.; ESMONDE-WHITE, K.; FULLWOOD, N. J.; GARDNER, B.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; WALSH, M. J.; MCAINSH, M. R.; STONE, N.; MARTIN, F. L. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*. 2016, vol. 11, no. 4, p. 664–687.
- JI, W.; WANG, L.; QIAN, H.; YAO, W. Quantitative Analysis of Amoxicillin Residues in Foods by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Spectroscopy Letters*. 2014, vol. 47, no. 6, p. 451–457.
- ROSSI, G.; DUREK, J.; OJHA, S.; SCHLÜTER, O. K. Fluorescence-based characterisation of selected edible insect species: Excitation emission matrix (EEM) and parallel factor (PARAFAC) analysis. *Current Research in Food Science*. 2021, vol. 4, p. 862–872.
- WOODROW, C.; CULLEN, D. A.; MONTEALEGRE-Z, F.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, J. Non-invasive characterization of the elastic protein resilin in insects using Raman spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, vol. 254, art. n. 127967.

**Contact address:** Jana Čaloudová, Mgr. Ing., Department of Plant Origin Food Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic. E-mail: H21289@vfu.cz

---

## Production of Soaps of used fried oil and other by-products

Leila Zayed, Dani Dordevic, Bohuslava Tremlova

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

### Summary

*Frying is a widely practiced culinary method globally, resulting in the annual production of approximately 200 million tons of frying vegetable oils, a figure that tends to increase. Even a minimal discharge of waste oil into water can contaminate amounts of freshwater and pose health risks, including cardiovascular ailments. There is considerable potential to utilize waste frying oil in various applications, including lubricants, resins, and soaps. Homemade soap production through saponification offers a promising solution. This study aims to evaluate the potential effects on the Physicochemical Properties of the Soap by adding other by-products to homemade soaps such as Orange peels and spent coffee ground. In this study were applied certain methodologies such as the preparation of samples and assessment of the Physicochemical Properties of the Soap, such as total fat matter, solubility, and foaming. The results show that soaps with OP and SCG did not differ statistically from the control samples when it came to **TFM**, as well as the highest **foaming** rate was recorded for the sample with the addition of 1% orange powder OP1%. **Solubility** was 100% for all samples, which indicates that the non-soluble waste of cooking oils that were fortified with SCG and OP was turned into a 100% water-soluble product.*

**Keywords:** *Saponification, Byproducts utilization, oil utilization, waste frying oil, soap foaming, soap TFM*

### Introduction

The escalating global population is driving an upsurge in waste generation, underscoring the burgeoning significance of reverse logistics systems (Antonic et al., 2021). Among the waste streams, used frying oil emerges as a notable byproduct with adverse environmental implications (Panadare & Rathod, 2015). Frying is a prevalent culinary practice worldwide (Mannu et al., 2020), and in line with the World Health Organization recommendations of 20–25 kg/year per capita edible oil consumption (Panadare & Rathod, 2015). Even a 1-liter discharge of waste oil into the water can contaminate up to 500,000 liters of freshwater (Panadare & Rathod, 2015), (Gökalp & Uz, 2019) and pose health risks, including cardiovascular ailments for frequent consumers of fried oils (Mannu et al., 2020).

While a considerable portion of industrial and restaurant waste frying oil undergoes collection and repurposing (Lopes et al., 2019), a significant quantity, particularly from households, remains inadequately managed. Consequently, a notable fraction of this waste infiltrates sewage systems, precipitating environmental and economic quandaries. The presence of oil-laden wastewater engenders substantial environmental hazards, imperiling groundwater reservoirs, aquatic ecosystems, agricultural practices, potable water access, and ultimately, human well-being (Ladet et al., 2021).

While a considerable portion of industrial and restaurant waste frying oil undergoes collection and repurposing, a significant quantity, particularly from households, remains inadequately

managed (Shahbandeh, 2024). Consequently, a notable fraction of this waste infiltrates sewage systems, precipitating environmental and economic quandaries. The presence of oil-laden wastewater engenders substantial environmental hazards, imperiling groundwater reservoirs, aquatic ecosystems, agricultural practices, potable water access, and ultimately, human well-being (Ladet et al., 2021).

Today, there exists significant potential for repurposing waste frying oil as an affordable resource in various applications such as biodiesel, lubricants, resins, and soaps, among others, including bitumen rejuvenation or as a component in fermentation media (Panadare & Rathod, 2015), (Gökalp & Uz, 2019). Finding ways to utilize waste frying oils originating from households is crucial. One viable solution could involve producing homemade soaps, (Maotsela et al., 2019), which requires minimal energy and generates virtually no byproducts through the saponification process. Consequently, this approach is hailed as a green technology with promising prospects (Félix et al., 2017).

## Material and methods

### -Sample Preparation

The soap samples were crafted through cold saponification, incorporating used/fried oil and supplemented with orange peel and spent coffee grounds (SCG). The production methodology adhered to the cold saponification procedure initially outlined by Adigun et al. (Adigun et al., 2019), with minor adjustments. Specifically, 130 grams of filtered oil were amalgamated with 66.92 grams of a 26% (w/w) NaOH water solution using a blender for 3 to 5 minutes. Subsequently, the resultant blend was poured into molds and left to mature in ambient conditions for 24 hours. Following a four-week maturation period, the soap samples were ready for analysis. Additionally, SCG and orange peels were incorporated into the soap samples at varying concentrations of 1%, 2.5%, and 5%.

Table 1. The description of the samples

Samples	Ingredients
Control	130 g fried oil + NaOH
OP1%	130 g fried oil + NaOH + 1 % range peel
OP2.5%	130 g fried oil + NaOH + 2.5 % range peel
OP5%	130 g fried oil + NaOH + 5 % range peel
SPG1%	130 g fried oil + NaOH + 1 % spent coffee grounds
SPG2.5%	130 g fried oil + NaOH + 2.5 % spent coffee grounds
SPG5%	130 g fried oil + NaOH + 5 % spent coffee grounds

### -Physicochemical parameters measurement

The physicochemical parameters studied on soap samples included: total fat matter, foaming, solubility

Foam production and stability were evaluated following the methodology described (Antonic et al., 2021). Specifically, 20 mL of a 0.5% soap solution underwent 30 seconds of homogenization within a 400 mL low-form glass beaker, using the HG-15A homogenizer manufactured by Witeg in Wertheim, Germany. The homogenization process occurred at approximately 13,500 RPM, employing the HT1025 dispersing tool. Foam volume was measured immediately after mixing and again after 30 minutes. The foaming capacity was determined using the following formula:

$$\% \text{ Foaming capacity} = (V(\text{after homogenization}) - V(\text{initial solution})) / V(\text{initial solution}) \times 100 \quad (3)$$

The foam stability was calculated using the formula:

$$\% \text{ Foam stability} = V(\text{foam after 30 min}) / V(\text{foam after homogenization}) \times 100$$

To determine the total fat content, a 10 g sample of soap was dissolved in hot ethanol that had been neutralized, and then filtered. The residue left on the filter indicated the portion of the material that was not soluble in alcohol, referred to as Matter Insoluble in Alcohol (MIA). The MIA value was determined by drying and weighing the filter, and the total fat content was calculated using a specific formula.

$$\% \text{ Total fat matter} = (100 - (\text{moisture content} + \text{MIA})) / 1.085$$

In this scientific investigation, we commenced by procuring three distinct samples, each containing a 1% soap solution infused with orange peels, all prepared in distilled water. Specifically, these solutions were derived by dissolving 1 gram of soap in 100 milliliters of distilled water. Subsequently, we determined the mean value across these samples and subjected the data to analysis of variance (ANOVA) to compute the standard deviation. Furthermore, to expand our study, we extended the same procedural approach to formulate soap solutions containing orange peels at concentrations of 2.5% and 5%. In parallel, an additional set of soap samples was prepared, this time incorporating coffee grounds into the soap mixture. The integration of coffee grounds was executed at various concentrations, leading to the creation of multiple soap samples with coffee grounds. Following this preparation, three independent samples were drawn for each concentration, and their respective means were calculated and subsequently subjected to ANOVA analysis to ascertain the associated standard deviations.

## Results

The results for foaming properties, moisture content and solubility are present in Table 3. Foaming is one of the most important properties involved in the cleaning properties of soap. These characteristics can be explained by considering the fatty acid compositions of the oils utilized in soap formulation. For instance, the presence of saturated fatty acids like lauric acid



and myristic acid is known to produce soap with fluffy lather and high cleansing power (Awang et al., 2001), (Legesse, 2020). The highest foaming rate was recorded for the sample with the addition of 1% orange powder OP1% and the lowest after the addition of 1% coffee grounds SPC1%. Solubility was 100% for all samples, which indicates that the non-soluble waste of cooking oils that were fortified with SCG and OP was turned into a 100% water-soluble product (Rahayu1 et al., 2021).

Table 2. Total fat matter and foaming of soaps produced with the addition of orange peel and spent coffee ground

Samples	Foaming (%)	Total Fat Matter
Control	129 ± 27	91.17 ± 0.61
OP 1%	148 ± 27.53	91.59 ± 0.26 <sup>a</sup>
OP 2.5%	123 ± 16.58	91.90 ± 0.02 <sup>a</sup>
OP 5%	126 ± 23.93	91.83 ± 0.04 <sup>a</sup>
SPG 1%	125 ± 9.128	90.61 ± 0.16 <sup>b</sup>
SPG 2.5%	105 ± 16.83	91.55 ± 0.06 <sup>a</sup>
SPG 5%	125 ± 33.41	91.16 ± 0.36

\*Different lowercase letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between rows: (a, b, c, d, e, f)

## Conclusion

Our results emphasize issues concerning the disposal of used frying oil, spent coffee grounds, and orange peels, mainly accumulated by culinary preparations in homes and restaurants. Soap production from used/fried different types of culinary oils represents an alternative, more ecological treatment of the waste that can be indubitably harmful to the environment. The study highlighted the different chemical properties of soaps produced from fried oil. No significant difference was found between the soaps without OP and SCG when it comes to TFM or Foaming Properties. Further study is needed about further physiochemical parameters as well as end customer satisfaction results.

## References

- Antonic, B., Dordevic, D., Jancikova, S., Tremlova, B., Nejezchlebova, M., Goldová, K., & Tremml, J. (2021, March 16). *Reused plant fried oil: A case study with home-made soaps*. MDPI. <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/3/529>
- Félix, S. F., Araújo, J., Pires, A. M., & Sousa, A. (2017, August 25). *Soap production: A green prospective*. Waste Management. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956053X1730291X?via%3Dihub>

- Gökalp, İ. G., & Uz, V. E. (2019, October 20). *Utilizing of waste vegetable cooking oil in bitumen: Zero tolerance aging approach*. *Construction and Building Materials*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950061819321130?via%3Dihub>
- Ledet, J., Campbell, H., Byrne, M., & Poore, A. G. B. (2021, July 22). *Differential tolerance of species alters the seasonal response of marine epifauna to extreme warming*. *Science of The Total Environment*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969721042881>
- Lopes, M., Miranda, S. M., & Belo, I. (2019, December). *Microbial valorization of waste cooking oils for valuable ...* [https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/67282/1/document\\_52349\\_1.pdf](https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/67282/1/document_52349_1.pdf)
- Mannu, A., Garroni, S., Ibanez Porras, J., & Mele, A. (2020, March 22). *Available technologies and materials for waste cooking oil recycling*. MDPI. <https://www.mdpi.com/2227-9717/8/3/366>
- Maotsela, T., Danha, G., & Muzenda, E. (2019, August 14). *Utilization of waste cooking oil and tallow for production of toilet "bath" soap*. *Procedia Manufacturing*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2351978919309862>
- Panadare, D. C., & Rathod\*, V. K. (2015, July 1). *Applications of waste cooking oil other than biodiesel: A Review*. *Iranian Journal of Chemical Engineering(IJChE)*. [https://www.ijche.com/?\\_action=articleInfo&article=11253](https://www.ijche.com/?_action=articleInfo&article=11253)
- Yuarini, D. A. A., Putra, G., Wiranatha, A. S., & Wrasati, L. P. (n.d.). *Production and added value of waste cooking oil product derivatives in the Bali Province*. *Advances in Food Science, Sustainable Agriculture and Agroindustrial Engineering (AFSSAAE)*. <https://afssaae.ub.ac.id/index.php/afssaae/article/view/105>

## Vliv difosforečnanu tetradraselného na vybrané funkční vlastnosti taveného sýra

### Effect of tetrapotassium diphosphate on selected functional properties of processed cheese

<sup>1</sup>Šantová Kristýna, <sup>1</sup>Vincová Anna, <sup>1</sup>Kůrová Vendula, <sup>1</sup>Kratochvílová Alena, <sup>1</sup>Salek Richardos Nikolaos

<sup>1</sup>Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Česká republika

#### Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of tetrapotassium diphosphate ( $K_4P_2O_7$ ; DFD) addition on the physicochemical, viscoelastic and sensory properties of processed cheese (PC; 40 % w/w dry matter and 50 % w/w fat). DFD was used in concentrations of 1.5-3.0 % w/w with a concentration shift of 0.5 % w/w. Sampling was performed on the 30<sup>th</sup> day of storage ( $6 \pm 2$  °C). The pH values of the PC increased gradually with increasing amount of emulsifying salt in the sample. All model PC samples behaved as gels exhibiting a more elastic behavior ( $G' > G''$ ,  $\tan \delta < 1$ ). It was also found that the viscoelastic moduli  $G'$  and  $G''$  increased with the increasing frequency. In addition, no bitterness was detected in any of the PC samples examined. From the results obtained, it can be concluded that the functional properties of the tested PC samples were influenced by the tested concentration of DFD. The 2 % w/w concentration of DFD was found to be the most effective in increasing PC rigidity without bitterness and off-flavours.

**Keywords:** processed cheese; potassium diphosphate; emulsifying salts; functional properties

#### Úvod

Tavený sýr (TS) je komplexní vícesložkový mléčný systém popsáný jako stabilní emulze olej ve vodě. Záhřevem přírodního sýru, másla a vody za přítomnosti tavicích solí, stálého míchání a částečného vakua získáme produkt s prodlouženou trvanlivostí. Přítomnost tavicích solí v průběhu výroby TS je nezbytná pro zajištění homogenní a hladké konzistence výrobku (Salek et al., 2016; 2017). Použití draselných tavicích solí může pozitivně přispět ke snížení sodíku v TS, neboť jeho vysoký příjem zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. V TS je vysoký obsah sodíku (obvykle v množství  $> 1$  % w/w) ve formě NaCl a tavicích solí na bázi sodíku (citráty, fosfáty, a polyfosfáty) (Hoffmann et al., 2012; Chavhan et al., 2015).

Cílem předkládané studie bylo posoudit vliv difosforečnanu tetradraselného (DFD) v koncentracích 1,5-3,0 % w/w s koncentračním posunem 0,5 % w/w na fyzikálně-chemické, viskoelastické a senzorické vlastnosti TS (s obsahem sušiny 40 % w/w a obsahem tuku v sušině 50 % w/w).

#### Materiál a metodika

Modelové vzorky TS o cílové sušině 40 % w/w a tuku v sušině 50 % w/w byly vyrobeny pomocí přístroje Niromix (Nirosta s.r.o., Chlumeck nad Cidlinou, ČR). Nejdříve byl do přístroje dávkován přírodní sýr holandského typu (52 % w/w sušiny a 30 % w/w tuku v sušině, zralost 7 týdnů; Lacrum s.r.o., Valašské Meziříčí, ČR) nakrájený na kostky (20 × 20 × 20 mm) k dezintegraci (60 s při 3000 otáček/min), poté bylo přidáno máslo (85 % w/w sušiny, 83 % w/w tuku; Lacrum s.r.o., Valašské Meziříčí, ČR), tavicí sůl DFD o koncentracích (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 % w/w) a voda. Tavicí proces probíhal při  $90 \pm 1$  °C (výdrž 3

min., 3000 otáček/min). Horká tavenina byla nalita do hliníkových kelímků (průměr: 75 mm, výška: 27 mm, objem: 100 ml) a uzavřena hliníkovými víčky. Analýzy základních fyzikálně-chemických, viskoelastických a senzorických vlastností byly prováděny 30. den skladování ( $6\pm 2$  °C), přičemž 1. den byl dnem výroby.

Obsah sušiny byl stanoven podle ISO 5534 (ISO, 2004). Analýza byla pro každý vzorek provedena 6krát ( $n=6$ ). pH vzorků byla stanovena pomocí pH-metru Foodcare (HI 99161, Hanna Instruments, USA) vybaveného skleněnou vpichovou elektrodou. Analýza byla provedena vpichem do šesti různých míst každého vzorku ( $n=18$ ).

Stanovení viskoelastických vlastností bylo provedeno reometrem Thermo Scientific™ RheoStress 1 (HAAKE Bremen, Německo) za použití geometrie deska-deska ( $d$ : 35 mm, výška mezery: 1 mm) při hodnotě amplitudy smykového napětí 20 Pa. Zvolený frekvenční rozsah byl od 0,1 do 100,0 Hz. Měření probíhala za teploty  $20,0\pm 0,1$  °C. Analýza byla provedena pro každý vzorek 3krát ( $n=3$ ). Byl zaznamenán elastický ( $G'$ ) a viskózní ( $G''$ ) modul pružnosti, z kterých byl následně vypočten komplexní modul pružnosti ( $G^*$ ) podle rovnice:  $G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$  a tangens fázového úhlu delta ( $\tan \delta = G''/G'$ ). Hodnoty  $G^*$  a  $\tan \delta$  byly vyjádřené pro referenční frekvenci 1 Hz.

Senzorické hodnocení TS proběhlo v souladu s normou ISO 8586 (ISO, 2012) a ISO 8589 (ISO, 2007). Při hodnocení byla použita pětibodová hedonická stupnice (1 - vynikající; 3 - dobrý; 5 - nepřijatelný) pro vzhled a barvu, tvrdost a roztíratelnost, (1 - zanedbatelná; 3 - střední; 5 - nadměrná) pro hořkost a přítomnost cizích pachů a pachutí. Celkové hodnocení výrobku bylo provedeno pomocí sedmibodové hedonické stupnice (1 - velmi dobrý, 7 - velmi špatný).

Získané výsledky byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Statistická analýza byla provedena pomocí Kruskal-Wallisova a Wilcoxonova testu s využitím softwaru Minitab® (Minitab®, Ltd., UK) na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

## Výsledky a diskuze

### Základní chemická analýza

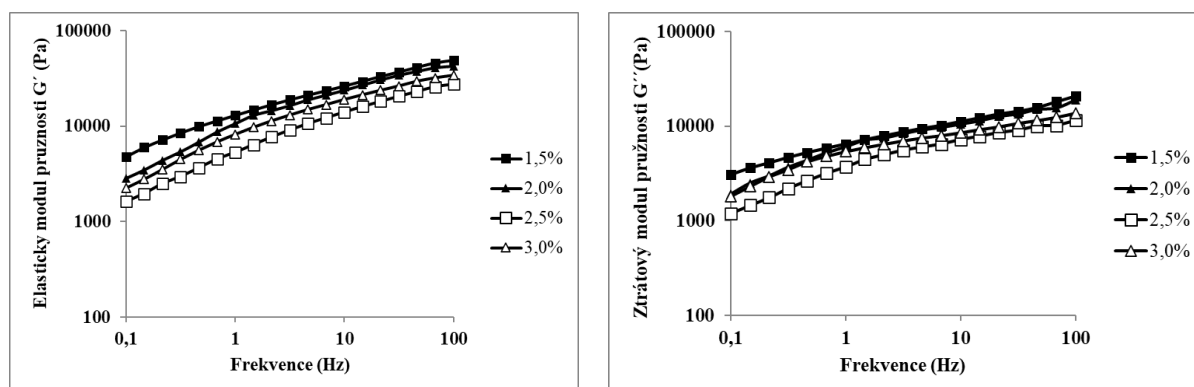
U modelových vzorků TS s přídavkem DFD o různé koncentraci nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v obsahu sušiny ( $P>0,05$ ). Dalším sledovaným faktorem byla hodnota pH, která se pohybovala v intervalovém rozmezí od  $6,03\pm 0,01$  do  $6,72\pm 0,01$ . Vyšší hodnoty pH byly zjištěny také ve studii Hoffmann et al. (2012), kteří použili pro výrobu TS směsi sodných a draselných tavicích solí, jejichž nejvyšší naměřená hodnota pH byla  $5,86\pm 0,21$ . Naše studie se zabývala vlivem jednodruhových tavicích solí, nikoli směsí. Proto s menšími odchylkami od optimálních hodnot pH (5,5-5,8) je nutno počítat. Dále bylo zjištěno, že s rostoucím množstvím tavicí soli ve vzorku TS roste parametr pH ( $P<0,05$ ).

### Dynamická oscilační reometrie

Všechny modelové vzorky TS se chovaly jako gely vykazující elastické chování ( $G'>G''$ ,  $\tan \delta<1$ ). Z Obr. 1 je patrné, že parametry  $G'$  a  $G''$  se zvyšovaly s rostoucí frekvencí. Na základě výsledků bylo zjištěno, že viskoelastické vlastnosti byly významně ovlivněny použitou koncentrací DFD ( $P<0,05$ ). S rostoucí koncentrací DFD jsme se na počátku experimentu domnívali, že by měla stejně tak růst i tuhost vzorků TS, ovšem tento trend se nepotvrdil. To lze zdůvodnit zejména tím, že aplikovaný druh tavicí soli působil na sýrovou matici různou intenzitou iontové výměny v průběhu tavicího procesu. Neboť čím intenzivnější iontová výměna ve vzorku probíhá, tím lze očekávat i vyšší tuhost finálního výrobku TS (Nagyová et

al., 2014). Vyhodnocení viskoelastických vlastností bylo také doplněno o parametry  $G^*$  a  $\tan \delta$ . Nejvyšší hodnotu  $G^*$  vykazovaly vzorky s přidavkem DFD o koncentraci 1,5 % (15 977 Pa) a 2,0 % (12 347 Pa). Vyšší hodnoty  $G^*$  si lze vysvětlit intenzivnějšími interakcemi ve vzorcích TS, jako jsou vodíkové nebo disulfidické vazby, vápenaté můstky, hydrofobní interakce nebo elektrostatické interakce. Tyto reakce přispívají k tvorbě „hustší“ finální struktury TS (Nagyová et al., 2014; Salek et al., 2016). Přídavek vyšších koncentrací DFD neměl významný vliv na konstantní zvyšování  $G^*$  (DFD o 1,5 %: 15 977 Pa; 2,0 %: 12 347 Pa; 2,5 %: 10 345 Pa; 3,0 %: 12 334 Pa) a snižování  $\tan \delta$  (DFD o 1,5 %: 0,4905; 2,0 %: 0,5847; 2,5 %: 0,6263; 3,0 %: 0,5868) při zvolené frekvenci 1 Hz ( $P > 0,05$ ).

Intenzita iontové výměny (IV) se v případě DFD snižovala s rostoucí koncentrací tavicí soli ve vzorku TS, proto nejtuzší konzistenci vykazovaly vzorky TS s přidavkem 1,5 % w/w a 2,0 % w/w. Tento klesající trend si lze s největší pravděpodobností vysvětlit dvěma možnými teoriemi. Zaprvé, tavicí sůl DFD pravděpodobně disponuje nižší schopností IV, která je nezbytná pro vznik TS s dobrými funkčními vlastnostmi (tj. fyzikálně chemické, reologické a sensorické). Zadruhé, intenzita IV závisí dále na pH systému. Při obousměrném vzdálení se od optima pH (5,5-5,8) můžeme očekávat pokles schopnosti IV, která následně vede ke snížení intenzity dispergace kaseinů zajišťující dostatečnou emulgaci tuku a stabilizaci vody v matici TS. To by mohlo mít za následek pokles tuhosti u vzorku TS. Tudíž čím vyšší je pH taveniny, tím měkčí konzistenci lze očekávat (Mizuno & Lucey, 2007; Nagyová et al., 2014). V naší studii pH vzorků TS s přidavkem DFD rostlo v následujícím pořadí: 1,5 < 2,0 < 2,5 < 3,0 % w/w, což potvrzuje výše zmíněnou teorii.



Obr. 1: Závislost elastického ( $G'$ ) a ztrátového modulu ( $G''$ ) na frekvenci v rozsahu 0,1 - 100,00 Hz pro TS s přidavkem tavicí soli DFD v koncentracích 1,5 – 3,0 % w/w.

### Senzorická analýza

Přídavek DFD v produktech TS neměl významný vliv ( $P > 0,05$ ) na celkový vzhled, stejně tak na přítomnost hořké chuti a pachutí (Tab. 1). Tvrdost TS byla hodnotiteli označena jako velmi dobrá až dobrá. Z hlediska roztíratelnosti byly vzorky TS hodnoceny také jako dobré. Na základě celkového hodnocení byl nejlépe hodnoceným produktem TS s množstvím DFD o koncentraci 2 %.

Tab. 1: Sensorické vlastnosti (vzhled<sup>2</sup> tvrdost<sup>2</sup>, roztíratelnost<sup>2</sup>, hořkost<sup>2</sup>, pachut<sup>2</sup> a celkové hodnocení<sup>2</sup>) vzorků tavených sýrů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián.<sup>3</sup>

<i>TS<sup>1</sup></i>	<i>Množství TS [%]</i>	<i>Vzhled</i>	<i>Tvrdost</i>	<i>Roztíratelnost</i>	<i>Hořkost</i>	<i>Pachutě</i>	<i>Celkový dojem</i>
<i>DFD</i>	1,5	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
	2,0	1 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>
	2,5	1 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>c</sup>
	3,0	1 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>DFD = difosforečnan tetradraselný

<sup>2</sup>Vzhled, tvrdost, roztíratelnost (1 - vynikající; 3 - dobrý; 5 – nepříjemný). Hořkost a cizí pachutě (1 - zanedbatelná; 3 - střední; 5 - nadměrná). Celkový dojem (1 - velmi dobrý; 7 - velmi špatný).

<sup>3</sup>Hodnoty v rámci sloupce (rozdíl mezi koncentracemi DFD) následované různými horními indexy se statisticky liší ( $P < 0,05$ ), vzorky vyrobené s použitím různých koncentrací tavicích solí byly hodnoceny nezávisle.

### Závěr

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že aplikované množství DFD mělo vliv na fyzikálně-chemické, viskoelastické a sensorické vlastnosti TS. Hodnoty pH TS pozvolna rostly s rostoucím množstvím tavicí soli ve vzorku TS. Vyšší hodnoty pH naměřené u vzorků TS s vyšší koncentrací DFD měly s největší pravděpodobností vliv na nižší tuhost finálního výrobku TS. Všechny modelové vzorky TS se chovaly jako gely vykazující elastické chování. V této studii byla prokázána možnost využití DFD pro výrobu TS bez negativního dopadu těchto solí na sensorické vlastnosti produktů, zejména vzniku hořkosti. Tavicí soli na bázi draslíku je tak možné doporučit k dalšímu výzkumu jako alternativu k častěji používaným sodným tavicím solím.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA/FT/2024/005

### Literatura

- HOFFMANN, W., GÄRTNER, J., LÜCK, K., JOHANNSEN, N., & MAURER, A. Effect of emulsifying salts containing potassium on the quality of block-type processed cheese. *International Dairy Journal*. 2012, **25**(1), 66-72. ISSN 09586946.
- CHAVHAN, G. B., KANAWJIA, S. K., KHETRA, Y., & PURI, R. Effect of potassium-based emulsifying salts on sensory, textural, and functional attributes of low-sodium processed Mozzarella cheese. *Dairy Science & Technology*. 2015, **95**(3), 265-278. ISSN 1958-5586.
- MIZUNO, R. & J.A. LUCEY. Properties of Milk Protein Gels Formed by Phosphates. *Journal of Dairy Science*. 2007, **90**(10), 4524-4531. ISSN 00220302.
- NAGYOVÁ, G., BUŇKA, F., SALEK, R.N., ČERNÍKOVÁ, M., MANČÍK, P., & ET AL. Use of sodium polyphosphates with different linear lengths in the production of spreadable processed cheese. *Journal of Dairy Science*. 2014, **97**(1), 111-122. ISSN 00220302.
- SALEK, R.N., ČERNÍKOVÁ, M., MADĚROVÁ, S., LAPČÍK, L., & BUŇKA, F. The effect of different composition of ternary mixtures of emulsifying salts on the consistency of processed cheese spreads manufactured from Swiss-type cheese with different degrees of maturity. *Journal of Dairy Science*. 2016, **99**(5), 3274-3287. ISSN 00220302.
- SALEK, R. N., ČERNÍKOVÁ, M., PACHLOVÁ, V., BUBELOVÁ, Z., KONEČNÁ, V., & BUŇKA, F. (2017). Properties of spreadable processed Mozzarella cheese with divergent compositions of emulsifying salts in relation to the applied cheese storage period. *LWT*, **77**, 30-38. ISSN 00236438.

**Kontaktní adresa:** Kristýna Šantová, Ing., Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Česká, k\_santova@utb.cz

## Vliv přídavku citrusové vlákniny na konzistenci termizovaných tvarohových sýrů

### The effect of citrus fiber addition on the consistency of cream cheese products

<sup>1</sup>Vincová Anna, <sup>1</sup>Šantová Kristýna, <sup>1</sup>Salek Richardos Nikolaos, <sup>1</sup>Jaško Miroslav

<sup>1</sup>Ústav technologie potravin FT UTB ve Zlíně

#### Summary

The aim of the work was to evaluate the addition of citrus fiber (1 % w/w) on the physicochemical, textural and viscoelastic properties of model cream cheese (CC) products with different fat in dry matter content (FDM; 10, 15 and 20 % w/w). A control sample (CS) without citrus fiber addition was also produced. In all samples, regardless of the FDM content, a significant increase in the values of hardness due to the addition of citrus fiber was observed. On the whole, the highest viscoelastic moduli and hardness values of the CC samples were reported for the sample with the lowest FDM content. Viscoelastic measurements indicated that the addition of citrus fiber increases the rigidity of the CC products and it was also detected that CC products with a higher FDM content showed lower rigidity. Moreover, all samples were characterized as homogenous and no water release and no off-flavors were detected.

**Key words:** cream cheese; citrus fiber; consistency; viscoelastic properties

#### Úvod

Termizovaný tvarohový sýr (TTS) je měkký, čerstvý a snadno roztíratelný mléčný výrobek s mírně kyselou chutí, který patří mezi nezrající sýry (Brighenti a kol., 2018). TTS představují emulzi typu oleje ve vodě, které se vyrábí okyselením bakteriemi mléčného kvašení a mechanickým namáháním během tepelného ošetření (Ningtyas a kol., 2018). TTS se staly být oblíbenou potravinou nejen pro svou smetanově máslovou chuť, krémovou konzistenci, ale také pro všestranné použití v potravinářském průmyslu, jelikož TTS poskytují adekvátní matici pro přidání různých příchutí, vlákniny, bylin či koření (Wolfschoon, 2021). Aplikace vlákniny se při výrobě potravin provádí především z důvodu zvýšení stability potravin, schopnosti vázat vodu, bobtnat a vytvářet gely, čímž pozitivně ovlivňuje strukturu a konzistenci potravin (Mudgil a Barak, 2019). Citrusová vláknina (CV) je přírodní potravinová vlákninová surovina extrahovaná z kůry a zbytků citrusových plodů, které vznikají jako odpadní produkty během zpracování ovoce. CV je bohatá na celulózu, hemicelulózu, lignin, pektin, malé množství oligosacharidů, je řazena mezi potravinářské hydrokoloidy a má dobrou schopnost vázat vodu (Huang a kol., 2021). Z důvodu nedostatečných odborných informací týkající se vlivu přídavku CV na konzistenci TTS byla provedena tato studie s cílem zhodnotit přídavek CV (1 % w/w) na fyzikálně-chemické, texturní a viskoelastické vlastnosti TTS s různým obsahem tuku v sušině (10, 15 a 20 % w/w).

#### Materiál a metody

Studie byla zahájena výrobou modelových vzorků TTS s obsahem sušiny 30 % (w/w) a 10, 15 a 20 % (w/w) tuku v sušině. Surovinová skladba se skládala z tvrdého tvarohu (Choceňská mlékárna s.r.o. Choceň, ČR, obsah sušiny 27 % w/w a obsah tuku v sušině 11 % w/w), z crème fraîche (Bohemilk, a.s. Opočno, ČR, obsah sušiny 36 % w/w a obsah tuku v sušině 40 % w/w), dále pak z pitné vody, NaCl a nakonec byla použita CV (Herbafood, Německo). Výroba byla uskutečněna pomocí přístroje Vorkwerk Thermomix TM (Vorwerk & Co. Thermomix GmbH, Wuppertal, Německo). V mixéru Thermomix se nejprve mechanicky

rozmělnil tvaroh spolu s crème fraîche. Následně byly přidány zbylé suroviny včetně CV a pomocí přístroje došlo k mechanickému namáhání při 3000 ot./min. po dosažení 80 °C s dobou výdrže 10 minut. Celková doba výrobního procesu pak činila 15 minut. Hotová směs byla poté plněna do 100 g hliníkových kelímků (Aluflexpack s.r.o., Praha, ČR) kulatého tvaru (průměr 7,5 cm, výška 2,7 cm) a uzavřena hliníkovými víčky. Hotové vzorky byly po vychlazení na laboratorní teplotu zchlazeny na  $6 \pm 2$  °C a uskladněny do následujících analýz.

### Stanovení celkového obsahu sušiny a pH

Stanovení celkového obsahu sušiny bylo provedeno gravimetricky na základě normy ČSN EN ISO 5534:2005 sušením vzorků při  $102 \pm 2$  °C do konstantní hmotnosti. Stanovení hodnot pH bylo měřeno pomocí vpichového pH metru obsahující skleněnou elektrodu (Foodcare HI 99161, Hanna Instruments, Rhode Island, USA).

### Stanovení tvrdosti

Tvrdość TTS byla měřena pomocí analyzátoru textury TA.XT plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK). Analýza tvrdosti byla provedena pomocí dvojí penetrace válcovou sondou o průměru 20 mm přímo do měřeného vzorku s návratovou rychlostí 2 mm/s o spouštěcí síle 5 g a s deformací 20 % do hloubky 10 mm. V průběhu měření se vytvářel graf, představující zátěžovou křivku texturního parametru analyzovaného vzorku TTS.

### Stanovení viskoelastických vlastností

Při stanovení viskoelastických vlastností TTS byly sledovány viskoelastické parametry umožňující odvodit fyzikální a viskoelastické vlastnosti produktů. Měření bylo analyzováno pomocí reometru Kinexus Pro+ (Malvern Panalytical, UK) za použití geometrie typu deska – deska s průměrem 35 mm a s šířkou štěrbinu 1 mm. Amplituda smykového napětí byla zvolena v oblasti lineární viskoelasticity na 20 Pa a frekvence byla v rozmezí 0,1 – 100,0 Hz. Dle rovnic (1) a (2) byl vypočítán komplexní modul pružnosti ( $G^*$ ; Pa) vyjadřující celkový odpor analyzovaného vzorku proti deformaci a úhel fázového posunu ( $\delta$ ; °) vyjadřující míru viskoelastičnosti materiálu (Černíková a kol., 2017).

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (1)$$

$$\delta = \tan^{-1} G'' / G' \quad (2)$$

### Statistická analýza

Získané výsledky byly analyzovány pomocí statistického softwaru Unistat® 6.5 (Unistat, Londýn, UK). K vyhodnocení výsledků byly použity Kruskal–Wallisův a Wilcoxonův test, kde hladina významnosti byla 0,05.

### Výsledky a diskuze

#### Výsledky stanovení sušiny a pH

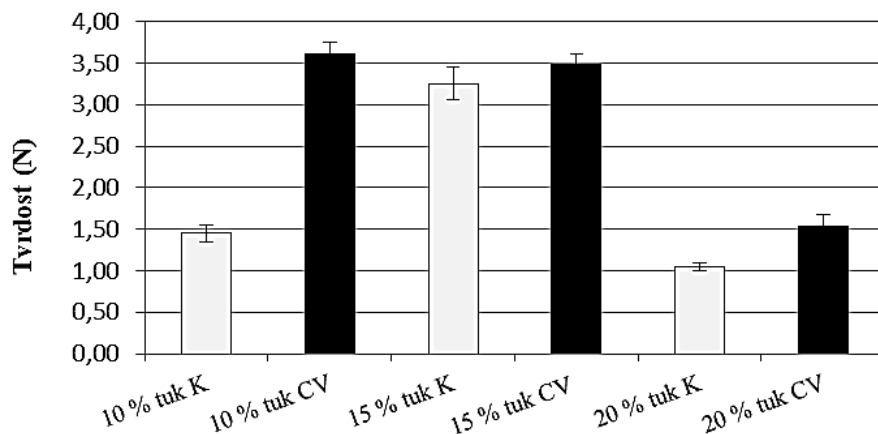
Výsledky celkového obsahu sušiny se pohybovaly v rozpětí 30,65 – 31,57 % (w/w) ( $P \geq 0,05$ ). Z výsledků je patrné, že vzorky TTS vykazovaly určitou stabilitu sušiny a přídavek CV neměl na obsah sušiny vliv. Podobnost obsahu sušiny mezi vzorky je poměrně zásadní, protože může ovlivnit texturní a reologické vlastnosti TTS (Weiserová a kol., 2011). Hodnoty pH byly měřeny v rozmezí 4,25 – 4,34 ( $P \geq 0,05$ ) a přídavek CV neměl na hodnoty pH zásadní vliv. Výsledné hodnoty pH lze charakterizovat jako přijatelné pro TTS.

#### Vyhodnocení tvrdosti

Obrázek 1 ukazuje vývoj tvrdosti vzorků TSS vyrobených za přídavku CV. Z grafu lze vyhodnotit, že přídavek CV (bez ohledu na množství tuku v sušině) výrazně ovlivnil tvrdost TTS. U všech vzorků TTS došlo k intenzivnímu nárůstu tvrdosti, přičemž nejvyšších hodnot



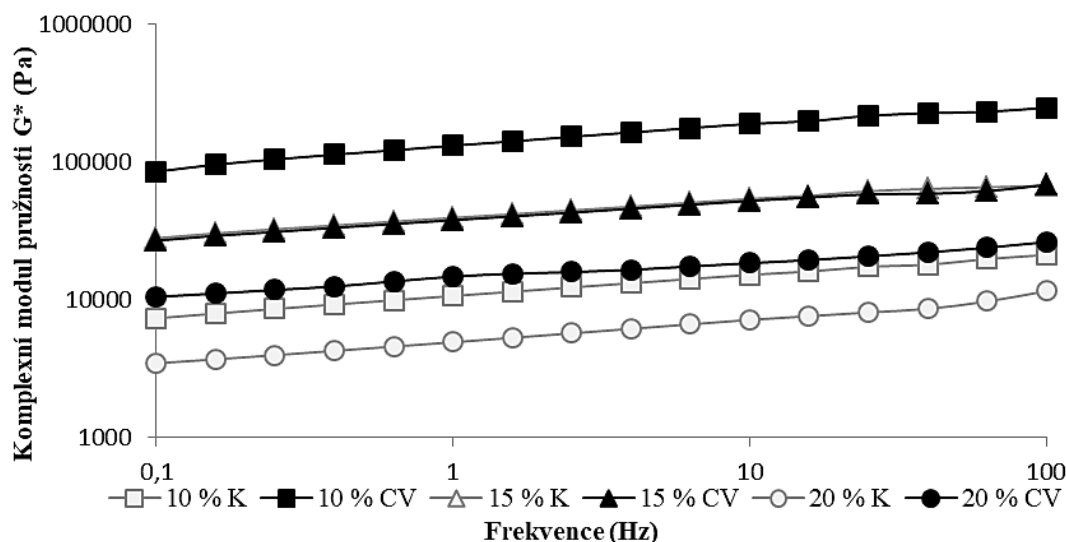
dosáhl vzorek TTS s obsahem tuku v sušině 10 %, čili pro svou deformaci vyžadoval největší potřebnou sílu. Důvodem nárůstu tvrdosti jsou především hydrofobní interakce prostřednictvím vodíkových můstků a zesílení struktury citrusového vlákna (Lundberg a kol., 2014). Z grafu je rovněž patrné, že se zvyšujícím se množstvím tuku v sušině došlo ke snížení tvrdosti u všech vzorků TTS s přidavkem CV. Takové tvrzení je v souladu s literaturou Ningtyas a kol., (2018), která poukazuje na skutečnost, že textura TTS s vyšším obsahem tuku je měkčí vlivem rozptýlených tukových kuliček v proteinové síti.



Obrázek 1: Vliv přidavku CV na vývoj hodnot tvrdosti (N) modelových vzorků TTS s obsahem tuku v sušině (10, 15, 20 % w/w) ve srovnání s kontrolním vzorkem (K)

### Vyhodnocení viskoelastických vlastností

Obrázek 2 uvádí výsledné hodnoty  $G^*$ , ze kterých jednoznačně vyplývá, že použití CV ovlivnilo viskoelastické vlastnosti TTS a došlo oproti kontrolním vzorkům ke zvýšení křivek  $G^*$ . Publikace Winter a Chambon (1986) uvádí, že v případě rostoucích parametrů  $G^*$  analyzované výrobky vykazují vyšší tuhost. Nejvyšší hodnoty  $G^*$  byly naměřené, stejně jako u stanovení tvrdosti, u vzorku TTS s obsahem tuku v sušině 10 % (w/w). Důvodem zvýšení tuhosti TTS po přidání CV je absorpce vody pomocí citrusového vlákna, což má za následek bobtnání. Vlákna následně po hydrataci vodou tvoří gelovitou síť přispívající k zadržování vody ve struktuře a tím k růstu tuhosti finálního produktu (Zhang a kol., 2023).



Obrázek 2: Vliv přidavku CV na viskoelastické vlastnosti (komplexní modul  $G^*$ , Pa) modelových vzorků TTS s obsahem tuku v sušině (10, 15, 20 % w/w) na frekvenci (f, v rozsahu 0,1-100 Hz). Šedé symboly - kontrolní vzorky (K), černé symboly – přidavek CV

Vlivem vyššího obsahu tuku v sušině u vzorků TTS došlo opět ke snížení hodnot  $G^*$ , čili vzorky TTS s vyšším obsahem tuku v sušině vykazovaly nižší tuhost. Byla potvrzena studie Ningtytas a kol., 2017, která poukazuje na strukturální změny výrobků v důsledku přidavku vyššího množství tuku, kdy tuk rozptýlený v proteinové síti narušuje proteinovou matici a podílí se na snížení pevnosti výrobků. Viskoelastické chování TTS je možné určit na základě převažující složky vytvářející proteinovou síť. Fázový posun představuje fázový úhel ( $\delta$ ) mezi napětím a deformací. Zejména pokud  $\delta < 45^\circ$  materiál je elastičtější než viskózní (chování podobné tuhému stavu). Naopak, je-li  $\delta > 45^\circ$  materiál je více viskózní než elastický (chování podobné kapalině) (Sołowiej a kol., 2014). V případě stanovení  $\delta$  u vzorků TTS se výsledné hodnoty pohybovaly v rozmezí  $11,93 - 15,20^\circ$  ( $P \geq 0,05$ ). Na základě výše zmíněné publikace lze usoudit, že ve zkoumaných vzorcích TTS převládla elastická složka nad viskózní, což naznačuje přítomnost pevnějších struktur (Černíková a kol., 2017).

### Závěr

Hlavním cílem této studie bylo sledování vlivu přidavku citrusové vlákniny (1 % w/w) na fyzikálně-chemické, texturní a viskoelastické vlastnosti modelových vzorků termizovaných tvarohových sýrů s různým obsahem tuku v sušině (10, 15 a 20 % w/w). Vzhledem k tomu, že problematika přidávání citrusové vlákniny při výrobě termizovaných tvarohových sýrů není v odborné literatuře dostatečně rozšířená, byla provedena tato studie s cílem objasnit, zda přídavek citrusové vlákniny ovlivňuje finální výrobek. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že přídavek citrusové vlákniny vedl k texturním a viskoelastickým změnám. Bylo vyhodnoceno, že všechny vzorky za přidavku citrusové vlákniny vykazovaly jednak vyšší tvrdost, a také byly oproti kontrolním vzorkům pevnější. V této studii bylo rovněž prokázáno, že vzorky s vyšším obsahem tuku v sušině vykazovaly naopak tvrdost a pevnost nižší.

### Poděkování

Tato práce byla podpořena Interní grantovou agenturou Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (projekt IGA/FT/2024/005).

### Literatura:

BRIGHENTI, M.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; JAEGGI, J.J.; JOHNSON, M.E.; LUCEY, J.A. Effects of processing conditions on the texture and rheological properties of model acid gels and cream cheese. *Journal of Dairy Science*. 2018, **101**(8), 6762-6775.

ČERNÍKOVÁ, M.; NEBESÁŘOVÁ, J.; SALEK, R.N.; ŘIHÁČKOVÁ, L.; BUŇKA, F. Microstructure and textural and viscoelastic properties of model processed cheese with different dry matter and fat in dry matter content. *Journal of Dairy Science*. 2017, **100**(6), 4300-4307.

ČSN EN ISO 5534 (571003): *Sýry a tavené sýry - Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda)*. Česká technická norma, 2005, 12 s.

HUANG, J.; LIAO, J.; QI, J.; JIANG, W.; YANG, X. Structural and physicochemical properties of pectin-rich dietary fiber prepared from citrus peel. *Food Hydrocolloids*. 2021, **110**.

LUNDBERG, B.; PAN, X.; WHITE, A.; CHAU, H.; HOTCHKISS, A. Rheology and composition of citrus fiber. *Journal of Food Engineering*. 2014, **125**, 97-104.

MUDGIL, D.; BARAK, S.. Classification, Technological Properties, and Sustainable Sources. In: *Dietary Fiber: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier, 2019, s. 27-58.

NINGTYAS, D.W.; BHANDARI, B.; BANSAL, N.; PRAKASH, S. Effect of homogenisation of cheese milk and high-shear mixing of the curd during cream cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*. 2018, **71**(2), 417-431.

SOŁOWIEJ, B.; CHEUNG, I.W.Y.; LI-CHAN, E.C.Y. Texture, rheology and meltability of processed cheese analogues prepared using rennet or acid casein with or without added whey

---

proteins. *International Dairy Journal*. 2014, **37**(2), 87-94.

WEISEROVÁ, E., DOUDOVÁ, L., GALIOVÁ, L., ŽÁK, L., MICHÁLEK, J., JANIŠ, R., et al. The effect of combinations of sodium phosphates in binary mixtures on selected texture parameters of processed cheese spreads. *International Dairy Journal*, 21 (2011), pp. 979-986.

WINTER, H.H.; a CHAMBON, F. Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *Journal of Rheology*. 1986, **30**(2), 367-382.

WOLFSCHOON POMBO, A.F. Cream cheese: Historical, manufacturing, and physico-chemical aspects. *International Dairy Journal*. 2021, **117**.

ZHANG, M.; WANG, Z.; WU, J.; LU, J.; LIU, D. et al. Effects of adding citrus fiber with different chemical compositions and physicochemical properties on the cooking yield of spiced beef. *LWT*. 2023, roč. 176.

**Kontaktní adresa:** Anna Vincová, Ing., Ústav technologie potravin, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Vavrečkova 5669, 760 01 Zlín; a\_vincova@utb.cz

## Hodnocení vlivu obsahu šťávy z černého rybízu a furcellaranu na vybrané fyzikálně-chemické, reologické a senzorycké vlastnosti fermentovaných syrovátkových nápojů

### Evaluation of the effect of blackcurrant juice and furcellaran content on selected physicochemical, rheological and sensory properties of fermented whey-based beverages

Rejdlová Anita, Lorencová Eva, Salek Richardos Nikolaos

Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín

#### Summary

The aim of the study was to produce and evaluate model fermented whey-based beverages with different concentrations of blackcurrant juice [0; 10; 20; 100 % (w/w)] and furcellaran [0.25; 0.50 % (w/w)]. The beverages were fermented with a starter culture of water kefir. Physico-chemical, rheological and sensory analyses were performed. During fermentation (48 h), the pH, density and total soluble solids values of the model samples decreased. In contrast, the ethanol content increased during fermentation to a final content ranging from 0.92 to 4.86 % (v/v). All model samples generally exhibited non-Newtonian pseudoplastic behaviour. The sensory analysis showed that the sample with a composition of 20 % (w/w) blackcurrant juice and 0.50 % (w/w) furcellaran obtained the highest scores.

**Keywords:** fermented whey beverage; water kefir culture; viscosity; furcellaran

#### Úvod

Syrovátka vzniká ve velkém objemu jako vedlejší produkt v mlékárenském průmyslu a díky svému složení je využívána jako surovina pro výrobu potravin s přidanou hodnotou. Na druhou stranu velká část syrovátky slouží jako součást krmiva pro hospodářská zvířata, nebo není dále využita a je nesprávně likvidována. Z daných důvodů se hledají možnosti dalšího využití a snížil se tak dopad na znečištění životního prostředí (Yadav et al. 2015). Zrna vodního kefiru tvoří bakterie mléčného a octového kvašení a také kvasinky. Jsou vhodná i pro fermentaci nápojů obsahujících syrovátku (Alrosan et al. 2023). Syrovátka se může vyznačovat nepříjemnou slanou a/nebo kyselou chutí, proto se při výrobě nápojů využívají například ovocné šťávy, které zlepšují výsledné organoleptické vlastnosti nápojů (Barukčić et al. 2008). Nevýhodou však může být zvýšená sedimentace kvůli interakci syrovátkových proteinů s ovocnou složkou, z tohoto důvodu mohou být do nápoje přidávány hydrokoloidy zabraňující sedimentaci (Ahmed et al. 2023, Koffi et al. 2005).

#### Metodika

Modelové vzorky byly vyrobeny ze sušené syrovátky (Mogador s.r.o., Otrokovice, Česká republika), pasterizované černorybízové šťávy (dm-drogerie markt, GmbH, Karlsruhe, Německo) a starterové kultury vodního kefiru (UNIBIOM s.r.o., Česká republika). Nejdříve bylo připraveno inokulum rozmícháním 0.50 ± 0.03 g lyofilizované kultury v destilované vodě, fermentace probíhala při 20 ± 2 °C po dobu 72 hodin. Následně byl připraven 5% roztok syrovátky, který byl tepelně ošetřen při teplotě 90 ± 1 °C po dobu 10 minut. Byly připraveny dvě sady po čtyřech vzorcích (n=8) s různou koncentrací černorybízové šťávy [0; 10; 20; 100 % (w/w)] a furcellaranu [0,25 a 0,50 % (w/w)]. Vzorky byly homogenizovány a následně bylo přidáno 10 % aktivního inokula.

pH modelových vzorků bylo měřeno pomocí kalibrovaného pH-metru (Hanna Instruments Czech s.r.o., Praha, Česká republika). Obsah refraktometrické sušiny (RS) byl stanoven pomocí digitálního refraktometru Kern OTSS 45BE (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo). Pomocí alcolyzeru plus Anton Paar a hustoměru DMA 4500 Anton Paar (Anton Paar GmbH, Graz, Rakousko) byl stanoven obsah ethanol a hustoty. Před stanovením obsahu ethanolu, hustoty a sedimentu byly vzorky odstředěny (6000 ot./min; 10 min) pomocí odstředivky EBA 21 (Hettich, Tuttlingen, Německo). Supernatant byl odstraněn a sediment byl zvážen. Reologická analýza byla provedena pomocí reometru HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific Brno s.r.o. Brno, Česká republika) s geometrií válec–válec v interval 0–500 s<sup>-1</sup>. Všechny analýzy byly provedeny třikrát (n=3). Senzorická analýza byla provedena po 48 hodinách fermentace 12 hodnotiteli. Bylo podáváno 50 ml vzorku označeného třímístným kódem. Parametry vzhledu, chuti a vůně byly hodnoceny pomocí pětibodové stupnice (1- vynikající, 3- dobrý, 5- nepřijatelný). Celkové hodnocení bylo založeno na pětibodové stupnici, přičemž 1 znamenala mimořádně dobrou a 5 mimořádně špatnou.

Výsledné hodnoty byly prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka a analyzovány pomocí jednofaktorové ANOVA a Tukeyho post-hoc testu s 95% spolehlivostí. Senzorické vlastnosti modelových vzorků byly vyhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova a Wilcoxonova testu. Testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05. Statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru Minitab®16 (Minitab®, Ltd., Coventry, Velká Británie).

### Výsledky a diskuze

Výsledky fyzikálně-chemické analýzy prokázaly statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednotlivými vzorky. Obsah černorybízové šťávy měl vliv na hodnotu refraktometrické sušiny (RS) ( $p < 0,05$ ), nicméně mezi vzorky s různou koncentrací furcellaranu nebyly statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ). V průběhu fermentace hodnota pH, RS i hustoty klesla u všech vzorků, což bylo způsobeno produkcí metabolitů jako jsou ethanol, CO<sub>2</sub>, organické kyseliny a jiné senzorycky aktivní látky. Jako nealkoholické lze označit nápoje s maximálním obsahem ethanolu 0,5 % (v/v). Obsah ethanolu se u vzorků zvyšoval s prodlužující dobou fermentace, kdy se konečný obsah pohyboval v rozmezí 0,92–4,86 % (v/v). Tyto výsledky jsou v souladu se studii Randazzo et al. (2016) a Kelanne et al. (2020). Sedimentace mohla být pravděpodobně způsobena reakcemi syrovátkových bílkovin s ovocnou složkou (Koffi et al, 2005). Vyšší koncentrace furcellaranu způsobila vyšší obsah sedimentu, současně vzorky F25\_10 a F50\_10 (10 % černorybízové šťávy) vykazovaly po 48hodinové fermentaci nejvyšší obsah sedimentu s hodnotami 10,99 (rel. %) a 17,98 (rel. %).

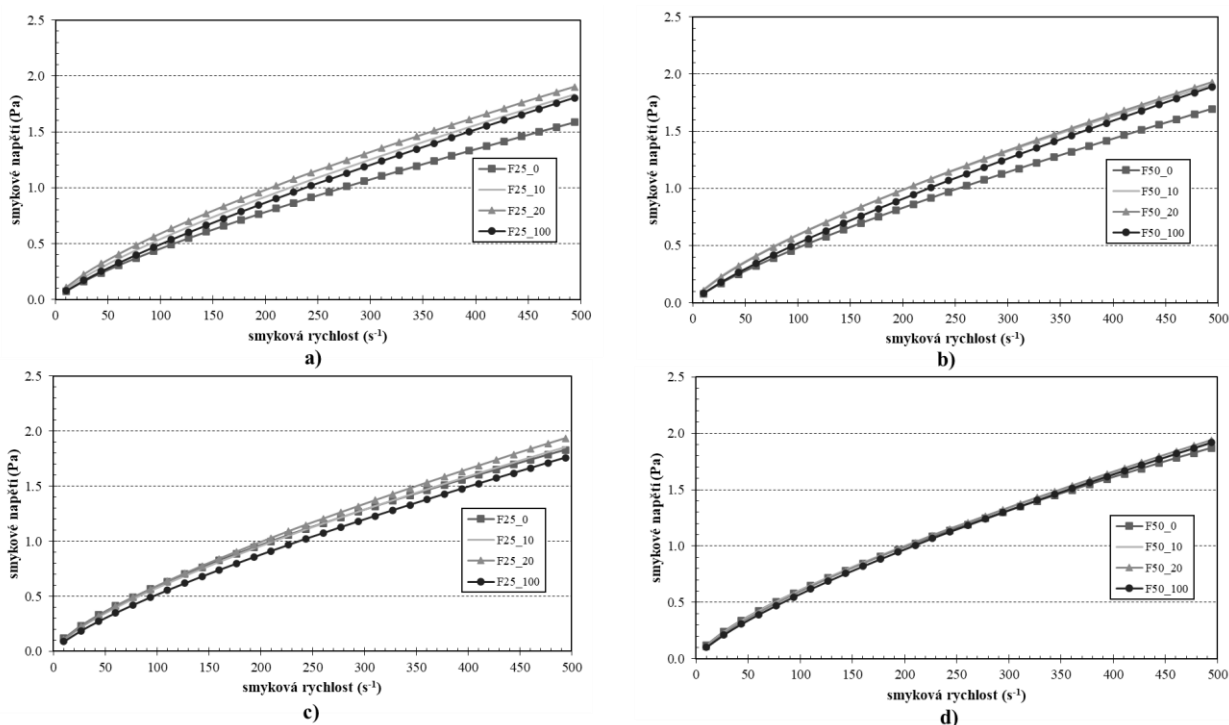
Tabulka 1: Výsledky fyzikálně-chemické analýzy.\*

vzorek	čas (h)	pH (-)	RS (°Bx)	hustota (kg·m <sup>-3</sup> )	ethanol (% v/v)
F25_0	4	6.18 ± 0.03 <sup>a,A</sup>	5.13 ± 0.05 <sup>a,A</sup>	1.021 ± 0.001 <sup>a,A</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a,A</sup>
F25_10		3.86 ± 0.02 <sup>b,A</sup>	5.53 ± 0.09 <sup>b,A</sup>	1.024 ± 0.001 <sup>b,A</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b,A</sup>
F25_20		3.41 ± 0.01 <sup>c,A</sup>	6.83 ± 0.05 <sup>c,A</sup>	1.029 ± 0.002 <sup>c,A</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>b,A</sup>
F25_100		2.77 ± 0.01 <sup>d,A</sup>	15.43 ± 0.05 <sup>d,A</sup>	1.064 ± 0.002 <sup>d,A</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>b,A</sup>
F50_0		6.14 ± 0.03 <sup>a,A</sup>	5.33 ± 0.05 <sup>e,A</sup>	1.021 ± 0.001 <sup>a,A</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a,A</sup>
F50_10		3.85 ± 0.02 <sup>b,A</sup>	5.97 ± 0.05 <sup>f,A</sup>	1.025 ± 0.002 <sup>b,A</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>b,A</sup>
F50_20		3.40 ± 0.03 <sup>c,A</sup>	6.73 ± 0.05 <sup>g,A</sup>	1.029 ± 0.001 <sup>c,A</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>b,A</sup>
F50_100		2.77 ± 0.01 <sup>d,A</sup>	15.63 ± 0.05 <sup>h,A</sup>	1.066 ± 0.002 <sup>d,A</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>b,A</sup>

F25_0		3.83 ± 0.02 <sup>a,C</sup>	2.73 ± 0.05 <sup>a,C</sup>	1.014 ± 0.002 <sup>a,C</sup>	0.92 ± 0.02 <sup>a,C</sup>
F25_10		4.08 ± 0.03 <sup>b,C</sup>	3.73 ± 0.09 <sup>b,C</sup>	1.015 ± 0.001 <sup>b,C</sup>	1.18 ± 0.01 <sup>b,C</sup>
F25_20		3.35 ± 0.02 <sup>c,B</sup>	4.30 ± 0.14 <sup>c,C</sup>	1.017 ± 0.001 <sup>c,C</sup>	1.58 ± 0.01 <sup>c,C</sup>
F25_100		2.73 ± 0.01 <sup>d,B</sup>	9.60 ± 0.02 <sup>d,C</sup>	1.031 ± 0.001 <sup>d,C</sup>	4.86 ± 0.01 <sup>d,C</sup>
F50_0	48	3.85 ± 0.01 <sup>a,C</sup>	2.87 ± 0.05 <sup>e,C</sup>	1.014 ± 0.002 <sup>a,B</sup>	0.92 ± 0.01 <sup>a,C</sup>
F50_10		4.13 ± 0.02 <sup>b,C</sup>	3.27 ± 0.05 <sup>f,C</sup>	1.015 ± 0.002 <sup>b,B</sup>	1.31 ± 0.02 <sup>d,C</sup>
F50_20		3.35 ± 0.01 <sup>c,A</sup>	3.90 ± 0.08 <sup>g,C</sup>	1.016 ± 0.001 <sup>c,C</sup>	1.71 ± 0.01 <sup>e,C</sup>
F50_100		2.75 ± 0.02 <sup>d,A</sup>	10.43 ± 0.05 <sup>h,C</sup>	1.029 ± 0.002 <sup>d,C</sup>	4.59 ± 0.01 <sup>f,C</sup>

\* Průměrné hodnoty v rámci sloupce (rozdíl mezi hladinou šťávy z černého rybízu; porovnává se stejná doba fermentace) následované různými horními indexy se statisticky liší ( $p < 0,05$ ). Průměrné hodnoty v rámci sloupce (rozdíl mezi koncentrací furcellaranu; porovnání stejné hladiny šťávy z černého rybízu) následované různými velkými písmeny se liší ( $p < 0,05$ ).

Výsledky reologické analýzy jsou uvedeny na obrázku 1. Pro vyhodnocení reologické analýzy byl využit Power-Law model. Na základě výsledků lze říci, že všechny modelové vzorky vykazovaly pseudoplastické chování ( $n < 1$ ) a hodnota  $n$  klesala v průběhu fermentace. Koncentrace furcellaranu neměla na reologické vlastnosti vzorků statisticky významný vliv ( $p > 0,05$ ), kdežto mezi vzorky s různým obsahem černorybízové šťávy byly pozorovány rozdíly ( $p < 0,05$ ). Na začátku fermentace (po 4 h fermentace) vykazoval vzorek obsahující pouze 100% (w/w) syrovátku nejnižší viskozitu pro obě koncentrace furcellaranu. Se zvyšujícím se obsahem šťávy z černého rybízu se zvyšovala i viskozita modelových vzorků.



Obrázek 1: Tokové křivky; a) vzorky s 0,25 % (w/w) furcellaranu (4 h fermentace); b) vzorky s 0,50 % (w/w) furcellaranu (4 h fermentace); c) vzorky s 0,25 % (w/w) furcellaranu (48 h fermentace); d) vzorky s 0,50 % (w/w) furcellaranu (48 h fermentace).

Výsledky senzorké analýzy jsou uvedeny jako medián v tabulce 2. Obsah černorybízové šťávy i furcellaranu ovlivnily všechny organoleptické vlastnosti. Vzorky byly hodnoceny negativními známkami především kvůli příliš kyselé chuti, vyskytovaly se i cizí příchutě.

Nejlépe hodnoceným vzorkem byl F50\_20 (0,50 % (w/w) furcellaranu, 20 % (w/w) černorybízové šťávy).

Tabulka 3: Výsledky senzoričké analýzy.\*

vzorek	vzhled	chut'	aroma	cizí příchutě	celkový dojem
F25_0	4 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>	3 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>
F25_10	4 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>	3 <sup>b,A</sup>	3 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>
F25_20	3 <sup>b,A</sup>	3 <sup>b,A</sup>	3 <sup>b,A</sup>	2 <sup>b,A</sup>	3 <sup>b,A</sup>
F25_100	2 <sup>c,A</sup>	5 <sup>c,A</sup>	2 <sup>c,A</sup>	1 <sup>c,A</sup>	3 <sup>b,A</sup>
F50_0	4 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>	3 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>
F50_10	4 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>	3 <sup>b,A</sup>	3 <sup>a,A</sup>	4 <sup>a,A</sup>
F50_20	2 <sup>c,B</sup>	2 <sup>d,B</sup>	2 <sup>c,B</sup>	2 <sup>b,A</sup>	2 <sup>c,B</sup>
F50_100	2 <sup>c,A</sup>	4 <sup>a,C</sup>	2 <sup>c,A</sup>	2 <sup>b,B</sup>	3 <sup>b,A</sup>

\*Mediánové hodnoty v rámci sloupce (rozdíl mezi hladinou šťávy z černého rybízu; porovnává se stejná doba fermentace) následované různými horními indexy se statisticky liší ( $p < 0,05$ ). Mediánové hodnoty v rámci sloupce (rozdíl mezi koncentrací furcellaranu; porovnání stejné hladiny šťávy z černého rybízu) následované různými velkými písmeny se liší ( $p < 0,05$ ).

### Závěr

Na základě získaných výsledků bylo potvrzeno, že kultura vodního kefiru je schopna fermentovat kombinaci syrovátka-ovocná šťáva. Mezi vzorky s různou koncentrací černorybízové šťávy se vyskytovaly po celou dobu fermentace statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ). U vzorků s vyšší koncentrací furcellaranu byl naměřen vyšší obsah sedimentu, nicméně na další fyzikálně-chemické, reologické ani senzoričké vlastnosti neměla koncentrace furcellaranu statisticky významný vliv ( $p > 0,05$ ). Nejlepší celkový dojem byl zaznamenán u vzorku F50\_20, který obsahoval 20 % (w/w) černorybízové šťávy a 0,50 % (w/w) furcellaranu. Navazující studie by mohly být zaměřeny například na zkoumání antioxidační aktivity modelových vzorků.

### Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu IGA/FT/2024/005.

### Literatura

AHMED, Tanvir, et al. Development of novel whey-mango based mixed beverage: effect of storage on physicochemical, microbiological, and sensory analysis. *Foods*, 2023, vol. 12, no. 2, 237.

ALROSAN, Mohammad, et al. Enhanced functionality of fermented whey protein using water kefir. *International Journal of Food Properties*, 2023, vol. 26, no. 1, s. 1663-1677.

BARUKČIĆ, I.; BOŽANIĆ, R.; TRATNIK, L. Whey-based beverages-a new generation of dairy products. *Journal MLJEKARSTVO*, 2008, vol. 58, no. 3, s. 257-274.

KELANNE, Niina, et al. Phenolic compound profiles in alcoholic black currant beverages produced by fermentation with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, vol 68, no.37, s. 10128-10141.

KOFFI, Ernest; SHEWFELT, Robert; WICKER, Louise. Storage stability and sensory analysis of uht-processed whey-banana beverages. *Journal of food quality*, 2005, vol. 28, no. 4, s. 386-401.

RANDAZZO, Walter, et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 2016, vol 54, s. 40-51.

YADAV, Jay Shankar Singh, et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology advances*, 2015, vol. 33, no. 6, s. 756-774.

**Kontaktní adresa:** Anita Rejdlová, Ing., Ústav technologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Česká republika, e-mail: a\_rejdlova@utb.cz



# **SEKCE 2**

## **Chov zvířat, výživa zvířat a biochemie**

Do této sekce nebyly přihlášeny žádné příspěvky.

# **SEKCE 3**

## **Ochrana zvířat, welfare a etologie**

## Measurement of temperature of the canine eye in relation to the stress

<sup>1</sup>Pokorná Veronika, <sup>1</sup>Kotianová Lucia, <sup>1</sup>Bedáňová Iveta, <sup>1</sup>Voslářová Eva

<sup>1</sup>Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

### Summary

*Infrared thermography is used to assess stress in dogs and other animals based on changes in surface eye temperature. However, there are factors not related to stress that can affect measurement, so it is necessary to standardize measurement procedure. The aim of this study was to assess the effect of the measurement location on the value of the detected surface temperature in a dog. Measurement of the eye surface temperature by using a infrared thermography was carried out in 5 phases (waiting room after 5 and 10 minutes, examination room before, during and after treatment), the surface temperature of the lacrimal caruncle and the hottest point of the left and right eye was recorded. The results show that the average temperatures of the left and right eye were not significantly different ( $p > 0.05$ ) and the temperatures of the lacrimal caruncle and the hottest point of both eyes significantly correlated ( $p < 0.05$ ). Therefore, it is possible to use both the lacrimal caruncle or the hottest point of the left or right eye for stress assessment.*

**Keywords:** lacrimal caruncle; temperature; companion animals; examination; welfare

### Introduction

A number of studies based on infrared thermography (IRT) have shown that eye temperature is a good indicator of thermal changes in body temperature due to physiological and psychological stress (Cook et al., 2001; Pavlidis et al., 2002; Cook et al., 2006; Travain and Valsecchi, 2021).

Elias et al. (2021) performed IRT measurements at seven different locations on each eye in racing greyhounds and reported that the lacrimal caruncle of the right eye appeared to be the most effective for detecting temperature change. Valera et al. (2012) evaluated the stress level in sport horses using IRT on the left eye, determining the maximum temperature in the area around the eye including the eyeball, and found that the lacrimal caruncle of left eye is the hottest point of eye and the most suitable place to detect the change in surface temperature. Travain et al. (2015) evaluated the possibility of using IRT to stress assessment and measured the surface temperature in the area of the lacrimal caruncle and the outer corner, as the second hottest point (lateral canthus) of the left and right eye in dogs, and found that a suitable place to measure surface temperature is the lacrimal caruncle.

The aim of the study was to verify applicability of infrared thermography to stress assessment in a veterinary clinic environment in dogs according to surface temperature changes in different parts of eye and assess the effect of measurement location on the value of detected surface temperature in dogs.

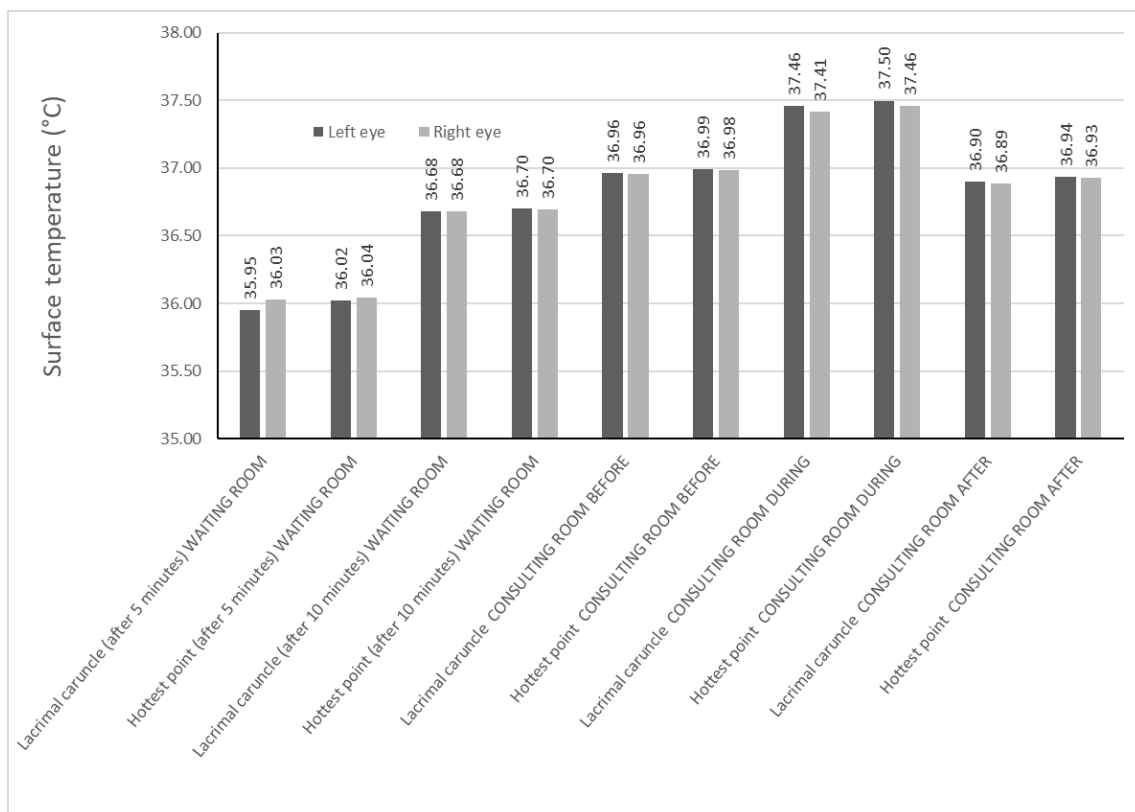
### Material and methods

A total of 45 dogs of different sex, breed and body size, aged from 3 months to 16 years, who visited veterinary clinic for regular vaccination, were included in the analysis. Measurement of surface eye temperature of the eye by using an infrared thermography was carried out in 5 phases: waiting room after 5 and 10 minutes, examination room before, during and after treatment. For each dog in each phase, 2 images were taken, from which the average surface temperature of lacrimal caruncle and the hottest point of left and right eye were recorded. Images were captured vertically and in a distance of 1 m from the subject by IRT camera testo

890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Germany) with emissivity set at 0.97 (640x480 pixels, temperature range -30 to 100 °C, sensitivity < 0.04 °C). During measurements, temperature and humidity in the room were monitored and the resulting values were analyzed with IRT analyzer software IRSoft program (Testo SE & Co. KGaA, Germany). Data were statistically processed in the UNISTAT 6.5 for Excel program (Unistat Ltd., UK). After testing for normality, a paired t-test was used for the significance of the differences between surface temperatures in individual phases and individual parts of the eye, and parametric Pearson's correlation was used to assess the dependence between the observed temperatures - the values of the correlation coefficients were calculated, including their statistical significance.

## Results and discussion

Graph No. 1 shows comparisons of the average values of surface temperature measured in different places of the left and right eye of dogs in the waiting room and in consulting room before, during and after treatment.



Graph 1: Average temperatures of the left and right eye at different locations

A statistically insignificant difference ( $p > 0.05$ ) was found in the surface temperature between the hottest point and the lacrimal caruncle of the right eye and in the surface temperature between the hottest point and the lacrimal caruncle of the left eye in waiting room after 5 and 10 minutes, in consulting room before examination and during examination, whereas a statistically significant difference was found in surface temperatures between the hottest point and the lacrimal caruncle of the right eye ( $p = 0.0337$ ) and between the hottest spot and the lacrimal caruncle of the left eye ( $p = 0.0289$ ) in post-examination phase. No statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) was found between the lacrimal caruncle of the left and right eye or between the hottest point of the left and right eye in any phase of examination. Correlation analysis showed a significant correlation ( $p < 0.05$ ;  $r > 0.8642$ ) between the temperature measured in the lacrimal caruncle and the hottest point of the eye in both the right and left eye, and between the lacrimal caruncle of the left and right eye as well

as the hottest points of the left and right eye ( $p = 0.0000$ ) during all phases of the examination. Similarly, Travain et al. (2015) reported that average values of the left and right eye of dogs were not statistically significantly different, and the temperature values in the lacrimal caruncle of both eyes were significantly correlated, and therefore it is possible to use the lacrimal caruncle of the left and right eye for stress assessment. Giannetto et al. (2021) also found that average left and right eye temperatures showed no statistical differences when assessing surface temperature in cats. In contrast, Elias et al. (2021) reported that the right eye showed a higher flux of temperature changes than the left eye after the dog race, but there was no significant difference between the temperature of the right and left eye before the races, which is in agreement with the results of our study. Our results also support the findings made by Elias et al. (2021) that the lacrimal caruncle has the highest sensitivity to changes in temperature.

### Conclusion

In our study, we found that both left and right eye can be used to evaluate changes in surface temperature, as there is no statistically significant difference between the temperatures of the two eyes. Furthermore, both lacrimal caruncle and the hottest point can be used as a reference point, because there is a highly significant correlation between these two points. Our findings will be applied in our further research focused on the use of infrared thermography in the stress assessment in dogs.

### References

- COOK, N.J., SCHAEFER, A.L., CHURCH, J.S. Nutritional therapy modulates stress responses of elk (*Cervus elaphus canadensis*) to removal of velvet antler. *Online journal of Veterinary Research*. 2006, vol. 10, s. 20–25.
- COOK, N.J., SCHAEFER, A.L., WARREN, L., BURWASH, L., ANDERSON, M., BARON, V. Adrenocortical and metabolic responses to ACTH injection in horses: an assessment by salivary cortisol and infrared thermography of the eye. *Canadian Journal of Animal Science*. 2001, vol. 81, s. 621.
- ELIAS, B., STARLING, M., WILSON, B., MCGREEVY, P. Influences on Infrared Thermography of the Canine Eye in Relation to the Stress and Arousal of Racing Greyhounds. *Animals*, 2021, vol. 11, no. 1, s. 103.
- GIANNETTO, C., DI PIETRO, S., FALCONE, A., PENNISI, M., GIUDICE, E., PICCIONE, G., ACRI, G. Thermographic ocular temperature correlated with rectal temperature in cats. *Journal of Thermal Biology*. 2021, vol. 102.
- PAVLIDIS, I., EBERHARDT, N.L., LEVINE, J.A. Seeing through the face of deception. *Nature*. 2002, vol. 415, s. 35.
- TRAVAIN, T., VALSECCHI, P. Infrared Thermography in the Study of Animals' Emotional Responses: A Critical Review. *Animals*. 2021, vol. 11, no. 9, s 2510.
- TRAVAIN, T., COLOMBO, E.S., HEINZL, E.U.L., BELLUCCI, D., PRATO PREVIDE, E., VALSECCHI, P. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*) - A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior Clinical Applications and Research*. 2015, vol. 10, s. 17–23.
- VALERA, M., BARTOLOMÉ, E., SÁNCHEZ, M.J., MOLINA, A., COOK, N., SCHAEFER, A. Changes in Eye Temperature and Stress Assessment in Horses During Show Jumping Competitions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012, vol. 32, s 827–830.

**Contact address:** Veronika Pokorná, Mgr., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21280@vfu.cz

## Assessing the influence of visual contact on acute stress responses during husbandry procedures in Wallachian sheep

<sup>1</sup>Kotianová Lucia, <sup>1</sup>Lakomá Tereza, <sup>1</sup>Vacušková Zdeňka, <sup>1</sup>Vacuška Dominik, <sup>1</sup>Voslářová Eva, <sup>1</sup>Večerek Vladimír

<sup>1</sup>Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic

### Summary

Visual contact plays an important role during stressful situations in social animals such as sheep. Factors contributing to stress in small ruminants could be linked to improper management practices, routine veterinary procedures, or handling methods. Nowadays, there's a growing interest in non-invasive methods to assess acute stress in farm animals. Behavioural analysis, devoid of physical contact, emerges as a promising avenue for evaluating acute stress in small ruminants. Key behavioural manifestations of acute stress in sheep encompass immobility, escape tendencies, heightened vocalization, and avoidance behaviours. This study aimed to assess the significance of visual contact during routine husbandry practices like wool shearing and hoof trimming in Wallachian sheep, using behavioural observation.

**Keywords:** behaviour; farm animals; sheep

### Introduction

Social isolation induces fear and stress in social animals such as sheep. Parrott et al. (1994) observed heightened plasma stress marker concentrations in adult sheep during isolation, suggestive of psychological stress. Tactile isolation has demonstrable effects on behavioral and physiological parameters in sheep, including cortisol, prolactin, and leukocyte levels (Cockram et al., 1994), subsequently impacting immune function (Degabriele and Fell, 2001). Common husbandry practices, notably wool shearing, can induce stress as evidenced by increased hematocrit and plasma cortisol levels (Hargreaves and Hutson, 1990). Additionally, saliva cortisol levels serve as an indicator of acute stress (Fell et al., 1985), with shearing eliciting heightened heart rates, signifying one of the most stressful husbandry practices (Hargreaves and Hutson, 1990). Nowadays, significant attention is given to non-invasive approaches for evaluating acute stress in farm animals. Assessment methodologies include heart rate monitoring (Bladock and Sibly, 1990) and physiological markers such as salivary cortisol (Al-Qarawi and Ali, 2005). Behavioural coding and for example, infrared thermography emerge as a non-invasive, non-contact alternative for stress assessment, particularly useful for sheep unaccustomed to human interaction (Bartolomé et al., 2019). Facial expression serves as an additional pain indicator in farmed sheep (McLennan et al., 2016). Behavioral manifestations indicative of stress in sheep may include vocalizations, sustained staring, diminished food intake, and rumination. This study aims to evaluate and assess the significance of visual contact during routine husbandry practices like wool shearing and hoof trimming in Wallachian sheep, using behavioural observation.

### Materials and methods

Twenty (n=20) adult Wallachian sheep were randomly selected from a herd situated in the Valašsko region of Czechia. These sheep were divided into two groups: a group of ten (n=10) with visual contact maintained with the remainder of the herd during husbandry procedures, and a second group of ten (n=10) without visual contact during these procedures. Behavioral data were gathered 45 minutes before, during, and following isolation in each group. Video recordings were captured using motion cameras Niceboy Vega X Pro

(NICEBOY s.r.o., Prague, Czech Republic) and analyzed utilizing the Observer XT software (version 16, Noldus, Wageningen, The Netherlands). Each observed individual was assessed for the following behaviors: locomotion, rest, comfort behaviour, food consumption, and rumination. Subsequently, the percentage representation of each behavior during the observation period was compared between the groups. A focal sampling technique was used to collect the data. The results were analyzed using the statistical package Unistat 5.6. (Unistat Ltd., London, England). The normality of data was checked using the Shapiro–Wilk test. In the statistical analysis of the study, a t-test was used. A value of  $p < 0,05$  was determined as statistically significant in statistical tests.

### Results and discussion

Significant differences ( $p < 0,05$ ) were observed in stationary behaviour across all groups. Regarding locomotion, a significant difference ( $p < 0,05$ ) was evident between pre- and post-manipulation groups, regardless of the manipulation method, with sheep exhibiting increased movement activity post-manipulation compared to pre-manipulation. However, no significant difference ( $p < 0,05$ ) in locomotion was observed between groups post-manipulation. In the rest category, significant differences ( $p < 0,05$ ) were found in the percentage of time spent lying down among all groups. Notably, the group with visual contact post-manipulation exhibited no instances of lying down throughout the recording period, whereas the group without visual contact post-manipulation demonstrated reduced lying time compared to pre-manipulation. While no significant difference ( $p < 0,05$ ) was detected in comfort behaviour between groups before and after manipulation, differences were evident between groups post-manipulation. Manipulation did not yield statistically significant effects on food intake; rumination was not considered. However, a significant difference was observed in rumination between the group without visual contact post-manipulation and both groups with visual contact, which did not differ from each other.

Table 1: Percentage occurrence of behaviour in the observed time (45 min) in a given group and comparison of groups with each other.

Behaviour	Before manipulation	After manipulation, without visual contact	After manipulation, with visual contact
Stationary behaviour	43,12 <sup>c</sup>	67,87 <sup>b</sup>	85,07 <sup>a</sup>
Locomotion	2,86 <sup>b</sup>	8,43 <sup>a</sup>	6,22 <sup>a</sup>
Rest / Lying down	45,24 <sup>a</sup>	20,07 <sup>b</sup>	0,00 <sup>c</sup>
Comfort behaviour	1,88 <sup>a,b</sup>	4,33 <sup>a</sup>	0,39 <sup>b</sup>
Food intake	6,97 <sup>a</sup>	9,87 <sup>a</sup>	6,82 <sup>a</sup>
Rumination	29,53 <sup>b</sup>	57,07 <sup>a</sup>	21,84 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> values with a different index within one row indicate a statistically significant ( $p < 0,05$ ) difference.

Parrott et al. (1994) have identified isolation and wool shearing as significant stressors in sheep husbandry. Romeyer and Bouissou (1992) note behavioral signs of fear and stress in sheep, including reduced interest in food, fixed gaze, and increased locomotion in attempts to escape stressors. However, in our study, food intake remained unaffected by the stressor, and rumination even increased in the group without visual contact post-manipulation compared to groups with visual contact. Notably, sheep in the visual contact manipulation group exhibited prolonged standing, potentially driven by a motivation to escape the environment. Furthermore, breed affiliation may influence stress response, as suggested by Hawken et al. (2013) and Hutson and Grandin (2014), who highlight breed-specific differences in response to environmental stress. The same results were described by Cannas et



al. (2018), who evaluated the Sarda breed. Additionally, Milerski and Konrad (2021) characterize the Wallachian sheep breed as well-suited for mountain pasture maintenance due to its walking nature and strong herd instinct.

### Conclusion

Our study findings indicate that the sequence of shearing and hoof trimming in sheep husbandry may impact the level of acute stress response. Furthermore, behavioral assessment emerges as a viable non-invasive contactless method for evaluating acute stress levels in sheep. Additionally, our comparison with other studies suggests that breed-specific factors should be taken into consideration when assessing stress responses in sheep.

### Acknowledgements

This study was supported by ITA VETUNI (Project No. 2023ITA21).

### Literature

AL-QARAWI, A.A., ALI, B.H. Isolation stress in desert sheep and goats and the influence of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Veterinary Research Communications* 2005. 29: 81–90.

BARTOLOMÉ, E., AZCONA, F., CANETE-ARANDA, M., PERDOMO-GONZÁLEZ, D.I., RIBES-PONS, J., TERÁN, E.M. Testing eye temperature assessed with infrared thermography to evaluate stress in meat goats raised in a semi-intensive farming system: a pilot study. *Archives Animal Breeding*, 2019. 62(1): 199-204.

BLADOCK, N.M., SIBLY, R.M. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 1990. 28: 15–39.

CANNAS, S., PALESTRINI, C., CANALI, E., COZZI, B., FERRI, N., HEINZL, E., MINERO, M., CHINCARINI, M., VIGNOLA, G., DALLA COSTA, E. Thermography as a non-invasive measure of stress and fear of humans in sheep. *Animals*, 2018. 8: 146.

COCKRAM, M.S., RANSON, M., IMLAH, P., GODDART, P.J., BURRELLS, C., HARKISS, G.D. The behavioural, endocrine and immune responses of sheep to isolation. *Animal Production*, 1994. 58: 389–389.

DEGABRIELE, R., FELL, L.R. Changes in behaviour, cortisol and lymphocyte types during isolation and group confinement of sheep. *Immunology and Cell Biology*, 2001. 79: 583–589.

FELL, L.R., SHUTT, D.A., BENTLEY, C.J. Development of a salivary cortisol method for detecting changes in plasma „free“ cortisol arising from acute stress in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 1985. 62: 403–406.

HUTSON, G.D., GRANDIN, T. Behavioural principles of sheep handling. In: *Grandin, T.: Livestock handling and transport*. Wallingford UK: CABI, 2014. pp. 193–217.

MCLENNAN, K.M., REBELO, C.J.B., CORKE, M.J., HOLMES, M.A., LEACH, M.A., CONSTANTINO-CASAS, F. Development of a facial expression scale using footrot and mastitis as models of pain in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, 2016. 176: 19–26.

MILERSKI, M., KONRAD, R. Genetické zdroje zvířat a jejich praktické využití. Ministerstvo zemědělství. Praha 2021.

PARROTT, R.F., MISSON, B.H., DE LA RIVA, C.F. Differential stressor effects on the concentrations of cortisol, prolactin and catecholamines in the blood of sheep. *Research in Veterinary Science*, 1994. 56: 234–239.

ROMEYER, A., BOUISSOU, M.F. Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 1992. 34: 93–11.

**Contact address:** Kotianová Lucia, Mgr., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21279@vfu.cz

## Využití obohacení prostředí u morčat v zájmovém chovu – pilotní studie

### Use of enrichment in pet guinea pigs – pilot study

Vacušková Zdeňka, Vacuška Dominik, Večerek Vladimír

*Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

#### Summary

*Environmental enrichment in the form of shelters can be an important element of the breeding environment from an animal welfare point of view. The aim of this study was to assess the usability of shelters in pet guinea pigs by evaluating guinea pig behaviour. Ethological observations were made on 4 guinea pigs over three consecutive days. The results indicate that all guinea pigs were significantly more likely to be inside the provided shelters than outside ( $p < 0.01$ ). The results also demonstrated that guinea pigs exhibited a significantly higher ( $p < 0.01$ ) propensity to utilize the enriched area for lying-down than the non-enriched area.*

**Keywords:** *welfare; environmental enrichment; shelters; behaviour*

#### Úvod

Cílem obohacení prostředí je poskytnout zvířeti zdroj, který mu chybí a tím zvýšit jeho schopnost vyrovnat se s životem v zajetí (Olsson et al., 2003). Dle Haemisch (1990) dochází u morčat ke zvýšené hladině stresových hormonů vlivem jejich umístění do klece s neznámým a chudým prostředím. Současně se morčata zdržují v blízkosti krmných a napájecích míst nebo v rozích klece (White et al., 1989). Důležitou součástí obohacení prostředí jsou přístřešky (Gut et al., 2018), které zvířatům nabízí možnost odpočinku a úniku z otevřeného prostoru (Olsson et al., 2003). Přístřešky zároveň nahrazují průlezy a tunely, které morčata využívají jako útočiště ve volné přírodě (Rood, 1972). Dle Lee et al. (2014) morčata preferují tmavé zóny a vyhledávání úkrytu je tak jejich přirozeným chováním (Gut et al., 2018). V případě, kdy tato potřeba není uspokojena, dochází ke stresu (Ohl and van der Staay, 2012).

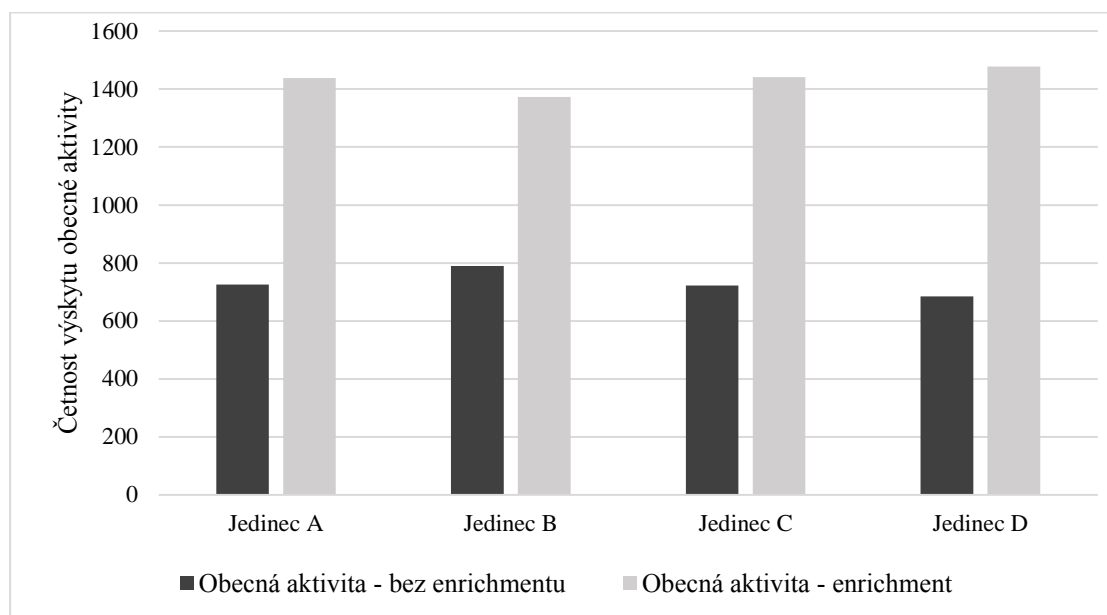
Cílem této studie bylo zhodnotit využitelnost obohacení prostředí v podobě přístřešků u morčat domácích v zájmovém chovu.

#### Materiál a metodika

V rámci hodnocení využití obohacení prostředí neboli enrichmentu u morčat v zájmovém chovu byla provedena etologická pozorování u 4 samců ve věku tří let v průběhu 3 po sobě jdoucích dnů metodou snímkování, a to každou jednu minutu po dobu dvanácti hodin – vždy v čase 08:00-20:00. Teplota prostředí v průběhu pozorování dosahovala 21°C. Pozorování jedinců probíhalo v kleci o velikosti 110x70 cm s adlibitním přístupem k senu a vodě a obohacené o zařízení k úkrytu. Videomateriály byly pořízeny pomocí videokamery Sony AX53 a vyhodnoceny pomocí softwaru Observer XT. U všech jedinců byly zaznamenávány prvky obecné aktivity (stání, ležení, pohyb), která byla rozdělena na obecnou aktivitu projevovanou mimo poskytnuté obohacení prostředí (bez enrichmentu) a obecnou aktivitu projevovanou v místě poskytnutí obohacení prostředí (enrichment). Získaná data byla následně statisticky vyhodnocena v programu Unistat for Excel s využitím  $X^2$  testu. Hodnota  $p > 0,05$  byla stanovena jako statisticky nevýznamný rozdíl, hodnota  $p < 0,05$  jako statisticky významný rozdíl a hodnota  $p < 0,01$  jako statisticky vysoce významný rozdíl.

## Výsledky a diskuze

Zaznamenané četnosti obecné aktivity projevované mimo poskytnuté obohacení prostředí a v místech poskytnutého obohacení prostředí jsou zobrazeny v grafu 1 a tabulce 1.



**Graf 1:** Obecná aktivita morčat bez využití a s využitím enrichmentu

Mezi jedinci A, B, C a D nebyl zaznamenán rozdíl ( $p > 0,05$ ) v četnosti obecné aktivity v místech s poskytnutým enrichmentem ani v četnosti obecné aktivity mimo poskytnutý enrichment. Znamená to, že u všech pozorovaných jedinců byl poměr obecné aktivity s enrichmentem a bez enrichmentu stejný. Na základě zaznamenaných četností bylo zjištěno, že všichni jedinci morčete domácího se vyskytovali v průběhu pozorování vysoce významně více ( $p < 0,01$ ) v místech s poskytnutým enrichmentem než mimo poskytnutý enrichment, což může být způsobeno jejich preferencí tmavých míst (Lee et al., 2014). Obdobně i Helbing et al. (2023) při hodnocení chování morčat zjistili, že většinu doby pozorování morčata trávila v poskytnutém přístřešku. Zaznamenané výsledky dokládají význam enrichmentu a jeho poskytnutí zvířatům chovaným v zajetí.

**Tabulka 1:** Četnosti výskytu jednotlivých prvků obecné aktivity

	Jedinec A		Jedinec B		Jedinec C		Jedinec D	
	Bez enrichmentu	Enrichment	Bez enrichmentu	Enrichment	Bez enrichmentu	Enrichment	Bez enrichmentu	Enrichment
<b>Stání</b>	690	478	730	444	692	463	691	465
<b>Ležení</b>	6	960	6	961	9	978	1	985
<b>Pohyb</b>	29	0	22	0	21	0	21	0

Z výsledků dále vyplývá, že všichni pozorovaní jedinci využívali pro ležení vysoce významně více ( $p < 0,01$ ) poskytnutý přístřešek než prostor bez enrichmentu. Tato skutečnost může být způsobena tím, že přístřešek poskytuje zvířatům bezpečné útočiště v podobě krytého místa v jinak otevřené kleci (Olsson et al., 2003), a proto využívají k ležení a s ním spojenému odpočinku právě prostor pod přístřeškem. Také při vyhodnocení obecné aktivity stání byly zjištěny vysoce významné rozdíly ( $p < 0,01$ ) v četnostech tohoto prvku chování. Stání se

ovšem vyskytovalo ve vyšší míře v prostoru mimo poskytnuté obohacení prostředí, což bylo způsobeno především návštěvami krmných a napájecích míst. Poté se jedinci ihned vraceli zpět do dostupného přístřešku. Tato zjištění podporují tvrzení Gut et al. (2018) o tom, že přístřešky jsou důležitou součástí obohacení prostředí morčat.

### Závěr

Všichni jedinci zařazení do této studie se v průběhu pozorování celkově více vyskytovali v poskytnutém přístřešku než mimo tato místa, a to i přes to, že četnost stání byla vyšší mimo poskytované obohacení prostředí. Pro ležení si naopak pozorování jedinci vybírali především prostor pod přístřeškem. Výsledky ukazují, že obohacení prostředí morčat v podobě úkrytů lze považovat za nezbytný prvek v chovném zařízení z pohledu zvířat, který by morčatům měl být poskytnut.

### Literatura

GUT, W., CRUMP, L., ZINSSTAG, J., HATTENDORF, J., HEDIGER, K. The effect of human interaction on Guinea pig behavior in animal-assisted therapy. *Journal of Veterinary Behavior*. 2018, vol. 25, s. 56-64.

HAEMISCH, A. Coping with social conflict and shortterm changes of plasma cortisol titers in familiar and unfamiliar enrichments. *Physiology & Behaviour*. 1990, vol. 47, no. 6, s. 1265-1270.

HELBING, J., SPITTLER, A.P., SADAR, M.J., SANTANGELO, K. Optimization of overhead enclosure monitoring in juvenile male Dunkin Hartley Guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Laboratory Animals*. 2023, vol. 57, no. 5, s. 552-564.

LEE, K.N., PELLOM, S.T., OLIVER, E., CHIRWA, S. Characterization of the guinea pig animal model and subsequent comparison of the behavioral effects of selective dopaminergic drugs and methamphetamine. *Synapse*. 2014, vol. 68, no. 5, s. 221-233.

OHL, F., VAN DER STAAY, F.J. Animal welfare: at the interface between science and society. *The Veterinary Journal*. 2012, vol. 192, no. 1, s. 13-19.

OLSSON, I.A.S., NEVISON, C.M., PATTERSON-KANE, E.G., SHERWIN, C.M., VAN DE WEERD, H.A., WÜRBEL, H. Understanding behaviour: The relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science*. 2003, vol. 81, no. 3, s. 245-264.

ROOD, J.P. Ecological and behavioural comparisons of three genera of argentine caviés. *Animal Behaviour Monographs*. 1972, vol. 5, s. 3-83.

WHITE, W.J., BALK, M.W., LANG, C.M. Use of cage space by Guinea pigs. *Laboratory Animals*. 1989, vol. 23, no. 3, s. 208-214.

**Kontaktní adresa:** Vacušková Zdeňka, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, [H22346@vfu.cz](mailto:H22346@vfu.cz)

## Současná situace v problematice využití enrichmentu v chovech králíků

### Current situation in use of enrichment in rabbit breeding

Lakomá Tereza, Večerek Vladimír

*Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,  
Veterinární univerzita Brno*

#### Summary

*Rabbits are one of the few species of animals that are bred for economic and pet purposes and are also used as experimental animals. Each breeding environment creates its own different conditions to which the animal must adapt, which, particularly in stimulus-poor environments, can result in behavioural disorders. The use of enrichment in rabbit breeding is an appropriate solution, but it is necessary that the enrichment is correctly selected and adequately used by the rabbit. The inclusion of food enrichment, which reflects the natural need for frequent food intake, is appropriate but cannot be applied in all types of breeding. This review focuses on the use of different types of enrichment in rabbit breeding.*

**Keywords:** *Oryctolagus cuniculus; animal welfare; behavioral needs; environmental enrichment*

#### Úvod

Králíci bývají, jako zvířata hospodářská, zájmová i laboratorní, často chováni v klecových systémech. Omezený životní prostor může mít za následek snížení welfare králíků. Chovem v neobohaceném prostředí mohou vznikat poruchy chování. Pro zlepšení kvality života takto chovaných králíků je vhodné využít environmentální enrichment. Enrichment je potřeba kriticky posoudit, zda odpovídá behaviorálním potřebám zvířat. Teprve tehdy bude jeho začlenění do chovného zařízení účelné.

Cílem tohoto přehledového článku bylo popsat současný stav poznatků v oblasti využití různého typu enrichmentu v chovech králíků a také jeho vliv na chování a welfare králíků.

#### Environmentální enrichment v chovech králíků

Podmínky prostředí ovlivňují jedince po celý život (Van de Weerd et al., 2002). Obohacení prostředí definujeme jako jakoukoli úpravu životního prostoru chovaných zvířat, která jim poskytuje podněty zlepšující jejich fyzickou a psychickou pohodu (Baumans, 2005). Tím mohou být uspokojeny jejich druhově specifické potřeby (Vera, 2005). Životní prostor by měl podporovat druhově typické chování (Johnson et al., 2003), jako je běh, skákání, okusování, hrabání (Verga et al., 2007).

Obohacení prostředí by nemělo být náhodné, funkční enrichment je správně navržený, kriticky posouzený a spočívá ve využití přirozeného chování zvířat, u králíků se využívá chování potravní, sociální či explorační (Baumans, 2005). Environmentální enrichment může snížit nežádoucí tlak prostředí (zejména v živočišné výrobě), zmírnit projevy abnormálního chování a zvýšit pohodu chovaných zvířat (Bozicovich et al., 2016). U králíků je jedním z primárních vzorců chování hledání potravy (Young, 2013), projevem abnormálního chování proto bývá často kousání mříží či drátěného pletiva (Verga et al., 2007). U rostoucích mláďat toto nežádoucí chování zmírňuje využití dřívěk k okusu (Princz et al., 2007), která zvyšují pohodu králíků a jejich využití je vhodné i z hlediska jatečné výtěžnosti (Mohammed and Nasr, 2017). Na téma zvýšení užitkovosti a kvality finálního výrobku upřednostňováním dobrých životních podmínek zvířat upozorní El-Sabrou (2024). Výzkum v oblasti zlepšování

podmínek ustájení králíků v individuálních klecích je podporován i mezinárodními asociacemi pro laboratorní zvířata a v národních předpisech (Kostomitsopoulos et al., 2017).

Ve studiích se často objevoval pouze jeden typ enrichmentu, nebo šlo o srovnávací analýzu environmentálního enrichmentu podobného typu – například využití větví různých stromů (Bozicovich et al., 2016; Princz et al., 2007; Mohammed and Nasr, 2017). Příkladem studie, která se zabývala pouze jedním typem enrichmentu, byla studie Kostomitsopoulos et al. (2017). Autoři hodnotili možnosti využití komerčně dostupného přístřešku u individuálně ustájených králíků. Tito králíci nejvíce interagovali s použitým enrichmentem v ranních a odpoledních hodinách, kdy obohacení využívali různými způsoby: pobyt pod přístřeškem, okusování přístřešku, přemísťování přístřešku, hra s přístřeškem. Tyto poznatky autory vedli k otázce vhodnosti využití předmětu, kdy některé z projevených interakcí s ním mohli poukazovat nejen na zvědavost a zájem, ale také na frustraci z něj. Typově různorodý enrichment porovnávala studie Feng et al. (2022), do které byla zařazena gumová hračka, plechovka naplněná fazolemi a dřevěná tyč. Králíci, kteří jako obohacení dostali plechovku s fazolemi, trávili více času hrou s enrichmentem oproti ostatním skupinám. Nejméně času se věnovali enrichmentu králíci ve skupině s dřevěnou tyčí. Ve všech skupinách, ve kterých byl zařazen enrichment, bylo pozorováno méně abnormálních projevů chování oproti kontrolní skupině. Doba odpočinku ve skupinách s obohacením byla kratší oproti skupině, která obohacení neměla. Komfortní chování vykazovali častěji králíci ze skupin s obohacením. V některých studiích byly použity předměty, které nejsou komerčně dostupné a je obtížné je získat (Silva et al., 2021). Využívalo se laboratorních zvířat (Poggiagliolmi et al., 2011), často samic a mláďat (Rommers et al., 2014; Bozicovich et al., 2016). Zkoumáno bylo využití pater v chovném zařízení (Trocino et al., 2019).

Určení ideálního environmentálního enrichmentu se jeví jako obtížné (Feng et al., 2022), nicméně obecně platí, že králíci preferují obohacení prostředí spojené s možností projevit potravní chování (Princz et al., 2009). Potravní enrichment u králíků zvyšuje pohybovou aktivitu a zvířata se k enrichmentu rychleji přibližují, což lze považovat za pozitivní reakci na zařazení nového podnětu do chovného prostoru (Birolo et al., 2022). Obecně dále platí, že efekt zařazení enrichmentu do chovného prostředí v průběhu času klesá. Je tedy potřeba enrichment v klecích obměňovat (Johnson et al., 2003).

### **Závěr**

Obohacení prostředí je žádoucí ve všech typech chovů králíků. Zvolený enrichment by měl odrážet přirozené behaviorální potřeby zvířat a měl by být často obměňován, aby si zachoval svoji efektivitu. Vhodné je zařazení potravního obohacení chovného prostředí, které stimuluje přirozenou potřebu zvířat hledat a přijímat potravu.

### **Literatura**

BAUMANS, V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *Institute of Laboratory Animal Research Journal*, 2005, 46(2): 162–170.

BIROLO, M., TROCINO, A., ZUFFELLATO, A., PIRRONE, F., BORDIGNON, F., XICCATO, G. Use of Gnawing Hay Blocks: Effects on Productive Performance, Behavior and Reactivity of Growing Rabbits Kept in Parks with Different Sex-Group Compositions. *Animals*, 2022, 12(9): 1212.

BOZICOVICH, T.F.M., MOURA, A.S.A.M.T., FERNANDES, S., OLIVEIRA, A.A., SIQUEIRA, E.R.S. Effect of environmental enrichment and composition of the social group on the behavior, welfare, and relative brain weight of growing rabbits. *Applied Animal Behaviour Science*, 2016, 182: 72–79.

- EL-SABROUT, K. Environmental enrichment for better poultry and rabbits' life. 2024. Research Proposal.
- FENG, Y., FAN, H., LIANG, X., WANG, X., GAO, G., GUN, S. Environmental enrichment changes rabbits' behavior, serum hormone level and further affects cecal microbiota. *PeerJ*, 2022, 10: e13068.
- JOHNSON, C. A., PALLOZZI, W. A., GEIGER, L., SZUMIŁOSKI, J. L., CASTIGLIA, L., DAHL, N. P., DESTEFANO, J.A., PRATT, S.J., HALL, S.J., BEARE, C.M., GALLAGHER, M., KLEIN, H.J. The effect of an environmental enrichment device on individually caged rabbits in a safety assessment facility. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2003 42(5): 27–30.
- KOSTOMITSOPOULOS, N., SERAFETINIDOU, M., KATSAROU, A., VOYAZAKI, C., DONTAS, I. Evaluation of an environmental enrichment device used for laboratory rabbits. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 2015, 66(1): 41–47.
- MOHAMMED, H., NASR, M. Growth performance, carcass traits, behaviour and welfare of New Zealand White rabbits housed in different enriched cages. *Animal Production Science*, 2017, 57(8): 1759–1766.
- POGGIAGLIOLMI, S., CROWELL-DAVIS, S.L., ALWORTH, L.C., HARVEY, S.B. Environmental enrichment of New Zealand White rabbits living in laboratory cages. *Journal of Veterinary Behavior*, 2011, 6(6): 343–350.
- PRINCZ, Z., OROVA, Z., NAGY, I., JORDAN, D., ŠTUHEC, I., LUZI, F., VERGA, M., SZENDRŐ, Z. Application of gnawing sticks in rabbit housing. *World Rabbit Science*, 2007, 15(1): 29–36.
- PRINCZ, Z., DALLE ZOTTE, A., METZGER S., RADNAI, I., BIRÓ-NÉMETH, E., OROVA Z., SZENDRŐ, Z. Response of fattening rabbits reared under different housing conditions. 1. Live performance and health status. *Livestock Science*, 2009, 121(1): 86–91.
- ROMMERS, J.M., BRACKE, M.B.M., REUVEKAMP, B., GUNNINK, H., DEJONG, I.C. Cage-enrichment: rabbit does prefer straw or a compressed wooden block. *World Rabbit Science*, 2014, 22(4): 301–309.
- SILVA, K.G.D., STANGE, M.G., PERGORARA, M., SOTOMAIOR, C.S., WEBER, S.H., BORGES, T.D., COSTA, L.B. Cardboard and rubber objects as means of environmental enrichment for rabbits. *World Rabbit Science*, 2021, 29(2): 109–114.
- TROCINO, A., ZOMEÑO, C., FILIOU, E., BIROLO, M., WHITE, P., XICCATO, G. The use of environmental enrichments affects performance and behavior of growing rabbits housed in collective pens. *Animals*, 2019, 9(8): 537.
- VAN DE WEERD, H.A., AARSEN, E.L., MULDER, A., KRUITWAGEN, C.L., HENDRIKSEN, C.F., BAUMANS, V. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2002, 5(2): 87–109.
- VERA, B. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *Ilar Journal*, 2005, 46(2): 162–170.
- VERGA, M., LUZI, F., CARENZI, C. Effects of husbandry and management systems on physiology and behaviour of farmed and laboratory rabbits. *Hormones and Behavior*, 2007, 52(1): 122–129.
- YOUNG, R.J. Environmental enrichment for captive animals. John Wiley & Sons, 2013.

**Kontaktní adresa:** Tereza Lakomá, Mgr. Ing., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22348@vfu.cz

## Behaviorální projevy psů v průběhu canisterapeutických zkoušek

### Behavior of dogs during canistherapy exams

Vacuška Dominik, Vacušková Zdeňka, Večerek Vladimír

*Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno*

#### Summary

*Canistherapy practice may have a stressful potential for dogs. The aim of this study was to evaluate the behavioural manifestations associated with stress reactions in dogs during canistherapy exam. Ethological observations were made on 15 dogs during four canistherapy exam disciplines. The result demonstrate that licking and whale eye were the most frequently used behavioural elements during the exam ( $p < 0.01$ ). The frequencies of the analysed behavioural elements were found to be higher during disciplines involving intensive examiner-dog contact ( $p = 0.0000$ ). Differences in the frequencies of specific behavioural elements were then observed during contact disciplines.*

**Keywords:** *welfare; calming signals; ethology; animal-assisted therapy; canine*

#### Úvod

Psi jsou díky své relativně snadné cvičitelnosti, předvídatelnému chování a dostupnosti běžně využíváni jako terapeutická zvířata (Glenk, 2017). Přestože terapeutičtí psi absolvují speciální výcvik a procházejí canisterapeutickými zkouškami, mohou během pracovní směny stále zažívat stres. Velká část dostupných výzkumů pozoruje behaviorální známky stresu u psů. Behaviorální známky stresu u psů zahrnují zvýšenou lokomoční aktivitu, úlekové reakce, lapání po dechu, rozšíření zornic či takzvané velrybí oko, uhýbání pohledem, chvění, kňučení, nadměrné olizování, zívání, schovávání se, zdvihání končetiny a snížené držení těla (Beerda et al., 1999; Beerda et al., 2000; Dreschel and Granger, 2005). Změny v pohybu, postoji těla či výrazu tváře jsou citlivými indikátory emocionálního stavu jedince (Hall et al., 2018; Bremhorst et al., 2019). Psi mohou zažívat stres během své pracovní doby asistování lidem, bez ohledu na to, zda se jedná o terapeutickou intervenci či jinou interakci (Beerda et al., 1999; Haubenhofner and Kirchengast, 2006). Vliv na behaviorální projevy stresu u psů má věk a zkušenosti využívaných psů (King et al., 2011; Glenk et al., 2014), nově vzniklé situace a nové sociálně-ekologické okolnosti, se kterými se psi vyrovnávají (Ng et al., 2014; Haubenhofner et al., 2005) a také denní doba či počet terapeutických intervencí za jednotku času (Haubenhofner and Kirchengast, 2006; Haubenhofner and Kirchengast, 2007). Hladinu akutního stresu může ovlivňovat i uvázání psa na vodítku během intervence. Použití vodítka, tedy metody dávající psům příležitost přiblížit se či se vyhnout kontaktu s lidmi, má významný vliv na hladinu stresového markeru kortizolu ve slinách terapeutických psů (Glenk et al., 2013). Otázkou výzkumu nadále zůstává do jaké míry jsou zmíněné behaviorální projevy známkou pozitivního vzrušení či negativního stresu (Haubenhofner and Kirchengast, 2006).

#### Materiál a metodika

K analýze behaviorálních projevů psů v průběhu canisterapeutických zkoušek bylo využito 15 účastníků se jedinců. Mezi hodnocené behaviorální projevy psů byly na základě odborné literatury zařazeny následující prvky chování – olizování, uhýbání pohledem, velrybí oko, hledání vizuálního kontaktu s majitelem, otřepání, snaha odejít a zdvihání končetiny. Četnosti jednotlivých prvků chování byly hodnoceny s ohledem na jejich frekvenci jak celkově, tak i u konkrétních zkušebních disciplín (návyk na zdravotnické pomůcky, test reakce na náhlé podněty, tedy dvě méně kontaktní disciplíny a dvě disciplíny kontaktní



označené jako vstup do osobního prostoru a zvedání psa cizím člověkem), a také s ohledem na míru kontaktu examinátora a psa v daných disciplínách. Videozáznamy byly pořízeny paralelně pomocí dvou videokamer Sony AX53 a vyhodnoceny pomocí softwaru Observer XT. Získaná data byla následně statisticky vyhodnocena v programu Unistat for Excel s využitím  $X^2$  testu. Hodnota  $p > 0,05$  byla stanovena jako statisticky nevýznamná. Naopak hodnota  $p < 0,05$  byla vyhodnocena jako statisticky významná a hodnota  $p < 0,01$  jako statisticky vysoce významná.

### Výsledky a diskuze

Z analyzovaných behaviorálních projevů psů v průběhu canisterapeutických zkoušek hodnocení jedinci nejvíce vykazovali olizování se a takzvané velrybí oko ( $p < 0,01$ ). Mezi četnostmi využívání těchto projevů chování nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ( $p = 0,8163$ ). Zmíněné prvky chování jsou často spojovány se stresovou situací nebo také s frustrací psů (Beerda et al., 2000; Bremhorst et al., 2019). Nejméně psi v potenciálně stresových situacích využívali z analyzovaných prvků chování zdvihání končetiny ( $p < 0,01$ ). Více behaviorálních prvků spojovaných se stresem bylo psy projevováno v průběhu disciplín, při nichž docházelo k intenzivnímu kontaktu examinátora a psů ( $p = 0,0000$ ). Tento rozdíl je patrně způsoben nuceným kontaktem a nemožností úniku z takové situace. I potenciální možnost úniku má v takových případech pro psy značný význam (Glenk et al., 2013). Z popsáných rozdílů je zřejmé, že psi se s každou nově vzniklou situací vyrovnávají pomocí jiných behaviorálních projevů také s ohledem na zkušenosti či denní dobu (Haubenhofner et al., 2005; Haubenhofner and Kirchengast, 2006), přičemž závisí na míře kontaktu cizího člověka se psem (Beerda et al., 1999; Glenk et al., 2014). V průběhu absolvování kontaktních disciplín byl zaznamenán rozdíl ve využívání určitých prvků chování. Behaviorální projev označován jako hledání majitele vykazovali psi nejvíce v průběhu absolvování disciplíny zvedání psa cizím člověkem a to i v porovnání s druhou hodnocenou kontaktní disciplínou – vstup do osobního prostoru ( $p = 0,0466$ ). Opačně bylo v těchto dvou disciplínách psy využíváno konejšení otřepáním, které psi vykazovali nejvíce právě při zkoušce tolerance examinátora v osobním prostoru jedince ( $p = 0,0381$ ).

### Závěr

Mezi nejvyužívanější behaviorální projevy spojené s akutním stresem u psů účastnících se canisterapeutických zkoušek patřilo olizování se a takzvané velrybí oko. Poměrně hojně využívání konejšivých signálů právě u nezkušených psů v průběhu zmíněných zkoušek je způsobeno rovněž potřebou lehce překročit limity psů tak, aby byla co nejlépe prokázána jejich připravenost pro praxi v potenciálně stresovém prostředí. Alespoň zdánlivá možnost úniku se pak u psů projevuje na rozdílech četností prvků chování u více či méně kontaktních disciplín canisterapeutických zkoušek. Z četností využívání chování označeného jako hledání chovatele lze předpokládat důležitost vazby psa s chovatelem během praxe a podtrhává tak důležitost sehranosti canisterapeutického týmu pes – chovatel.

### Literatura

BEERDA, B., SCHILDER, M. B. H., VAN HOOFF, J. A. R. A. M., DE VRIES, H. W., MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. *Physiology & Behavior*. 1999, vol. 66, no. 2, s. 233-242.

BEERDA, B., SCHILDER, M. B. H., VAN HOOFF, J. A. R. A. M., DE VRIES, H. W., MOL, J. A. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*. 2000, vol. 9, no. 1, s. 49-62.

- BREMHORST, A., SUTTER, N. A., WÜRBEL, H., MILLS, D. S., RIEMER, S. Differences in facial expressions during positive anticipation and frustration in dogs awaiting a reward. *Scientific Reports*. 2019, vol. 9: 19312.
- DRESCHER, N. A., GRANGER, D.A. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. *Applied Animal Behaviour Science*. 2005, vol. 95, no. 3-4, s. 153-168.
- GLENK, L.M. Current perspectives on therapy dog welfare in animal-assisted interventions. *Animals*. 2017, vol. 7, no. 2: 7.
- GLENK, L. M., KOTHGASSNER, O. D., STETINA, B. U., PALME, R., KEPPLINGER, B., BARAN, H. Therapy dogs' salivary cortisol levels vary during animal-assisted interventions. *Animal Welfare*. 2013, vol. 22, no. 3, s. 369-378.
- GLENK, L. M., KOTHGASSNER, O. D., STETINA, B. U., PALME, R., KEPPLINGER, B., BARAN, H. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*. 2014, vol. 9, no. 3, s. 98-106.
- HALL, C., RANDLE, H., PEARSON, G., PRESHAW, L., WARAN, N. Assessing equine emotional state. *Applied Animal Behaviour Science*. 2018, vol. 205, s. 183-193.
- HAUBENHOFER, D. K., KIRCHENGAST, S. Physiological arousal for companion dogs working with their owners in animal-assisted activities and animal-assisted therapy. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2006, vol. 9, no. 2, s. 165-172.
- HAUBENHOFER, D. K., KIRCHENGAST, S. Dog handlers and dogs emotional and cortisol secretion responses associated with animal-assisted therapy sessions. *Society & Animals*. 2007, vol. 15, s. 127-150.
- HAUBENHOFER, D., MÖSTL, E., KIRCHENGAST, S. Cortisol concentrations in saliva of humans and their dogs during intensive training courses in animal-assisted therapy. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 2005, vol. 92, no. 3, s. 66-73.
- KING, C., WATTERS, J., MUNGRE, S. Effect of a time-out session with working animal-assisted therapy dogs. *Journal of Veterinary Behavior*. 2011, vol. 6, no. 4, s. 232-238.
- NG, Z. Y., PIERCE, B. J., OTTO, C. M., BUECHNER-MAXWELL, V. A., SIRACUSA, C., WERRE, S. R. The effect of dog-human interaction on cortisol and behavior in registered animal-assisted activity dogs. *Applied Animal Behaviour Science*. 2014, vol. 159, s. 69-81.

**Kontaktní adresa:** Vacuška Dominik, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, [H22345@vfu.cz](mailto:H22345@vfu.cz)

## VLIV GABAPENTINU NA RANÁ VÝVOJOVÁ STÁDIA KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*)

### EFFECT OF GABAPENTIN ON EARLY DEVELOPMENTAL STAGES OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

<sup>1</sup>Hesová, R., <sup>1</sup>Doubková, V., <sup>1</sup>Riesová, B., <sup>1</sup>Svobodová, Z., <sup>2</sup>Zicarelli G., <sup>1</sup>Lakdawala, P.

*1 Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika,*

*2 Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche, ed Ambientali – Università di Messina, Italia*

#### Summary

Recently, there has been a sharp increase in the consumption of drugs, in particular gabapentin (GBP), which is widely used to treat epilepsy and neuropathic pain and also off-label for bipolar disorder, migraine and restless legs syndrome. GBP, like other drugs, leaches into water bodies since wastewater treatment plants have proven to be ineffective in removing them from wastewater. The aim of our study was to assess the effect of GBP on fish in early life stages. Using OECD 210 methodology, 31 days long toxicity test with GBP was performed. After the test, samples were taken and analysed for oxidative stress indicators and subjected to histopathological examination. The findings revealed remarkable changes in fish exposed to higher doses of GBP, manifested by increases in weight and length, together with effects on antioxidant enzymes and oxidative damage to tissues, proteins, and DNA. These results underline the potential toxicological threat to aquatic organisms.

**Keywords:** antiepileptics; drugs; embryo; embryo-larval stages; fish; toxicity

#### Úvod

Gabapentin (GBP) je využíván k léčbě epilepsie, neuropatické bolesti, a mimo schváleného použití také k léčbě bipolární poruchy a prevence migrény a syndromu neklidných nohou (Abou-Khalil 2019). Jeho použití se rozšířilo i do veterinární medicíny, kde se využívá zejména pro léčbu chronické a neuropatické bolesti u psů, koček a koní a poslední době i jako léčivo při separačních úzkostech koček a psů. U GBP navíc nedochází k metabolizaci v lidském, a mimo psů, ani zvířecím organismu, a proto je rychlost vylučování člověkem velmi vysoká (Di Cesare et al. 2023). GBP se tak dostává do odpadních vod a čistírny odpadních vod ho následně nedokáží účinně, což vede k jeho detekci ve vodním prostředí (Ferencik et al. 2022).

Cílem naší práce bylo posoudit subchronickou toxicitu GBP na raná vývojová stádia kapra obecného (*Cyprinus carpio*), konkrétně jeho vliv na vývoj a potenciál vyvolat oxidační stres v organismu a následně oxidační poškození lipidů, proteinů a DNA.

#### Materiál a metody

Test subchronické toxicity s léčivem GBP na kapru obecném (*Cyprinus carpio*) byl proveden podle metodiky OECD č. 210 semistatickou metodou s pravidelnou výměnou lázně po 12 hodinách. Na začátku experimentu byly oplozené jikry vizuálně vyselektovány a zkontrolovány pod stereomikroskopem a následně umístěny do krystalizačních misek po 100 jedincích. Každá testovaná skupina byla nasazena v triplikátu čili každá koncentrace byla testována celkem na 300 oplozených jikrách. GBP byl testován celkem v pěti koncentracích 1; 10; 100; 1000; 10000 µg/L, při čemž nejnižší koncentrace testované látky odpovídala enviromentální koncentraci. Testovaná látka byla aplikována do vody, přičemž testované roztoky byly dvakrát denně připravovány čerstvé. Ryby byly krmeny 2x denně čerstvě

vylíhlými *Artemia salina* a zároveň byly v testovacích nádobách dvakrát denně kontrolovány indikátory kvality vody (pH, koncentrace kyslíku, teplota, dusičnany, dusitany a celkový amoniak). Trvání experimentu bylo stanoveno na dobu larválního vývoje (tj. 28 dní od vylíhnutí). Experiment byl ukončen eutanázií larválních stádií ryb pomocí anestetika tricain methanosulfonátu (MS 222). Po skončení testu byly odebrány vzorky larev pro měření délky a hmotnosti a jednotlivé analýzy. Pro vyhodnocení účinků na biomarkery oxidačního stresu byly stanoveny aktivity antioxidantních enzymů, lipoperoxidační poškození tkání, poškození proteinů a DNA, a byly posouzeny případné histopatologické změny. Zjištěné výsledky byly v závěru statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru Unistat 6.5 pro Excel.

### Výsledky a diskuse

Po statistickém vyhodnocení nebyly prokázány významný vliv gabapentinu na mortalitu a míru a rychlost líhnutí u kapra obecného v porovnání s kontrolní skupinou, byl však zaznamenán statisticky významný vliv ( $p \leq 0,05$ ) na zvýšenou délku a váhu larev ve skupině s testovanou koncentrací 10 000  $\mu\text{g/L}$  (tab. 1). Li et. al (2018) naopak zaznamenali redukci délky u danií pruhovaných (*Danio rerio*) a žádný vliv na jejich hmotnost.

Tabulka 1: Vliv gabapentinu na délku a hmotnost larev kapra obecného

GBP (testované skupiny)	Délka mm	
	Délka v mm	Váha v mg
kontrola	11.03 $\pm$ 0.22	14.50 $\pm$ 0.90
1 $\mu\text{g/L}$	11.56 $\pm$ 0.27	16.55 $\pm$ 1.52
10 $\mu\text{g/L}$	11.88 $\pm$ 0.32	17.25 $\pm$ 2.32
100 $\mu\text{g/L}$	11.04 $\pm$ 0.38	14.85 $\pm$ 1.92
1 000 $\mu\text{g/L}$	11.27 $\pm$ 0.23	14.60 $\pm$ 0.74
10 000 $\mu\text{g/L}$	<b>12.18 <math>\pm</math> 0.26*</b>	<b>20.75 <math>\pm</math> 1.46*</b>
Hodnoty uvedené v tabulce jsou medián $\pm$ směrodatná chyba; * $p \leq 0,05$ , ** $p \leq 0,01$		

V rámci vyhodnocení biomarkerů oxidačního stresu bylo zaznamenáno staticky vysoce významné ( $p \leq 0,01$ ) snížení aktivity superoxiddismutázy (SOD) ve skupinách 10;100 a 1 000  $\mu\text{g/L}$ , zároveň byla zaznamenána významná ( $p \leq 0,05$ ) a vysoce významná ( $p \leq 0,01$ ) snížení aktivity glutationperoxidázy (GPx) ve skupinách 100; 1 000 a 10 000  $\mu\text{g/L}$  a vysoce významné snížení ( $p \leq 0,01$ ) aktivity katalázy (CAT) v nejvyšší testované skupině. Navíc ale došlo také k významnému snížení ( $p \leq 0,05$ ) aktivity detoxikačního enzymu glutathion-S-transferázy (GST) ve skupině exponované 10  $\mu\text{g/L}$  GBP. Ve studii provedené Li et. al. (2018) byla u danií pruhovaných (*Danio rerio*) zaznamenána naopak zvýšená aktivita všech výše zmíněných enzymů, z čehož se jako nejcitlivější na působení GBP ukázala CAT. Zároveň byla pro hodnocení toxicity sledována aktivita laktátdehydrogenázy (LDH), u které taktéž došlo k vysoce významnému zvýšení.

Lipoperoxidační poškození tkání bylo prokázáno u skupin vystavených koncentracím 100; 1 000 a 10 000  $\mu\text{g/L}$  GBP a zvýšením hladiny reaktivních látek s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS). Zvýšená koncentrace karbonylových proteinů (CP) ve všech testovaných skupinách svědčí o oxidačním poškozením proteinů po expozici GBP. He et. al. (2019), kteří sledovali mechanismus toxicity GBP u danií pruhovaných v environmentálních koncentracích zjistili, že acetylcholinesteráza, lysozym a hladina C-reaktivního proteinu byly na konci expozice sníženy. Tyto snížené hladiny biomarkerů by tedy mohly signalizovat poruchy nebo oslabení nervového, imunitního a zánětlivého systému, což může mít širší dopady na celkové

zdraví a funkci sledovaného organismu. V rámci oxidačního poškození DNA byla zjištěno významné ( $p \leq 0,05$ ) a vysoce významné ( $p \leq 0,01$ ) snížení hladiny oxidačního derivátu guanosinu (8-OHdG) ve skupinách 100; 1 000 a 10 000  $\mu\text{g/L}$ . V rámci histopatologie nebyly pozorovány žádné změny v porovnání s kontrolní skupinou.

### Závěr

GBP je široce využíván nejen k léčbě epilepsie a neuropatické bolesti, ale také mimo schváleného použití jako terapie bipolární poruchy nebo prevence migrény a syndromu neklidných nohou. Hlavním rizikem nadměrného užívání tohoto léku je jeho nezměněné vylučování do odpadních vod a nedostatečná čistící kapacita čistíren odpadních vod. Přestože je akutní toxicita GBP ve vodním prostředí nízká, bylo prokázáno, že má negativní vliv na necílové vodní organismy. Je tedy klíčové monitorovat jeho dlouhodobé účinky ve vodním prostředí. Ve vědecké literatuře je však dosud málo informací popisujících účinky GBP na vodní organismy. Naše studie poukazuje na potenciální environmentální rizika spojená s nadměrným užíváním GBP v humánní a veterinární praxi. Výsledky našeho experimentu ukazují, že GBP má vliv na délku a hmotnost raných vývojových stádií kapra obecného a zároveň ovlivňuje aktivitu oxidačních enzymů, může vést k poškození proteinů a k lipoperoxidačnímu poškození tkání a tím tak představovat významnou hrozbu pro vodní prostředí a jeho organismy. Pro dosažení udržitelnější budoucnosti a zachování rovnováhy vodních ekosystémů pro další generace je nutné aktivně řešit otázky udržitelných metod likvidace léčiv a kontroly jejich využití.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 219/2023/FVHE.

### Literatura

ABOU-KHALIL, B.W. Update on antiepileptic drugs 2019. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*. 2019, vol. 25, no. 2, s. 508-536.

DI CESARE, F., NEGRO, V., RAVASIO, G., VILLA, R., DRAGHI, S., CAGNARDI, P. (2023) Gabapentin: Clinical Use and Pharmacokinetics in Dogs, Cats, and Horses. *Animals*. 2023, vol. 13, no. 12, 2045.

FERENCIK, M., BLAHOVA, J., SCHOVANKOVA, J., SIROKA, Z., SVOBODOVA, Z., KODES, V., STEPANKOVA, K., LAKDAWALA, P. Residues of Selected Anticonvulsive Drugs in Surface Waters of the Elbe River Basin (Czech Republic). *Water (Basel, Switz.)*. 2022, vol. 14, no. 24, 4122.

HE, Y., LI, X., JIA, D., ZHANG, W., ZHANG, T., YU, Y., XU, Y., ZHANG, Y. (2019) A transcriptomics-based analysis of the toxicity mechanisms of gabapentin to zebrafish embryos at realistic environmental concentrations. *Environmental Pollution*. 2019, vol. 251, s. 746-755.

LI, X., ZHOU, S., QIAN, Y., XU, Z., YU, Y., XU, Y., HE, Y., ZHANG, Y. The assessment of the ecotoxicological effect of gabapentin on early development of zebrafish and its antioxidant system. *The Royal Society of Chemistry Advances*. 2018, vol. 8, no. 40, s. 22777-22784.

**Kontaktní adresa:** Renáta Hesová, Mgr. Bc., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, hesovar@vfu.cz

## Vliv pohlaví na chování kříženců masného skotu na zimovišti

### The influence of sex on the behavior of crossbred beef cattle on the wintering grounds

<sup>1,2</sup>Procházková Hana

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

<sup>2</sup> *Agrovýzkum Rapotín s.r.o.*

#### Summary

The aim of the ethological observations was to find out the differences in the behavior of males and females of young cattle of the same breed on the wintering grounds. For observations, 24 crossbreeds of suckler cows, crossbreeds of the Wagyu, Galloway and Limousine breeds were selected. During the ethological observations, which took place on 2 dates in November 2022, the activities of lying down, feed intake, water intake, movement, social behavior, ruminating while lying down, ruminating while standing up, reproductive and comfort behavior were monitored. Data were recorded from sunrise to nightfall at ten-minute intervals. Differences in the duration of the monitored activities were found between the sexes of all investigated breeds. The longest reported activity for all breeds of both sexes was feed intake. Females spent more time on this activity than males of the same breed. Compared to females, males, on the other hand, showed a longer time spent lying down and showed more frequent manifestations of reproductive and social behavior compared to females of the same breed.

**Keywords:** animal behavior; ethology; cattle

#### Úvod

Welfare zvířat je stav poskytnutí vhodných podmínek chovaným zvířatům tak, aby bylo zajištěno základních životních podmínek, zdraví a ochrany před strádáním jak materiálním, tak psychickým (Doležal *et al.* 2004). Základním prvkem posouzení pohodlí zvířat je pozorování chování zvířat (Kokocińska and Kaleta, 2016). Etologická pozorování zkoumají denní režim zvířat a zjišťují typické prvky chování pro určitý druh či plemeno zvířat (Hauptman *et al.* 1972).

#### Materiál a metody

Vlastní etologické pozorování bylo provedeno ve stáji K108 společnosti VÚCHS Rapotín s.r.o. Pro pokus bylo vybráno 24 kříženců plemen skotu bez tržní produkce mléka, z toho 4 kříženky plemene Wagyu procentuální zastoupení plemene 50–88 % ve věku 10–23 měsíců, 4 kříženky plemene Galloway procentuální zastoupení plemene 97–100 % ve věku 10–15 měsíců, 4 kříženky plemene Limousine procentuální zastoupení plemene 50–75 % ve věku 10–18 měsíců, 4 kříženci plemene Wagyu procentuální zastoupení plemene 75–100 % ve věku 11 měsíců, 4 kříženci plemene Galloway procentuální zastoupení plemene 97–100 % ve věku 13–14 měsíců, 4 kříženci plemene Limousine procentuální zastoupení plemene 50–69 % ve věku 10–14 měsíců. Zvířata byla rozdělena do 2 stejně velkých kotců o rozměrech 15 650 x 9 650 mm, v jednom samice, v druhém samci.

Zvířata byla krmena jednou denně ad-libitní krmnou dávkou složenou z 37 % travní senáže, 59 % kukuřičné siláže a 4 % šrotu s přídatkem minerální směsi. Krmivo bylo během dne přihrnuto. V každém kotci byly 2 automatické nezamrzající napáječky umístěné mezi krmnou chodbou a lehárnou. V každém kotci byl umístěn solný liz. Ustájení bylo prováděno na hluboké podestýlce se slámou s pravidelným vyhrnováním v měsíčních intervalech a přistýláním slámou v jednom až dvou intervalech týdně. Krmná chodba byla vyhrnována třikrát týdně.

Vlastní pokus byl prováděn ve 2 termínech v měsíci listopadu roku 2022. U pozorovaných zvířat byla sledována a zaznamenávána celodenní aktivita. Etologická pozorování byla prováděna vždy od rozednění do soumraku v desetiminutových intervalech (dle Kovalčikové a Kovalčika, 1984). Byly hodnoceny parametry ležení, příjem krmiva, příjem vody, pohyb, sociální chování, přežvykování v leže, přežvykování ve stoje, reprodukční a komfortní chování.

### Výsledky a diskuze

Všichni pozorovaní jedinci trávili nejvíce času příjmem krmiva. Samice trávily touto činností během dne více času než samci stejného plemene. Stejná situace byla i u aktivity příjem vody. Samice plemene Wagyu trávily příjmem krmiva průměrně 61,57 % z fondu času (tedy přibližně 14:46:36) a průměrně 2,47 % z fondu času (tedy přibližně 0:35:34) příjem vody oproti samcům, kteří příjem krmiva trávili 54,34 % z fondu času (přibližně tedy 13:02:30) a průměrně 1,24 % z fondu času (tedy přibližně 0:17:51) příjem vody. Samice plemene Galloway trávily příjmem krmiva průměrně 64,03 % z fondu času (tedy přibližně 15:22:02) a průměrně 2,2 % z fondu času (tedy přibližně 0:31:41) příjem vody oproti samcům, kteří příjem krmiva trávili 50,89 % z fondu času (přibližně tedy 12:12:49) a průměrně 1,35 % z fondu času (tedy přibližně 0:19:26) příjem vody. Samice plemene Limousine trávily příjmem krmiva průměrně 62,17 % z fondu času (tedy přibližně 14:55:15) a průměrně 2,24 % z fondu času (tedy přibližně 0:32:15) příjem vody oproti samcům, kteří příjem krmiva trávili 53,32 % z fondu času (přibližně tedy 12:47:48) a průměrně 1,53 % z fondu času (tedy přibližně 0:22:02) příjem vody.

Samci oproti samicím trávili během dne více času aktivitou ležení a projevy sociálního chování. U samců všech plemen se vyskytovaly projevy reprodukčního chování, zatímco u žádné ze sledovaných samic v pozorovaném období znaky reprodukčního chování zaznamenány nebyly. Samci plemene Wagyu vykazovali průměrně 9,46 % z fondu času stráveného ležením (přibližně tedy 2:16:13), sociální chování vykazovali průměrně 9,15 % z fondu času (přibližně tedy 2:11:46) a reprodukčním chováním se projevovali průměrně 1,98 % z fondu času (přibližně tedy 0:28:31) oproti samicím stejného plemene, které trávily ležením průměrně 5,53 % z fondu času (přibližně tedy 1:19:38) a sociálním chováním průměrně 4,28 % z fondu času (přibližně tedy 1:01:38). Samci plemene Galloway trávili ležením průměrně 9,23 % z fondu času (přibližně tedy 2:12:55), sociální chování vykazovali průměrně 6,69 % z fondu času (přibližně tedy 1:36:20) a reprodukční chování projevovali průměrně 0,23 % z fondu času (přibližně tedy 0:03:19) oproti samicím stejného plemene, které trávily ležením průměrně 6,42 % z fondu času (přibližně tedy 1:32:27) a sociálním chováním průměrně 1,58 % z fondu času (přibližně tedy 00:22:45). Samci plemene Limousine trávili ležením průměrně 4,34 % z fondu času (přibližně tedy 1:02:30), sociálním chováním průměrně 8,95 % z fondu času (přibližně tedy 2:08:53) a projevy reprodukčního chování u nich nebylo zaznamenáno, oproti samicím stejného plemene, které trávily ležením průměrně 3,45 % z fondu času (přibližně tedy 0:49:41) a sociálním chováním průměrně 1,35 % z fondu času (přibližně tedy 0:19:26).

Chování zvířat a denní cyklus skotu na zimovišti je jen zřídka opublikován. Řada autorů se zabývá posuzování chování zvířat a denními zvyklostmi zvířat na pastvě. I zde je možné sledovat rozdíly v chování jak mezi druhy, tak i mezi plemeny, jak ve svých studiích uvádějí například Londoño-Paéz *et al.* (2022) nebo Schanz *et al.* (2022).

### Závěr

Cílem studie bylo zaznamenat rozdíly v chování u samců a samic mladého skotu stejné plemenné příslušnosti ustájené na zimovišti. Během sledování bylo zjištěno, že aktivita

nejvíce zastoupená během dne byla příjem krmiva. Samice touto činností trávily více času než samci stejného plemene. Samci oproti samicím naopak vykazovali během dne větší úseky strávené aktivitou ležení a častěji se u nich vyskytovaly projevy sociálního chování. U samců byly pozorovány prvky reprodukčního chování, které u samic zaznamenány nebyly.

### Poděkování

Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1224.

### Literatura

DOLEŽAL, O.; BÍLEK, M.; DOLEJŠ, J. Zásady welfare a nové standardy EU v chovu skotu. *Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves*. 2004, s.72, ISBN 80-86454-51-7.

HAUPTMAN, J.; ČUMLIVSKI, B.; DUŠEK, J.; HÁJEK, J.; KNAP, J.; KOŠAŘ, K.; KOVALČÍK, K.; MARKOVIČ, P.; PYTLOUN, J. Etologie hospodářských zvířat. *Státní zemědělské nakladatelství Praha*. 1972, s. 294.

KOKOCIŇSKA, A.; KALETA, T. The role of ethology in animal welfare. *Scientific Annals of Polish Society of Animal Production*. 2016, vol. 12, no. 1, s. 49-62.

LONDOÑO-PAÉZ, S. M.; ORJUELA-CHAVES, J. A.; ÁLVAREZ-CARRILLO, F.; SUAREZ-SALAZAR, J. C.; VASQUEZ-GAMBOA, L.; ORTIZ-MENESES, J. F.; CELIS-PARRA, G. A. Ethological behavior of *Bos taurus*, *Bos indicus*, and Caqueteno Creole cattle in three cover systems of *Brachiaria decumbens* paddocks at the Amazon foothills in Colombia. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 2022, vol. 21 (2), s. 148-158.

SCHANZ, L.; HINTZE, S.; HÜBNER, S.; BARTH, K.; WINCKLER, CH. Single- and multi-species groups: A descriptive study of cattle and brouiler behaviour on pasture. *Applied Animal Behaviour Science*. 2022, vol. 257, 105779.

**Kontaktní adresa:** Hana Procházková, MVDr., Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H23441@vfu.cz



# **SEKCE 4**

## **Veřejné a soudní veterinářství a toxikologie**

## Výskyt glyfosátu a jeho hlavního metabolitu AMPA v řece Labi v období let 2009-2019

### The occurrence of glyphosate and its main metabolite AMPA in the Elbe River during the period of 2009-2019

<sup>1</sup>Ekaterina Koriakina,<sup>1</sup>Jana Blahová,<sup>1</sup>Zdeňka Svobodová

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

#### Summary

The monitoring of certain pesticides in the waters of the Czech Republic is carried out by the Czech Hydrometeorological Institute. Between 2009 and 2022, the development of glyphosate and its metabolite AMPA occurrence was monitored at 24 different sampling sites along the Elbe River, providing a comprehensive view of the distribution of these substances in the given area. These sites include a range of locations from smaller settlements to larger cities, allowing for a representative sample of data on river contamination. The monitored locations include Němčice, Debrné, Opatovice, Valy, Obříství, Hořenice, Hradec Králové, Veletov, Nymburk, Schmilka, Verdek, Lysá nad Labem, Děčín, Kolín, Klášterská Lhota, Velké Březno, Střekov, Liběchov, Loubí, Štětí, Litoměřice, Pod Lovosicemi, Jiřice, and Děčín. The highest recorded concentration of glyphosate reached  $790 \mu\text{g L}^{-1}$  in 2015 at the Děčín site. Similarly, the highest concentration of the metabolite AMPA was recorded in 2013 in Liběchov, reaching  $777 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Keywords:** glyphosate; AMPA; aquatic pollution; fungicides

#### Úvod

Pesticidy, používané v zemědělství k ochraně rostlin, představují významné zatížení pro vodní ekosystémy a mohou představovat potenciální riziko pro vodní organismy. Proto je sledování těchto chemických látek v rámci monitoringu kontaminace vodních zdrojů, prováděného Českým hydrometeorologickým ústavem (ČHMÚ) v České republice, zásadním prvkem ochrany životního prostředí. Herbicid glyfosát, zařazený do třídy organofosfátů, působí inhibicí enzymu 5-enolpyruvyl-shikimát-3-fosfát-syntázy, který má klíčovou úlohu v biosyntéze tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu u rostlin (Fiorino et al., 2018). V roce 2022 byl glyfosát jedním z nejčastěji používaných pesticidů v České republice, s celkovým použitým množstvím 476 057,43 kg (ÚKZUZ, 2022). Aminomethylfosfonová kyselina (AMPA) je hlavním produktem degradace glyfosátu nalezeným v rostlinách, vodě a půdě (Stempvoort et al., 2014). Monitorování glyfosátu a AMPA je zásadní, protože tyto chemické látky mohou vykazovat genotoxický účinek, histopatologické poškození a imunotoxické účinky, stejně jako kardiotoxické účinky u necílových organismů (Rodrigues et al., 2019); (Ma et al., 2019); (Gaur et al., 2019).

#### Materiál a metodika

Český hydrometeorologický ústav (ČHMÚ) provádí dlouhodobý monitoring pesticidů ve vodách České republiky. V této studii byla analyzována data z monitoringu glyfosátu a AMPA na 24 různých odběrových místech podél toku řeky Labe, konkrétně v lokalitách Němčice, Debrné, Opatovice, Valy, Obříství, Hořenice, Hradec Králové, Veletov, Nymburk, Schmilka, Verdek, Lysá nad Labem, Děčín, Kolín, Klášterská Lhota, Velké Březno, Střekov, Liběchov, Loubí, Štětí, Litoměřice, Pod Lovosicemi, Jiřice a Děčín. Odběr povrchových vod probíhá průběžně každý měsíc během roku, přičemž vybrané polutanty jsou stanoveny podle schváleného plánu monitoringu pro daný rok. Četnosti stanovení těchto pesticidů na sledovaných lokalitách jsou prezentovány v tabulce číslo 1.

Tabulka 1: Četnost odběrů povrchových vod na sledovaných lokalitách na řece Labi

Lokalita na Labi	Kód lokality	Počet odběrů vzorků na stanovení koncentrace azolů ve vodě
Hořenice	PLA_1001	123
Veletov	PLA_17	123
Kolín pod	PLA_343	123
Debrné	PLA_1042	177
Hradec Králové	PLA_7	177
Nymburk	PLA_47	135
Němčice	PLA_1043	177
Štětí	PLA_32	129
Litoměřice	PLA_33	135
Střekov	PLA_35	129
Liběchov	PLA_31	176
Loubí	PLA_51	177
Jiřice	PLA_29	129
Pod Lovosicemi	PLA_341	135
Lysá nad Labem	PLA_1005	175
Valy	PLA_1004	175
Schmilka – pravý břeh	PLA_246	174
Schmilka – levý břeh	PLA_248	105
Děčín	PLA_242	175
Obříství	PLA_1044	175
Klásterská Lhota	PLA_1	90
Opatovice	PLA_11	84
Velké Březno	PLA_342	131
Verdek	PLA_3	72
Herlíkovice	PLA_101	9
Špindlerův Mlýn – Divčí lávky	PLA_321	12
<b>Celkem odběrů</b>		<b>3422</b>

Statistické hodnocení koncentrací glyfosátu a AMPA bylo provedeno v programu Unistat for Excel 6.5. Pro zjištění rozdílů v datech koncentrací glyfosátu a AMPA na jednotlivých lokalitách byl použit Shapiro-Wilkův test. Normalita dat nebyla prokázána, proto bylo pro porovnání koncentrací glyfosátu a AMPA na lokalitě v průběhu let použito mnohonásobné porovnání (Kruskal-Walis ANOVA). Pro porovnání koncentrace glyfosátu a AMPA na jedné lokalitě v různých letech byl použit Mann-Whitneyho test. Testování bylo provedeno na hladině významnosti 0,01.

### Výsledky a diskuse

Během průběhu sledování polutantů Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ) systematicky monitoroval 24 lokalit podél řeky Labe. Odběr vzorků vody a následné testování na příslušná rezidua pesticidů byly prováděny v souladu s pečlivě stanoveným plánem monitoringu pro každý rok. Ve studii byly zaznamenány nejvyšší průměrné koncentrace glyfosátu a AMPA v letech 2013 a 2015 na lokalitách Děčín, Schmilka, Lysá nad Labem, Loubí a Liběchov. Na těchto místech bylo pozorováno významné snížení koncentrace od roku 2013 až do roku 2019. Nejvyšší koncentrace glyfosátu ve vodě byla zaznamenána v lokalitě

Děčín, dosahující hodnoty 790  $\mu\text{g L}^{-1}$  v červnu 2015. K listopadu 2015 došlo k poklesu koncentrace na 216  $\mu\text{g L}^{-1}$  a tento trend pokračoval až do konce roku 2019, kdy průměrná koncentrace dosáhla 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Nejvyšší koncentrace AMPA, dosahující hodnoty 777  $\mu\text{g L}^{-1}$ , byla zaznamenána v lokalitě Liběchov v dubnu 2013. Zde byla také zjištěna druhá nejvyšší koncentrace glyfosátu v hodnotě 638  $\mu\text{g L}^{-1}$ . V srpnu 2013 došlo ke snížení koncentrace AMPA na 54  $\mu\text{g L}^{-1}$ , avšak do listopadu se koncentrace zvýšila na 83  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na některých lokalitách nebyla prokázána přítomnost sledovaných látek ve vzorcích vod z řeky Labe, zatímco na jiných lokalitách byla zjištěna koncentrace pod mezí detekce. Jednalo se o lokality Střekov, Štětí, Verdek, Opatovice. Na některých lokalitách byla zjištěna koncentrace pod mezí detekce, jednalo se o lokality Herlíkovice, Špindlerův mlýn, Pod Lovosicemi a Hořenice.

### Závěr

Monitoring povrchových vod představuje klíčový nástroj pro posouzení výskytu polutantů ve vodních zdrojích. Koncentrace glyfosátu a AMPA na odběrových místech řeky Labe vykazují proměnlivost a jejich obsah se v průběhu let významně snížil. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány v lokalitách Děčín a Liběchov, přičemž na některých lokalitách došlo k významnému snížení koncentrace těchto látek od roku 2013 až do roku 2019.

### Literatura

FIORINO, E., SEHONOVA, P., PLHALOVA, L. et al. Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, vol. 25, s. 8542–8549. Dostupné z: doi: 10.1007/s11356-017-1141-5

VAN STEMPTVOORT, D.R., ROY, J.W., BROWN, S.J., BICKERTON, G. Residues of the herbicide glyphosate in riparian groundwater in urban catchments. *Chemosphere*. 2014, vol.95, s. 455-463. Dostupné z: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.095

RODRIGUES, L. B., COSTA, G. G., THÁ, E. L., SILVA, L. R., OLIVEIRA, R., LEME, D. M., CESTARI, M. M., GRISOLIA, C. K., VALADARES, M. C., OLIVEIRA, G. A. R. (2019). Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2019, vol. 842, s.94-101. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app11199004>

MA, J., ZHU, J., WANG, W., RUAN, P., RAJESHKUMAR, S., LI, X. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environmental Pollution*. 2019, vol.252, s.1288-1300. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.040>

GAUR, H., BHARGAVA, A. Glyphosate induces toxicity and modulates calcium and NO signaling in zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.2019, vol. 513(4), s.1070-1075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.074>

**Kontaktní adresa:** Koriakina Ekaterina, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22341@vfu.cz

## Xenoestrogenní vliv bisfenolu A a jeho analogu bisfenolu F na koncentraci vitellogeninu u pstruha duhového (*Onchorhynchus mykiss*)

### Effect of bisphenol A and its analogue bisphenol F on vitellogenin in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*)

<sup>1</sup>Vendula Stoklasová, <sup>1</sup>Ekaterina Koriakina, <sup>1</sup>Jana Blahová, <sup>1</sup>Zdeňka Svobodová

<sup>1</sup>Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

#### Summary

Our study aimed to assess the xenoestrogenic effect of bisphenol A and bisphenol F on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by verifying the sex of individuals histologically and determining vitellogenin levels in males. For six weeks, trout were fed diets with two concentrations of bisphenols and a combination of bisphenol A and bisphenol F at a lower concentration. At the end of the experiment, the fish were sacrificed and their reproductive organs were removed for sex confirmation and blood was collected for determination of vitellogenin concentration. It was found that bisphenol F at a concentration of 1000 µg/kg statistically highly significantly increased vitellogenin concentration in males ( $p < 0.01$ ), while the combination of both bisphenols A and F at an environmental concentration of 10 µg/kg also showed a statistically significant increase compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** fish; endocrine disruption; microplastics; BPA; BPF;

#### Úvod

Částice plastů menší než 5mm jsou označovány jako mikroplasty. Ty se snadno dostávají do prostředí, kde mohou mít nežádoucí účinky na necílové organismy, včetně ryb i člověka. (Lim, 2021). Obsahují také látky, které se do plastů přidávají z důvodu zlepšení jejich vlastností. Častými aditivami bývají také bisfenoly, zejména často využívaný bisfenol A (BPA, (2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propan)), který je postupně nahrazován i dalšími ze skupiny bisfenolů, například bisfenolem F (BPF; 4,4'-dihydroxydiphenylmethan), bisfenolem S (bis(4-hydroxyphenyl)sulfon), bisfenolem AF (2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)hexafluoropropan) a dalšími, o jejichž toxicitě je naneštěstí množství informací stále málo podrobné a komplexní. Zlepšují sice průhlednost materiálu, tepelnou odolnost i rezistenci vůči nárazu, avšak dle studií mají také velké množství nežádoucích účinků na člověka i další organismy (Wen et al., 2018, Cantonwine et al., 2010, Lang et al., 2008, Wang et al., 2012). Vitelogenin je klíčovým proteinem v reprodukci u ryb. Koncentrace tohoto v játrech syntetizovaného proteinu vzrůstá pod vlivem estrogenu, především estradiolu. Po syntéze je vitelogenin transportován do vaječnicků, kde slouží jako zásobník živin pro vývoj vajíček a přípravu na tření. U mnoha druhů ryb se hladina vitelogeninu v těle zvyšuje před třením a může sloužit jako indikátor reprodukční aktivity. Analýza hladiny vitelogeninu v těle ryb je klíčová pro posouzení environmentálního dopadu látek s xenoestrogenní aktivitou na reprodukční zdraví ryb a je tedy využíván jako ukazatel endokrinní disrupce. (Mills et al., 2003). Bisfenoly jsou již potvrzené endokrinní disruptory, podle dosavadních studií narušují i mužskou plodnost – dochází ke snížení kvality spermatu, fragmentaci DNA spermií či změně genu pro tvorbu GnRH (gonadotropin releasing hormon) (Mubarak et al., 2022).

#### Materiál a metody

Test byl proveden v souladu s metodikou OECD 215 pro testování chemikálií (Fish, Juvenile Growth Test). Celkem 144 juvenilních pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) bylo zařazeno do experimentu a umístěno do 12 akvárií o objemu 200 litrů. Po čtrnáctidenní

aklimatizaci následoval šestitýdenní experiment. Celý pokus probíhal na Mendelově univerzitě v Brně na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství. Do experimentu bylo zařazeno šest duplicitních skupin: kontrolní skupina, skupiny exponované bisfenolu A v dávkách 10 µg/kg (BPA low) a 1 000 µg/kg (BPA high), skupiny exponované bisfenolu F v dávkách 10 µg/kg (BPF low) a 1 000 µg/kg (BPF high), a skupina, která dostávala kombinaci bisfenolu A a bisfenolu F v koncentracích 10 µg/kg (BPA+BPF low). Rybám bylo podáváno krmivo obsahující bisfenoly třikrát denně. Po 14 dnech bylo provedeno kontrolní vážení a úprava krmné dávky na 1,5 % aktuální hmotnosti. Jednou denně byly monitorovány základní fyzikálně-chemické parametry jako je pH, teplota, obsah kyslíku a koncentrace dusitanů, dusičnanů a amoniaku. Na konci expozice byly všechny ryby usmrceny tupým úderem do hlavy a byl proveden odběr krve z ocasní cévy. Odběr krve byl proveden do Eppendorf zkumavek obsahujících heparin. Po odběru byly heparinizované vzorky krve zpracovány k získání krevní plazmy, která byla následně skladována při -80 °C do doby analýzy. Statistické vyhodnocení získaných dat bylo provedeno v programu Unistat 6.5 for Excel. V první fázi testování bylo provedeno zhodnocení normality dat (Shapiro-Wilkův test) a homogenity rozptylu (Levenův test). Podmínka normality splněna nebyla, proto byl využit neparametrický vícevýběrový mediánový test. Testování bylo provedeno na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

### Výsledky a diskuse

Změny chování ani mortalita nebyly v žádných ze skupin pozorovány. U jedinců, kteří byli histologicky potvrzeni jako samci, byl analyzována koncentrace vitelogeninu. Výsledky obsahu vitelogeninu jsou znázorněny v Tabulce 1. Bylo zjištěno, že bisfenol F při koncentraci 1 000 µg/kg statisticky vysoce významně zvýšil koncentraci vitelogeninu u samců ( $p < 0.01$ ), zatímco kombinace bisfenolů A a F při environmentální koncentraci 10 µg/kg prokázala také statisticky významný nárůst ve srovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0.05$ ). Významné rozdíly ( $p < 0.05$ ) mezi skupinami jsou označeny abecedními horními indexy. Změny ve srovnání s kontrolou jsou doplněny šipkou označující směr regulace.

Tabulka 1: Výsledky koncentrace hladiny vitelogeninu u samců pstruha duhového.

<b>Vitellogen in [ng/ml]</b>	<b>Control</b>	<b>BPA<sub>LOW</sub></b>	<b>BPA<sub>HIGH</sub></b>	<b>BPF<sub>LOW</sub></b>	<b>BPF<sub>HIGH</sub></b>	<b>BPA<sub>LOW</sub> + BPF<sub>LOW</sub></b>
Average	112.6 ±50.1 <sup>a</sup>	146.4 ±83.9 <sup>a</sup>	478.1 ±255.2 <sup>ab</sup>	62.5 ±0.0 <sup>a</sup>	1308.9 ±581.2 <sup>b</sup> ↑	1138.5 ±658.9 <sup>b</sup> ↑
Median	62.5	62.5	62.5	62.5	324.5	223.2
Maximum	363.3	482.0	2490.5	62.5	6975.5	7310.4
Minimum	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5

### Závěr

Z našich zjištění vyplývá, že bisfenol F má schopnost působit jako xenoestrogen na pstruha duhového. Tento účinek je patrný i při kombinaci obou bisfenolů, a to dokonce v běžně se vyskytujících environmentálních koncentracích. Na základě těchto poznatků není nahrazování bisfenolu A jeho analogem F vhodným řešením s ohledem na jeho schopnost narušovat endokrinní systém.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena interním projektem IGA VETUNI – 207/2023/FVHE.

**Literatura**

CANTONWINE, D., MEEKER, J.D., HU, H., SANCHEZ, B.N., LAMADRID-FIGUEROA, H., MERCSDO-GARCÍA, A., FORTENBERRY, G.Z., CALAFAT, A.M., TÉLLEZ-ROJO, M.M. 2010. Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental Health* 9: 62.

LANG, I.A., GALLOWAY, T.S., SCARLETT, A., HENLEY, W.E., DEPLEDGE, M., WALLACE, R.B., MELZER, D., 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama* 300: 1303-10.

LIM, X., 2021. Microplastics are everywhere - but are they harmful?. *Nature* 593: 22-25.

MILLS, L. J.; GUTJAHR-GOBELL, R. E.; HOROWITZ, D. B.; DENSLOW, N. D.; CHOW, M. C. et al. Relationship between reproductive success and male plasma vitellogenin concentrations in cunner, *Tautoglabrus adspersus*. Online. *Environmental Health Perspectives*. 2003, vol. 111, no. 1, s. 93-100. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1289/ehp.5531>.

MUBARAK, M.; OMOLAOYE, T. S.; AL SMADY, M. N.; ZAKI, M. N., DU PLESSIS, S. S. Bisphenol A and Male Infertility: Role of Oxidative Stress. Online. In: ROYCHOUDHURY, Shubhadeep a KESARI, Kavindra Kumar. *Oxidative Stress and Toxicity in Reproductive Biology and Medicine*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, 2022, s. 119-135. ISBN 978-3-031-12965-0. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-031-12966-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-031-12966-7_8).

WANG, F., HUA, J., CHEN, M., XIA, Y., ZHANG, O., ZHAO, R., ZHOU, W., ZHANG, Z., WANG, B. 2012. High urinary bisphenol A concentrations in workers and possible laboratory abnormalities. *Occupational Environmental Medicine* 69: 679-84.

WEN, M., HO, Y.B., TAN, E.S., HOW, V. 2018. Release of bisphenol A from polycarbonate and polyethylene terephthalate drinking water bottles under different storage conditions and its associated health risk. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences* 14: 18-26.

**Kontaktní adresa:** Vendula Stoklasová, MVDr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, [H22344@vfu.cz](mailto:H22344@vfu.cz)

## Vliv tebukonazolu na vývoj kapra obecného (*Cyprinus carpio*)

### Effect of tebuconazole on the development of common carp (*Cyprinus carpio*)

<sup>1</sup>Riesová Barbora, <sup>1</sup>Doubková Veronika, <sup>1</sup>Hesová Renáta, <sup>1</sup>Svobodová Zdeňka, <sup>2</sup>Zicarelli Giorgia, <sup>1</sup>Lakdawala Pavla

<sup>1</sup> Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche, ed Ambientali – Università di Messina, Italia

#### Summary

The aim of this study was to assess the subchronic toxicity of azole fungicide tebuconazole on the early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio*). The test was carried out according to OECD Method 210 with freshly fertilised eggs of *C. carpio*. The eggs were placed in 1 litre crystallization dishes. Tebuconazole was tested at concentrations of 0.05, 0.5, 5, 50 and 500 µg/L. The results indicated increased mortality at the highest concentration tested. At lower concentrations, delayed hatching of exposed individuals was observed compared to the control. The specimen exposed to concentration of 5 µg/l showed higher weight compared to the control. Histology showed several pathological changes on the skin and intestines. The results of the subchronic toxicity test showed that tebuconazole is highly toxic, causing high mortality rates, delayed hatching, increased weight, histopathological tissue changes, and oxidative stress.

**Keywords:** azole pesticides; toxicity; subchronic test

#### Úvod

O zlepšování svých životních podmínek a zajištění dostatku potravy se lidé snažili už od počátku samotné civilizace. Plodiny, které sloužily pro hospodářské účely, byly často napadány škůdci, jež způsobovali ztráty výnosu a hladomory. Tyto události proto přispěly k vývoji pesticidů (Cremllyn, 1985). Triazolové fungicidy jsou jednou z hlavních tříd přípravků na ochranu rostlin a zemědělských plodin, které se široce používají například k ošetření a ochraně kukuřice, ovoce a dalších rostlin. Tyto látky se mohou následně dostat do vodního prostředí, a to například úletem postřiku či spláchnutím ze zemědělské půdy po dešti (Mu et al, 2016). Tyto látky mohou být akutně toxické či vykazovat dlouhodobé nepříznivé účinky na vodní organismy (Perez-Rodriguez et al, 2019). Cílem této studie bylo určit vývojovou a subchronickou toxicitu tebukonazolu pro kapra obecného (*Cyprinus carpio*) pozorováním řady endpointů, jako je mortalita, doba líhnutí, délka těl a hmotnost či přítomnost histopatologických změn a změn indikátorů oxidačního stresu.

#### Materiál a metody

Test subchronické toxicity byl proveden podle metodiky OECD č. 210 s čerstvě oplozenými jikrami kapra obecného (*C. carpio*). Čerstvě oplodněné jikry *C. carpio* byly umístěny do krystalizačních misek o objemu 1L, přičemž v každé misce bylo 100 jiker. Pokus byl proveden ve třech opakováních, to znamená, že každá testovaná skupina byla tvořena 3 miskami (celkem tedy 300 vajíček). Tebukonazol (TEB) byl testován v koncentracích 0,05; 0,5; 5; 50 a 500 µg/l. Kontrolní skupina byla vystavena ředící vodě. Vzhledem k omezené rozpustnosti TEB ve vodě, bylo do testovacích roztoků přidáno rozpouštědlo DMSO v množství nepřesahujícím 0.01 %. Za účelem vyloučení toxického efektu rozpouštědla byla též založena kontrolní skupina s přídatkem DMSO ve stejné koncentraci, jako v experimentálních skupinách. Každých 12 hodin byly testovací roztoky ve všech miskách



vyměněny, aby byla zachována požadovaná koncentrace testované látky. V průběhu testu byla kontrolována kvalita vody (pH, teplota, rozpuštěný kyslík, dusičnany, dusitany, celkový amoniak) a zaznamenána mortalita a líhnutí. Po spotřebování žlutkového váčku byly larvy dvakrát denně krmeny *ad libitum* čerstvě vylíhlou *Artemia salina*. Pokus byl ukončen 31 dní po oplození (dpf). Ryby byly usmrceny předávkováním anestetikem trikain metansulfonátem (MS 222). V naší studii jsme analyzovali několik ukazatelů oxidačního stresu a oxidačního poškození organismu. Byla měřena délka a hmotnost náhodně vybraných deseti jedinců a odebrány vzorky na histopatologické vyšetření a stanovení úrovně oxidačního stresu a oxidačního poškození. Konkrétně byla stanovena aktivita enzymů superoxid dismutázy (SOD), katalázy (CAT), glutathion s-transferázy (GST), glutathion peroxidázy (GPx) a glutathion reductázy (GR) a úroveň oxidačního poškození lipidů za pomoci produktů látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou (metodou TBARS), oxidačního poškození proteinů karbonylované proteiny (CP) a poškození DNA (přes stanovení 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG)).

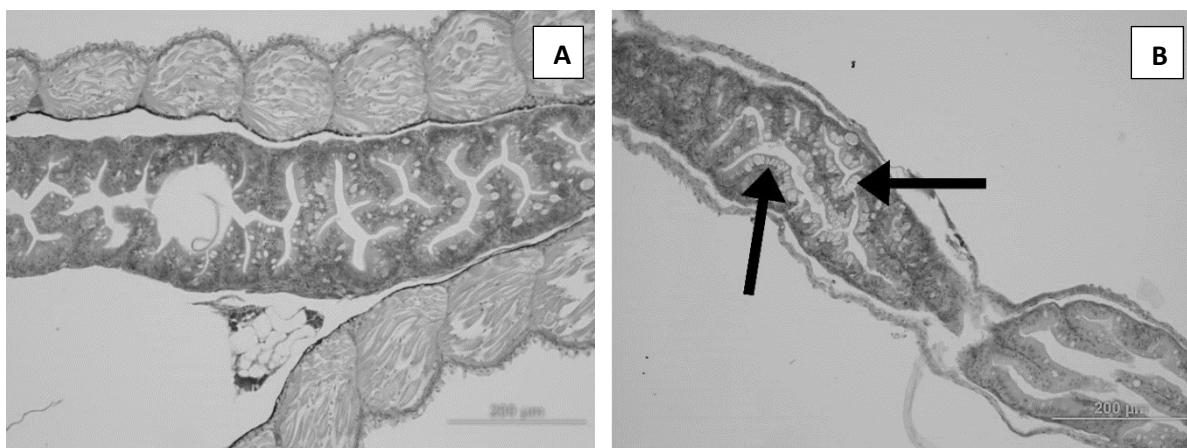
## Výsledky a diskuse

### Mortalita, líhnutí, délka těl a váha

Během experimentu byla zaznamenána vysoká mortalita ve všech testovaných skupinách. Přestože nejnižší koncentrace (0,05  $\mu\text{g/l}$ ) simulující běžnou expozici TEB v environmentálním prostředí nepřinesla statisticky významně vyšší mortalitu ve srovnání s kontrolní skupinou, dosáhla mortalita v této skupině 37 %. V nejvyšší testované koncentraci (500  $\mu\text{g/l}$ ) byla pozorována významně vyšší mortalita 79,33 % ( $p < 0,001$ ) oproti kontrole. Dalším sledovaným efektem byla rychlost líhnutí embryí. Ve dvou nejnižších testovaných koncentracích (0,05 a 0,5  $\mu\text{g/l}$ ) bylo líhnutí opožděné ve srovnání s kontrolními skupinami. U nejvyšší koncentrace 500  $\mu\text{g/l}$  nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v rychlosti líhnutí. Délka těl embryí nebyla ovlivněna TEB v žádné z testovaných skupin, ale koncentrace 5  $\mu\text{g/l}$  vykazovala vyšší průměrnou hmotnost jedinců ve srovnání s kontrolou. Průměrná hmotnost v kontrolní skupině byla 14,51 mg oproti ošetřené skupině s průměrnou hmotností 20,56 mg. Rovněž Vieira et al. (2022) ve své studii nezaznamenali statisticky významné rozdíly v délkách těl *Danio rerio* v koncentracích 0,05; 0,5; 5  $\mu\text{g/l}$  TEB ve srovnání s kontrolou.

### Histopatologie

Histopatologické vyšetření prokázalo několik změn na kůži a ve střevech *C. carpio*. Ve skupině exponované koncentrací 5  $\mu\text{g/l}$  TEB byla pozorována epidermální hypertrofie.



Obrázek 1: Střevo kontrolní skupiny (A) a střevo s četnými hlenovými elementy po expozici 500  $\mu\text{g/l}$  TEB (B)

Dále byla pozorována hyperplazie hlenových buněk ve střevním epitelu, a to v testovaných koncentracích 0,5; 5; 50 a 500 µg/l (Obr. 1). Wang et al. (2022) analyzovali vliv difenokonazolu na srdce kapra obecného, kdy výsledek ukázal, že ve skupině exponované nízké koncentraci (0,488 mg/l) byly buňky myokardu mírně zduřelé a zvýšil se počet zánětlivých buněk. Ve skupině s vysokou koncentrací (1,953 mg/l) byla vlákna myokardu zduřelá a zánětlivých buněk přibývalo.

### Oxidativní stres

Aktivita CAT byla statisticky významně snížena ( $p < 0,001$ ) v koncentracích 0,05; 0,5; 5 a 50 µg/l. Aktivita GR byla snížena v koncentracích 0,05; 5 a 50 µg/l. Aktivita enzymů SOD, GPx a GST nevykazovaly žádný významný statistický rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace karbonylových proteinů (CP) byla statisticky významně zvýšena ( $p < 0,01$ ) u 0,5 µg/l a ( $p < 0,05$ ) u 5 a 50 µg/l. Lipoperoxidace (stanovená metodou TBARS) byla taktéž statisticky významně zvýšena ( $p < 0,05$ ) po expozici 0,05; 0,5 a 5 µg/l TEB. Překvapivě, koncentrace 8-OHdG se u *C. carpio* vystaveného koncentracím 0,5; 5 a 50 µg/l TEB po 31denní expozici snížila. Perez-Rodriguez et al. (2019) ve své studii potvrzují lipoperoxidaci u jedinců *C. carpio* vystavených působení TEB a sníženou enzymatickou a neenzymatickou antioxidační funkci ve všech testovaných koncentracích (0,59; 1,19; 1,78; 2,37 mg/l).

### Závěr

Cílem naší studie bylo posoudit subchronickou toxicitu fungicidu tebukonazolu na raná vývojová stádia *C. carpio* pomocí široké škály letálních a subletálních endpointů. Výsledky testu ukázaly, že tebukonazol má potenciál ovlivnit již v poměrně nízkých koncentracích vývoj organismu, způsobit patologické změny na kůži a střevech a oxidační stres. Tato práce poskytuje informace o posouzení toxicity tebukonazolu na vodní organismy a poukazuje na to, že lidé by měli věnovat více pozornosti nepříznivým účinkům reziduí pesticidů v životním prostředí na necílové organismy.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 219/2023/FVHE.

### Literatura

- CREMLYN, R.J.W. Pesticidy. Reiner SEIFERT (překladatel). Praha: SNTL – nakladatelství technické literatury. 1985, s. 8-117.
- PEREZ-RODRIGUEZ, V., SOUDERS, CH.L., TISCHUK, C., MARTYNIUK, CH.J. Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2019, vol. 217, s. 87-97.
- MU, X., CHAI, T., WANG, K., ZHU, L., HUANG, Y., SHEN, G., LI, Y., LI, X., WANG, CH. The developmental effect of difenoconazole on zebrafish embryos: A mechanism research. *Environmental Pollution*. 2016, vol. 212, s. 18-26.
- VIEIRA, R.S.F., VENÂNCIO, C.A.S., FÉLIX, L.M. Behavioural impairment and oxidative stress by acute exposure of zebrafish to a commercial formulation of tebuconazole. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2022, vol. 91, 103823.
- WANG, Y., CHEN, CH., YANG, G., WANG, X., WANG, Q., WENG, H., ZHANG, Z., QIAN, Y. Combined lethal toxicity, biochemical responses, and gene expression variations induced by tebuconazole, bifenthrin and their mixture in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022, vol. 230, 113116.

**Kontaktní adresa:** Barbora Riesová, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22343@vfu.cz

# **SEKCE 5**

## **Veterinární ekologie a choroby volně žijících zvířat**

## Genomics of multi-resistant *Escherichia coli* circulating in a colony of gulls: Dynamics of colonizing strains displays importance of longitudinal wildlife studies

<sup>1</sup>Růžičková Michaela, <sup>2</sup>Nešporová Kristína, <sup>2</sup>Palkovičová Jana, <sup>1</sup>Krejčí Šimon, <sup>1,2</sup>Literák Ivan, <sup>1,2,3,4</sup>Dolejská Monika

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

<sup>2</sup>CEITEC, University of Veterinary Sciences, Brno

<sup>3</sup>Department of laboratory medicine, University Hospital Brno

<sup>4</sup>Biomedicínské centrum, Charles University, Pilsen

### Summary

Migrating birds play an important role in dispersing resistant bacteria all over the globe. They are in contact with many environments including the anthropogenically influenced ones such as landfills where they can obtain resistant strains while feeding. These strains can then exchange plasmids which have a crucial part in the spread of resistance between bacteria. We analysed the dynamics of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and diffusion of plasmids encoding cephalosporinases in the population of Caspian gulls nesting at the water reservoir Nové Mlýny. During our experiment, five non-flying gull nestlings were placed together into an aviary for 12 weeks. Every two weeks, cloacal swabs were obtained and selective cultivation on media with cefotaxime was performed. Representative resistant isolates were subjected to whole genome sequencing. Data showed changes in the prevalence of particular strains including their transmission between individual birds. At the beginning of the experiment, all the gulls except for one were colonized by a strain of *E. coli* with an *F*-type plasmid carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> gene. During the second sampling, all the gulls already carried an *E. coli* with different plasmid *IncII* with *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, which was originally present only in one bird. At the end of the experiment, the colonization of the birds started to recede but did not disappear completely. This displays that resistant bacteria can persist in birds for a sufficiently long period to be further disseminated.

**Keywords:** *Escherichia coli*; antibiotic resistance; migratory gulls; plasmids; cephalosporins

### Introduction

Antibiotic resistance is a global problem influencing both human and veterinary medicine as well as wild animals and environment. The most common agents of such infections are Gram-negative bacteria including *Escherichia coli* which are often disseminated into the environment from anthropogenic sources. This spread has been recently more associated with wild animals, especially birds, who often drink from water sources possibly contaminated with wastewater which further serves as a source of resistant bacteria [1]. Moreover, gulls are known to feed on landfills, which is why they often carry human pathogens. Due to their migratory nature, they are then capable of transmitting resistant bacteria for long distances and into originally non-contaminated localities [2]. Birds are thus not only victims of ever-growing resistance, but they can also serve as its secondary source for other wildlife. Studies also show that the amount of gull-carried resistant bacteria reflects the antibiotic resistance rate in the environment [3].

### Material and methods

The project characterises and compares bacteria resistant to clinically important antibiotics. The collection is composed of cloacal swabs of Caspian gulls (*Larus cachinnans*) nesting at the water reservoir Nové Mlýny. Swabs were obtained during year 2018. Five non-flying chicks were sampled at their nesting site and then transferred into captivity for 10 weeks where they were held together till the end of the experiment. The sampling was performed

periodically every two weeks. Selective cultivation was conducted on media with cefotaxime and maximum of five colonies were taken from each plate resulting in a collection of 94 resistant isolates. Isolates were subjected to PCR screening for the presence of genes conferring resistance to beta-lactams and fluoroquinolones. Based on these results, representative isolates were sequenced via whole-genome sequencing (Illumina, MinION) to obtain their genomic profiles and complete plasmid sequences. Plasmid identification was done through the PlasmidFinder software and resistance and virulence genes were detected using ResFinder and VirulenceFinder algorithms, respectively. More analysis were conducted regarding the persistence of specific sequence types (STs) and plasmids. Relative fitness measurements were done on Synergy HTX reader in order to compare the fitness between bacterial STs with different dynamics. Experiment on conjugation frequencies of plasmids was performed to compare the conjugation rate of plasmids between various strains. In the end, these same strains were subjected to the testing of colicin production, which is potentially toxic to other bacterial strains, thus reducing competition and serving as an advantageous factor for ST survival [4].

**Results**

Resistant bacteria were found in the gastrointestinal tract of gulls more than two months after removing the potential influence of the environment. The data showed significant changes in the presence of various sequence types over time and their transmission between birds. At the first sampling, three birds were colonized by *E. coli* ST11893 with *bla*<sub>CMY-2</sub> gene. This resistance gene was carried by a conjugative F34:A:-B:- plasmid where it was inserted into *cba* gene associated with colicin production (Fig. 1).

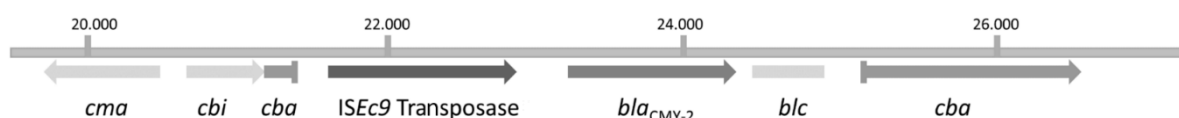


Figure 1. Insertion of *bla*<sub>CMY-2</sub> within *cba* gene on F plasmid in ST11893

Only one gull carried CTX-M-1-producing *E. coli* at the beginning of the experiment. The *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene was carried by a conjugative multi-drug resistance Inc11/ST3 plasmid. In next samplings, the original *E. coli* carrying F type plasmid disappeared and Inc11/ST3 plasmid started to diffuse in various *E. coli* genotypes in all birds with a single ST11138 predominating over time. The carriage of cephalosporin-resistant isolates decreased two months after the beginning of the experiment (Fig. 2).

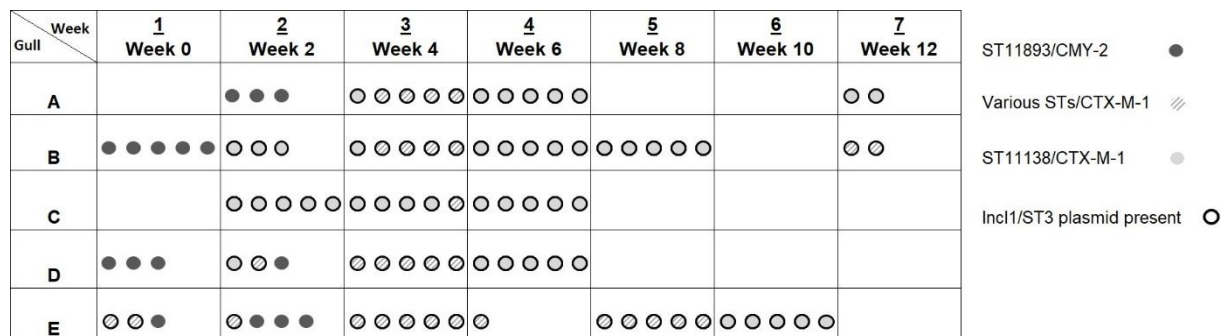


Figure 2. Persistence of sequence types and plasmid dissemination over time. Various STs stand for another six STs which did not form the majority of the sequence types

The differences between sequence types might have been caused by different fitness, plasmid conjugation frequencies or colicin production. After testing for relative fitness and for conjugation rate of different plasmids, these two hypotheses had been rejected. Phenotypical testing of colicin production, however, suggests that this is possibly the reason for the differences in survival of selected ST11138, which seems to produce more colicin types than the rest of the STs.

### Discussion

Our results point out that gulls can carry cephalosporin-resistant bacteria in their gut for over a month which possibly leads to further dissemination of antimicrobial resistance into new environments during their migration routes. We observed the birds also exchanging bacteria among each other resulting in the emergence of new and possibly more successful STs. Both of these findings correspond with results obtained previously during similar studies [5,6]. During such exchange, we can also see the plasmid dissemination between various STs which seems to contribute to the strain survival. The persistence of particular STs is connected to the colicin production which is associated with certain antibiotic resistance plasmids. Resistance gene *bla<sub>CMY-2</sub>* carried by less successful F-type plasmid disrupts the colicin encoding gene while the gene *bla<sub>CTX-M</sub>* carried by the persisting IncI1/ST3 plasmid does not. All these factors led to a creation of successful ST11138 which disseminated over all the gulls and also persisted in their gut up until the end of the experiment.

### Conclusion

Our data show the importance of longitudinal studies, thanks to which we can observe the existing dynamic changes in the gut resistome of gulls over time. Drawing from our results, we can conclude that due to the long-time persistence and shedding of resistant bacteria in their gut, gulls can serve as a secondary source of antibiotic resistance for other individuals, wildlife, and the environment as well. This leads to dissemination of such bacteria all over the world during gulls' migration and to contamination of previously pristine environments.

### Acknowledgement

Study was funded by IGA VETUNI 204/2022/FVHE.

### Literature

- [1] MANGES, AR., et al. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Rev*, 2019; 32: e00135-18.
- [2] PLAZA-RODRÍGUEZ, C., et al. Wildlife as sentinels of antimicrobial resistance in Germany? *Front. Vet. Sci.*, 2021, 7, 1251.
- [3] DOLEJSKA, M., LITERAK, I. Wildlife is overlooked in the epidemiology of medically important antimicrobial resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2019, 63(8), 01167-19.
- [4] MICENKOVA, L., et al. Microcin determinants are associated with B2 phylogroup of human fecal *Escherichia coli* isolates. *MicrobiologyOpen*, 2016, 5(3), 490-498.
- [5] FRANKLIN, AB., et al. Gulls as sources of environmental contamination by colistin-resistant bacteria. *Sci. Rep.*, 2020, 10, 4408.
- [6] SANDEGREN, L., et al. Long-term carriage and rapid transmission of extended spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* within a flock of Mallards in the absence of antibiotic selection. *Environ. Microbiol. Rep.*, 2018, 10(5), 576-582.

**Corresponding author:** Michaela Růžičková, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21274@vfu.cz

## Impact of haemogregarines on differential white blood cell count in tortoises of the genus *Testudo*.

<sup>1</sup>Žaneta Živčicová, <sup>1</sup>Jan Škrábal, <sup>1</sup>Pavel Široký

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife diseases, University of Veterinary Sciences Brno

### Summary

The pathogenicity of blood parasites and their effect on the health status of their ectothermic host is a little explored. In our research, we focused on the impact of parasite *Hemolivia mauritanica* on the differential count of five types of leucocytes (lymphocytes, heterophils, azurophils, eosinophils and basophils). The blood samples originated from two species of tortoises, *Testudo graeca* and *Testudo marginata*. We have analyzed 206 blood smears overall, 25 samples originated from *T. marginata* and 181 originated from *T. graeca*. In these samples, we looked for positive individuals using light microscopy, calculated the differential leukocyte count and parasitemia. To determine whether infection itself has an influence on differential leukocyte count, we statistically evaluated leukocyte representation in infected and uninfected individuals. We also compared the impact of parasites on differential count of leucocytes with other categories, such as species of turtle, intensity of parasitemia, sex and age of the host, month and year of blood collection. Results of Wilcoxon rank-sum tests showed us that in *T. graeca*, parasitemia and age had statistically significant influence on differential counts of leucocytes. In the turtle *T. marginata*, parasitemia had statistically significant influence on differential counts of basophils. After analyzing linear models to determine the effect of parasitemia on differential leukocyte count, we found statistically significant difference in counts of azurophils.

**Key words:** *Hemolivia mauritanica*, *Testudo*, parasitemia, differential leukocyte count, parasites

### Introduction

Major part of reptile species is facing various types of pathogens like different viruses, bacteria, protozoa, helminths and other ectoparasites like leeches and mites (Cavalcante et al. 2024). Our model species of tortoises *Testudo graeca* and *T. marginata*, were infected by the one species of hemogregarine from the genus *Hemolivia*. *Hemolivia mauritanica* is an intracellular apicomplexan parasite with heteroxenous lifecycle, where tortoises from the genus *Testudo* are intermediate hosts and *Hyalomma aegyptium* ticks as their definitive hosts (Široký et al. 2005).

Parasites are a global issue, but relatively few studies have focused on the effects of blood parasites in wild populations of reptiles. The primary focus of research on hemoparasite infections has been to describe the diversity of these parasites, yet their clinical effects remain undetermined (Apache et al. 2023). Assessing the importance of a parasites can pose challenges. While there are reports indicating that elevated parasitemia levels can lead to anemia, the potential influence of these parasites on host physiology remains poorly understood. Hematological and biochemical analyses serve as important tools for assessing the health status of individuals, offering insights into the functionality of inner organs (Apache et al. 2023).

Regardless of other studies on hemoparasites of chelonians, the relationships between health condition of hosts and blood parasite infection rates are not very well studied. The investigations of these relationships are still in early stages compared to parasite-host relationships in endothermic wildlife animals (Cavalcante et al. 2024). The aim of this study

is to determine if the parasitemia of blood parasite infection have impact of differential leucocyte count.

### Materials and methods

Samples used in this study were collected from free-living tortoises of two species: a marginated tortoise (*Testudo marginata*) – 25 samples, and spur-thighed tortoise (*T. graeca*) – 181 samples. Samples originated from four countries: Iran (34 samples), Turkey (58 samples), Greece (25 samples) and Syria (89 samples). Sampling was carried out during years 2004, 2007, 2011 and 2012. Blood from tortoises was collected by puncturing coccygeal dorsal vein using syringes with needles. Part of collected blood was used for blood smears and the rest was stored in 97% ethanol for further molecular analysis.

Blood smears were air dried, fixed in absolute methanol for 10 min, and then stained later in lab. All smears were stained with Giemsa according to Šíroký et al. 2007, and then examined with light microscope Olympus BX53 using 100x magnification lens. The slides were checked for parasites. The intensity of parasitemia in positive blood smears was measured as percentage of infected erythrocytes found in  $10^4$  cells (Šíroký et al. 2007). We counted the differential white blood cell count using immersion oil under 100x magnification lens. It was assessed by counting and identifying of 100 leucocytes in each smear and then recorded as percentage (Eatwell et al. 2014).

To determine whether infection itself has an influence on leukocyte types, we compared the representation of individual leukocytes between infected and uninfected individuals, sexes and juveniles and adults using the Wilcoxon rank-sum tests. For leukocyte percentage, where a statistically significant difference was found between infected and uninfected individuals, we performed linear models in RStudio to determine whether parasitemia influenced the percentage of a given leukocyte type in infected tortoises.

### Results and Discussion

Among the 206 examined samples, 146 were identified as positive for parasites, indicating prevalence of 70,9%. Specifically, *T. graeca* have prevalence 69,1% (125 out of 181 samples positive) and from *T. marginata* there was 21 out of 25 positive (84% prevalence). To compare the percentages of differential leucocyte counts in *T. graeca* and *T. marginata* with infection status, sex and age, we used Wilcoxon rank-sum test (Table 1.). This analysis revealed statistically significant differences within both tortoise species. In *T. marginata*, statistically significant differences were observed only in the percentages of basophils between infected and non-infected samples. We were not able to assess the effect of age in *T. marginata* as we obtained only one sample from a juvenile. Within *T. graeca* samples, differences between adults and juveniles were observed in almost all types of leucocytes, except for azurophils. Furthermore, statistically significant differences in counts of lymphocytes, eosinophils and basophils were observed between infected and non-infected *T. graeca* tortoises. Results of linear models created in RStudio program showed us correlation between parasitemia and differential count of azurophils in *T. graeca*. These findings can emphasize the intricate interplay between parasitic infection and the leukocyte profile within tortoise populations.

### Conclusion

The differential counts of individual types of leukocytes are relatively stable regardless of the intensity of parasitemia. Meaning that blood cells are of little use as a proxy for inferring the



health status of the studied species. This observation may suggest that over a long period of co-evolution, a dynamic relationship has developed between these parasites and their hosts, wherein tortoises have evolved mechanisms to tolerate the parasites without being affected in any way. Thus, our conclusion is that *Hemolivia* is not very pathogenic to its tortoise hosts.

Table 1. Results of Wilcoxon rank-sum tests. Numbers of individuals are presented in brackets. Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Statistically significant variables are in bold.

Species	Variable	Status				Sex				Age			
		Noninf.	Inf.	W	p	Female	Male	W	p	Juvenile	Adult	W	p
<i>T. graeca</i> (181)		(56)	(125)			(90)	(74)			(19)	(162)		
	Ly %	70 $\pm$ 16.6	64.5 $\pm$ 17.3	4238	<b>0.02</b>	65.2 $\pm$ 17.9	64.6 $\pm$ 17.2	3389	0.85	77.4 $\pm$ 7.5	64.8 $\pm$ 17.6	852	<b>0.00</b>
	He %	15 $\pm$ 15.6	16.8 $\pm$ 12.9	2978	0.11	15.3 $\pm$ 11.9	19.1 $\pm$ 16.4	2936	0.19	8.7 $\pm$ 6.0	17.1 $\pm$ 14.2	2144	<b>0.00</b>
	Eo %	5.1 $\pm$ 5.0	5.6 $\pm$ 4.4	4187	<b>0.03</b>	5.2 $\pm$ 4.2	6.0 $\pm$ 5.2	3796	0.12	4.8 $\pm$ 3.4	5.5 $\pm$ 4.7	945	<b>0.00</b>
	Ba %	5.9 $\pm$ 8.0	10.2 $\pm$ 10.5	2388	<b>0.00</b>	11.0 $\pm$ 11.6	7.5 $\pm$ 8.1	3835	0.10	3.7 $\pm$ 2.7	9.5 $\pm$ 10.3	2110	<b>0.01</b>
Az %	4.0 $\pm$ 3.3	2.9 $\pm$ 2.6	3128	0.25	3.3 $\pm$ 2.6	2.7 $\pm$ 2.6	3090	0.43	5.2 $\pm$ 4.1	3.0 $\pm$ 2.6	1619	0.71	
<i>T. marginata</i> (25)		(4)	(19)			(8)	(15)						
	Ly %	57.3 $\pm$ 17.2	64.2 $\pm$ 12.0	27.0	0.39	66.3 $\pm$ 14.2	61.3 $\pm$ 12.3	70.0	0.53	-	-	-	-
	He %	29.5 $\pm$ 16.5	25.1 $\pm$ 11.5	45.5	0.57	22.8 $\pm$ 11.6	27.5 $\pm$ 12.5	46.5	0.40	-	-	-	-
	Eo %	7.0 $\pm$ 5.8	7.5 $\pm$ 5.3	37.0	0.96	6.6 $\pm$ 6.4	7.8 $\pm$ 4.7	50.0	0.53	-	-	-	-
	Ba %	3.8 $\pm$ 3.3	0.5 $\pm$ 1.0	62.0	<b>0.03</b>	1.4 $\pm$ 2.8	0.9 $\pm$ 1.5	60.0	0.91	-	-	-	-
Az %	2.5 $\pm$ 2.1	2.4 $\pm$ 1.8	40.0	0.22	3.0 $\pm$ 1.2	2.1 $\pm$ 2.1	79.0	0.92	-	-	-	-	

### Acknowledgement

This research was supported by the University of Veterinary Sciences Brno (IGA VETUNI: 218/2023/FVHE).

### References:

- APACHE, J.; RODRÍGUEZ-ALMONACID, C. C.; MORENO-TORRES, C. A.; GAMBOEA-SUÁREZ, B. A.; MATTA, N. E. Hemoparasite occurrence and hematological/serum chemistry variations in Podocnemis Vogli Turtles: A comparative analysis between wild-residing infected specimens and captive non-infected counterparts. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2023, vol. 45, 100928. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100928>
- CAVALCANTE M.C.; CHAGAS-DE-SOUZA D.; COELHO T. A.; VIANA L. A.; ADRIANO E.; CORRÊA L. L. Hemoparasite Analysis and Hematological Parameters of Four Freshwater Turtle Species (Testudines: Podocnemididae) from the Brazilian Amazon. *Acta Parasitology*. 2024 Mar 2. doi: 10.1007/s11686-024-00816-z.
- EATWELL K.; HEDLEY J.; BARRON R. Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*. 2014, 36: 34-42. <https://doi.org/10.1136/inp.f7488>
- ŠIROKÝ P.; KAMLER M.; MODRÝ D. Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the genus testudo in the east Mediterranean Region. *Folia Parasitologica*, (2005). 52(4), 359–361. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.049>
- ŠIROKÝ P.; KAMLER M.; FRYE F. L.; FICTUM P.; MODRÝ D. Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. *Folia Parasitologica*. 2007, 54, 13–18.

**Contact address:** Živčicová Žaneta, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, H21278@vfu.cz

## Health issues in farmed African catfish

<sup>1</sup>Ivona Toulová, <sup>1,2</sup>Ivana Mikulíková, <sup>1,2</sup>Ivana Papežíková, <sup>1,2</sup>Hana Novotná <sup>1,2</sup>Hana Band'ouchová, <sup>1,2</sup>Miroslava Palíková

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

<sup>2</sup>Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno

### Summary:

*African catfish (Clarias gariepinus) is an important species as an aquaculture commodity in Africa and Southeast Asia. Currently, the popularity of African catfish breeding is increasing also in Europe thanks to its rapid growth, undemanding breeding, and boneless meat. In fish farms with high stocking densities, there is an increased risk of disease outbreaks. African catfish diseases are mainly caused by the bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*, which are both pathogens detected also in our waters. Parasites of skin and gills, such as those from the class Monogenea, are common as well. In order to reduce potential threats in the breeding facilities, it is necessary to reveal initially which are the most important health issues within the Central European farms raising the African catfish and clarify the pathological processes of the diseases in this fish species. In our project, we took samples of African catfish from three farms (two from the Czech Republic and one from Slovakia) and performed parasitological and microbiological examinations.*

**Keywords:** *Clarias gariepinus; health issues; RAS*

### Introduction

African catfish (*Clarias gariepinus*) is an important species as an aquaculture commodity in Africa and Southeast Asia (Dauda et al. 2018; Rohmana et al. 2015; Wachirachaikarn et al. 2009). In fish farms with high stocking densities, there is an increased risk of disease outbreaks. African catfish diseases are mainly caused by the bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* (Butar-Butar et al. 2020; Sellegounder et al. 2018; Wamala et al. 2018). Parasites found in African catfish are monogeneans, e.g. *Gyrodactylus* spp (Mohamed et al., 2010; Oscar et al. 2015). Bacterial infections in African catfish can cause various pathological changes such as dermal ulceration and lesions, fin and skin haemorrhages, septicaemia, ascites, deep ulcers with underlying muscles exposed, kidney enlargement and pale liver (Lath and Najiah 2015).

### Materials and methods

The African catfish were sampled in two farms in the Czech Republic and one in Slovakia. All three farms use recirculating aquaculture systems (RAS). Farm A is a huge indoor RAS, this farm has its own hatchery. Farm B is a small indoor RAS without own hatchery. Farm C is a new farm, they breed catfish in a RAS without a hatchery. A pathological-anatomical dissection and bacteriological cultivation of the head kidney and gills were performed. Organs (gills, liver, kidneys, and spleen) were collected for histological examination.

Table 1: Dates, numbers (n) and weight range of sampled fish

	Sampling/Date	n	Weight range of fish
<b>Farm A</b>	February 1, 2022	9	60 – 250 g (juveniles)
		8	850 – 1 200 g (adults)
<b>Farm B</b>	June 24, 2022	10	820 – 1 200 g
<b>Farm C</b>	April 27, 2022	22	520 – 1 400 g



Figure 1: Adhesions of organs and fluid in the body cavity (on the left). Skin lesion exposing muscles and head kidney (on the right).

## Results and discussion

### Farm A

A high concentration of *Aeromonas hydrophila* was detected in one sample of head kidney and a high concentration of *Aeromonas veronii* was detected in another one. No bacteria were revealed in other samples. Necropsy showed enlarged head kidneys in 8 fish, skin haemorrhages, skin lesions and fluid in the body cavity of 7 fish. Fluid, decomposing organs and adhesions between them were found in the body cavity of one fish (Figure 1). Monogenea of the genus *Quadricanthus* sp. were revealed on the gills in the range of 34 to 396 pcs in the entire scraping from two gill arches.

### Farm B

No bacteria were cultivated from the kidneys, while a mixture of common microflora (*Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, *Shewanella putrefaciens*, *Shewanella profunda*, *Citrobacter freundii*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Proteus* sp.) was isolated from the gills. No pathological changes were discovered by necropsy.

### Farm C

Bacteriological examination were similar to Farm B, i.e. no bacteria detected in the head kidney and a mixture of common microflora revealed on the gills (*Acinetobacter junii*, *Arthrobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Flavobacterium hibernum*, *Flavobacterium flevense*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *Sphingomonas* sp.). Necropsy showed marbling of the liver in three fish. There was a hematoma in the liver of one fish and a nodular structure of the head kidney of another fish.

## Conclusion

The worst health status of examined African catfish was found in farm A, where the necropsy revealed serious pathology. The presence of *A. hydrophila* and *A. veronii* in the head kidney was identified microbiologically and species specific monogenea on the gills were revealed parasitologically.

## Literature

BUTAR-BUTAR, O. D.; SURYANTO, D.; ILYAS, S. Detection of *Edwardsiella tarda* infection of catfish (*Clarias gariepinus*) in Central Tapanuli Regency, North Sumatra, Indonesia. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 2020, 13.1: 6-13.

- DAUDA, A. B., NATRAH, I., KARIM, M., KAMARUDIN, M. S., BICHI, A. U. H. African catfish aquaculture in Malaysia and Nigeria: Status, trends and prospects. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2018, 9.1: 1-5.
- LAITH, A. R., NAJIAH, M. *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), (2014): 215.
- MOHAMED, A.M., ISMAIEL, M.M., KENAWY, A.M., ABD, E. Impact of experimental infection with *Gyrodactylus* species on the density of skin mucus in fries of catfish (*Clarias gariepinus*) with emphasis on the pathological changes. *Global Veterinaria*, 2010, 4: 67-73.
- OSCAR, E. V., EDET T. A., EKANEM A. P. Monogenean parasites of the African catfish *Clarias gariepinus* from two fish farms in Calabar, Cross River State, Nigeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2015, 3.6: 433-437.
- ROHMANA, D., SURAWIDJAJA, E. H., SUKENDA, S., EKASARI, J. Water quality and production performance of catfish–prawn co-culture with organic carbon source addition. *Aquaculture international*, 2015, 23: 267-276.
- SELLEGOUNDER, D., GUPTA, Y. R., MURUGANANTHKUMAR, R., SENTHILKUMARAN, B. Enterotoxic effects of *Aeromonas hydrophila* infection in the catfish, *Clarias gariepinus*: Biochemical, histological and proteome analyses. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2018, 204: 1-10.
- WACHIRACHAIKARN, A., RUNGSIN, W., SRISAPOOME, P., NA-NAKORN, U. Crossing of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), strains based on strain selection using genetic diversity data. *Aquaculture*, 2009, 290.1-2: 53-60.
- WAMALA, S. P., MUGIMBA, K. K., MUTOLOKI, S., EVENSEN, Ø., MDEGELA, R., BYARUGABA, D. K., SØRUM, H. Occurrence and antibiotic susceptibility of fish bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) and *Clarias gariepinus* (African catfish) in Uganda. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 2018, 21.1: 1-10.

**Contact address:** Ivona Toulová Mgr., Department of Ecology & Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21277@vfu.cz

## Microscopic examination genus *Dactylosoma* in *Pelophylax esculentus* complex from Slovakia

Pavla Bondarenko<sup>1</sup>, Peter Mikulíček<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava

### Summary

Genus *Dactylosoma* is a intracellular hemoparasites of the phylum Apicomplexa described by Labbé in 1894, which undergoes schizogony without producing pigment in red blood cells of amphibians and fish. The genus *Dactylosoma* has only five recognized species in anurans. Only one of these species – *Dactylosoma ranarum* – was found parasitising European anurans. *Dactylosoma ranarum* (Kruse, 1890) was the first described species of the genus.

**Keywords:** *Dactylosoma*; Amphibia; *Pelophylax*

### Introduction

Members of the genus *Dactylosoma* have been recorded only from organisms tied to water – fish or amphibian hosts (Netherlands et al. 2020). In anurans, the genus *Dactylosoma* has only five recognized species *Dactylosoma ranarum* (Kruse, 1890), in *Pelophylax kl. esculentus* (Linnaeus, 1758), *Dactylosoma sylvatica* described in *Rana sylvatica* (LeConte, 1825) of Quebec, Canada; *Dactylosoma taiwanensis* (Manwell, 1964) described in *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) of Taiwan; *Dactylosoma kermi* Netherlands, Cook and Smit, 2020, described in *Ptychadena anchietae* (Bocage, 1868) and *Sclerophrys gutturalis* Power, 1927, from South Africa and in Brazil, *Dactylosoma piperis* Úngari, Netherlands, Silva & O'Dwyer, 2020 described in *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768). Only one of these species – *D. ranarum* – was found parasitising European anurans namely *Pelophylax kl. esculentus* in Slovakia and on Corsica, *P. lessonae* in Slovakia, and *P. ridibundus* in Albania, Hungary, Slovakia, and Russia.

Genus *Dactylosoma* is characterised by two morphologically distinct merogonic cycles in the erythrocytes of the vertebrate host. During primary merogony, a large multinucleate meront produces up to 16 merozoites by simultaneous peripheral budding. The budding occurs along one side of the meront in a characteristic hand-like appearance for which the genus was named. The merozoites then separate, invade other erythrocytes and either repeat primary merogony or initiate secondary merogony. In secondary merogony, significantly smaller meronts produce up to eight merozoites that either repeat this part of the cycle or mature into gamonts (Barta 1991; Netherlands et al. 2020).

The *Pelophylax esculentus* complex refers to a group of hybridizing frogs that includes the *Pelophylax esculentus* and its parental species, *P. lessonae* and *P. ridibundus*. These three species can interbreed and produce viable offspring, leading to a complex network of hybrid populations throughout most of Europe (Berger, 1973).

### Material and Methods

In the current study, a total of anurans, comprising 3 species, were collected from Slovakia, and their blood screened for the presence of genus *Dactylosoma*. The frogs were collected between 2013 and 2017 years. Altogether 364 samples of water frogs of the genus *Pelophylax*

were sampled belonging to three taxa *P. lessonae* – 31, *P. ridibundus* - 144 and *P. esculentus* – 189.

Blood collection was performed from the *vena facialis*. Air-dried blood smears were fixed with absolute methanol and stained with Giemsa stain. Smears were examined and photographed using an Olympus BX53 light microscope. Then the parasitemia was estimated as the number of parasites on  $10^4$  cells, for intracellular parasites.

### Results and Discussion

*Dactylosoma ranarum* was found in *P. lessonae* (6/31, 19.35 %), in *P. ridibundus* 8.33 % (12/144) and *P. esculentus* 8.99 % (17/189). Genus *Dactylosoma* have generally been found at low prevalences within their vertebrate hosts. The highest recorded prevalence is 63.6 % in *P. esculentus* on the island of Corsica (Barta. 1989).

Detected parasitaemia was 0.05 % in *P. lessonae*, 0.87 % in *P. ridibundus* and 1.05 % *P. esculentus*. Parasitaemia of representatives of genera such as *Dactylosoma* maybe maintained or even potentially increase within the host without re infection (Netherlands et al. 2020).

### Conclusion

The results provide an overview of the low prevalence of *Dactylosoma ranarum* in *Pelophylax esculentus* complex from Slovakia

### References

- BARTA J. R. The Dactylosomatidae. *Advances in Parasitology*. 1991, vol. 30 p. 1–37
- BARTA J. R., BOULARD Y. and DESSER S.S. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1989, vol. 108 p. 6–20.
- BARTA J. R., BOULARD Y. and DESSER S.S. Ultrastructural Observations on Secondary Merogony and Gametogony of *Dactylosoma ranarum* Labbé. *The Journal of Parasitology*. 1894, vol. 73 p. 1019-1029
- BERGER L. Systematics and Hybridization in European Green Frogs of *Rana esculenta* Complex. *Journal of Herpetology*. 1973, vol. 7 p. 1-10
- NETHERLANDS E.C., COOK C.A., KRUGER D.J.D. Biodiversity of frog haemoparasites from subtropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *Parasites and Wildlife*. 2015, vol. 4 p. 135–14
- NETHERLANDS E.C., COOK C.A., DU PREEZ L.H., VANHOVE M.P.M., BRENDONCK L. and SMIT N.J. An overview of the Dactylosomatidae (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae), with the description of *Dactylosoma kermiti* n. sp. parasitising *Ptychadena anchietae* and *Sclerophrys gutturalis* from South Africa. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2020, vol. 11 p. 246– 260.
- NÖLLER W. (1913). Die Blutprotozoen des Wasserfrosches und ihre Übertragung. *Archiv für Protistenkunde*. 1913, vol. 31 p. 169–240.

**Contact address:** Pavla Bondarenko, Ing., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, H21272@vfu.cz

## Antibiotic resistant *Citrobacter* spp. in wastewater and surface water

Jarmila Lausova<sup>1</sup>, Iva Sukkar<sup>2,3</sup>, Lenka Davidova Gerzova<sup>3</sup>, Monika Dolejska<sup>1,2,3,4</sup>

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

<sup>2</sup>Central European Institute of Technology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Biomedical Centre, Faculty of Medicine, Charles University, Pilsen, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Clinical Microbiology and Immunology, Institute of Laboratory Medicine, The University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

### Summary

*Citrobacter* spp. is a common environmental bacterium and opportunistic pathogen in humans and animals, whose diversity and antimicrobial potential is largely understudied. Wastewaters represents one of the main hotspots for spread of antibiotic resistant bacteria. The aim of these study was to characterize antibiotic resistant *Citrobacter* spp. in wastewater, treated water and receiving river using whole genome sequencing (WGS). Five types of treated and untreated water were sampled in three cities in Czechia. A total of 75 *Citrobacter* spp. were selected for whole-genome sequencing based on PCR screening of beta-lactamase genes. Seven different species with the most prevalent *C. freundii* and 58 sequence types (ST) including 17 new STs were detected. In total, 104 variants of antibiotic resistance genes were identified. Sixteen isolates, even from the treated water, carried plasmid-encoded carbapenemase genes *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>NDM-4</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-4</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub>. The presence of carbapenem-resistant *Citrobacter* spp. in WWTP effluent poses a risk to the environment and emphasizes the importance of environmental surveillance.

**Keywords:** *Citrobacter freundii*; wastewater treatment plant; whole genome sequencing; carbapenemase genes; plasmids

### Introduction

Antimicrobial resistance is a growing global issue impacting health of humans, animals and the quality of the environment. Gram-negative bacteria are considered to be an important sources of clinically relevant antibiotic resistance genes and the genus *Citrobacter* can represent one of these reservoirs<sup>1</sup>. *Citrobacter* spp. is facultatively anaerobic bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. It occurs naturally in the environment, often found in water, soil or food and is also a commensal in the gut of animals and humans. As a pathogen is mainly associated with diarrheal diseases, but can causes urinary or respiratory infections, meningitis or other neurological infections. Treatment of these infections is challenging because *Citrobacter* spp. is naturally resistant to most penicillins, first-generation cephalosporins and beta-lactamase inhibitors. Furthermore, they are a frequent carrier of plasmid-encoded AmpC or broad-spectrum beta-lactamase, and increasingly, carbapenem-resistant *Citrobacter* are also emerging. The occurrence of multidrug-resistant strains is associated with higher rates of in-hospital mortality<sup>1,2</sup>. Wastewater treatment plants (WWTPs) are not sufficient in removing resistant bacteria, antibiotic residues and resistance genes. Conditions inside WWTPs provide an ideal environment for horizontal transfer of resistance genes across different bacterial species<sup>3</sup>. Treated water is usually released into surface waters, where transmission of resistant bacteria to wildlife and the environment can occur<sup>4</sup>.

### Material and Methods

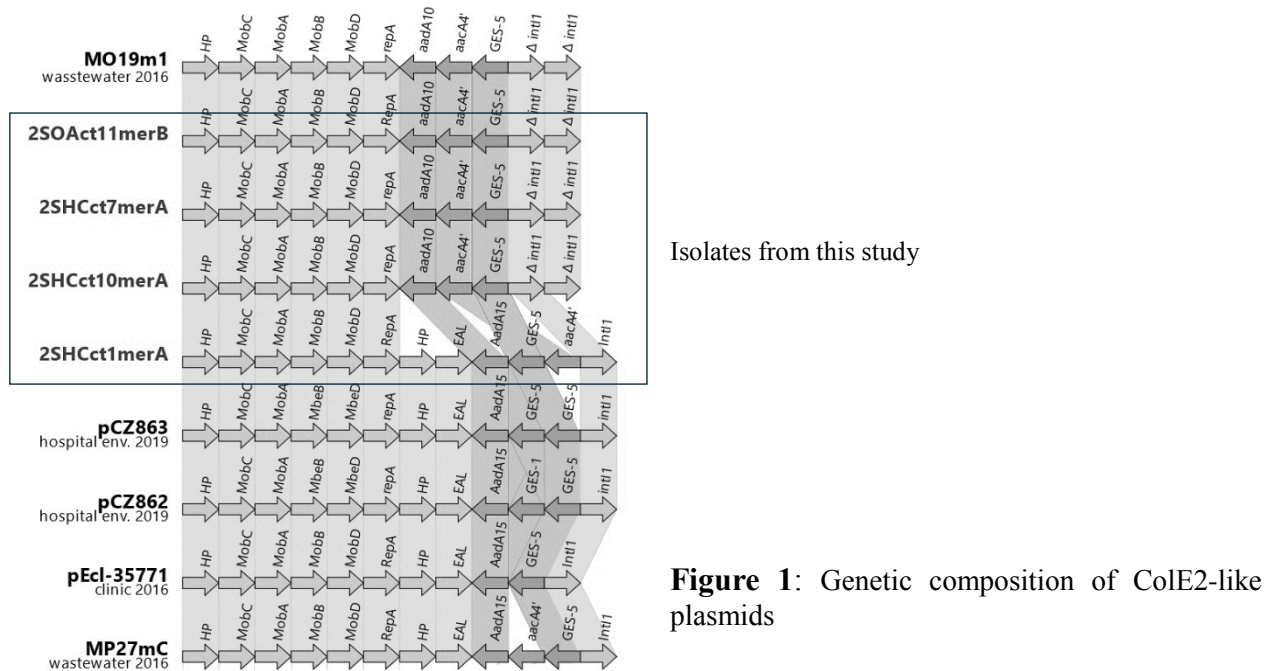
Water sampling was carried out in three cities in the Czech Republic in spring 2021. Five different types of water were sampled including raw hospital sewage, inflow, and outflow from municipal WWTP, river upstream and downstream municipal WWTP. Water samples were collected in sterile glass bottles, kept on 4°C during transport to laboratory and

immediately processed. Concentrated water samples were cultivated on selective agar for *Enterobacteriaceae* supplemented with cefotaxime (2mg/l) or meropenem (0.125mg/l) to obtain presumptively resistant colonies. Isolates identified by MALDI-TOF mass spectrometry as the genus *Citrobacter*, were subjected to PCR screening for selected beta-lactamase genes (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMI</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>). Using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) the clonality of the isolates was determined and selection for WGS was made. Minimal inhibitory concentration (MIC) to 24 antimicrobials was determined using commercial sets (Erba Lachema) and production of beta-lactamases or carbapenemases was tested by AmpC, ESβL & Carbapenemase Set (Mast). Selected isolates were subjected to WGS using NextSeq platform (Illumina) to analyze their genetic content. The obtained sequences were assembled using the SPAdes program. For species identification *in silico* DNA-DNA hybridization was used, with tools 16s Based ID (<https://www.ezbiocloud.net>), Genome to Genome Distance Server (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>), Type Strain Genome Server (<https://tygs.dsmz.de/>) and Average Nucleotide Identity (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/g>). To identify sequence types (ST), resistance genes, plasmid replicons and virulence factors, web-based tools MLST, ResFinder, PlasmidFinder and VirulenceFinder were used (<https://www.genomicepidemiology.org>). To obtain whole sequences of plasmids carrying carbapenemase genes MinION (Oxford Nanopore Technology) was used.

## Results

A total of 154 *Citrobacter* spp. were collected from five water types and three locations, from which 75 isolates were selected for WGS based on PCR and PFGE. The strains originated from hospital sewage (n=28), inflow (n=23) and outflow (n=14) of the mWWTP and river upstream (n=5) and downstream (n=5) the mWWTP. Seven species of *Citrobacter* were detected: *C. freundii* (n=42), *C. portucalensis* (n=14), *C. braakii* (n=11), *C. youngae* (n=3), *C. gilenii* (n=2), *C. pasteurii* (n=1) and *C. europaeus* (n=1). Isolates were assigned to 58 different STs, of which 17 were new. Testing of MIC showed that 54% of isolates exhibit multidrug resistant profile. All isolates were resistant to beta-lactams, due to selective cultivation, moreover 56% of them were AmpC beta-lactamase producers. This resistance was encoded mostly by *bla*<sub>CMY</sub> genes, of which 25 different variants were identified. Resistance to carbapenems showed 46% of isolates, encoded by five genes *bla*<sub>GES-5</sub> (n=10), *bla*<sub>NDM-4</sub> (n=2), *bla*<sub>VIM-1</sub> (n=2), *bla*<sub>VIM-4</sub> (n=1) and *bla*<sub>OXA-48</sub> (n=1). These genes were present also in isolates originating from treated water. High level of resistance to quinolones was observed (56%), encoded mostly by 15 variants of *qnrB* gene. Although based on MIC values resistance to colistin was not detected, one isolate carried the *mcr-10* gene for transferable colistin resistance. Using long-read sequencing, genomic analysis of plasmids carrying the carbapenem resistance gene was performed and revealed that carbapenemase genes *bla*<sub>GES-5</sub> were localized on either IncQ2 or Cole2-like plasmid. Carbapenemase NDM-4 was associated with IncX3, VIM-4 with IncN3 and OXA-48 with IncL plasmid. The gene *bla*<sub>GES-5</sub> on Cole2-like plasmid was localized inside class 1 integron carrying *aacA4'*, *aadA15* or *aadA10* gene cassettes (Figure 1). Comparison with *bla*<sub>GES-5</sub>-harbouring plasmids from previous years from the Czech Republic showed high similarity which indicates the persistence of these plasmids in the environment.





Isolates from this study

**Figure 1:** Genetic composition of ColeE2-like plasmids

## Discussion

The aquatic environment provides a suitable environment for interaction of different bacteria species, where transfer of resistance genes can occur<sup>1</sup>. In this study, 75 isolates of seven *Citrobacter* species obtained from five type of wastewater and river water were described. High level of resistance was confirmed in most isolates and gene *bla*<sub>CMY</sub> was detected in almost all isolates as described in previous studies<sup>1</sup>. Of concern is detection of isolates carrying plasmid mediated carbapenem resistance in treated water, that is released into surface waters. In addition, when comparing the plasmids with previous studies, it was found that they can persist in the environment for years.

## Conclusion

The presence of carbapenem-resistant *Citrobacter* spp. was confirmed also in the treated water from WWTP flowing directly into the river. In addition, carbapenem resistance-encoding genes were present on plasmids, allowing their further spread into the environment. This study confirms the importance of monitoring antibiotic resistant bacteria and genes in wastewater and treated water.

## References

- 1 HEM S. et al. Genomic analysis of *Citrobacter* from Australian wastewater and silver gulls reveals novel sequence types carrying critically important antibiotic resistance genes. *Science of Total Environment*. 2024, 909, 168608
- 2 LIU L. et al. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Citrobacter* spp. causing extraintestinal infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, 11, 737636.
- 3 WU T. et al. Genomic insight into transmission mechanisms of carbapenem-producing *Citrobacter* spp. isolates between the WWTP and connecting rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023, 262, 115150.
- 4 GAMBINO D. et al. Study on bacteria isolates and antimicrobial resistance in wildlife in Sicily, Southern Italy. *Microorganisms*. 2021, 9, 203

## Contact

Jarmila Laušová, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE, VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21273@vf.u.cz

## Dynamické změny v plazmidomu a rezistomu v gastrointestinálním traktu kuřat

### Dynamic changes in the plasmidome and resistome in the gastrointestinal tract of chickens

<sup>1,2</sup>Marketa Rysava, <sup>2,3</sup>Jana Palkovicova, <sup>4</sup>Darina Cejkova, <sup>5</sup>Derya Aytan-Aktug, <sup>5</sup>Saria Otani, <sup>1,2,3,6</sup>Monika Dolejska

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

<sup>2</sup> Biomedicínské centrum, Karlova univerzita, Plzeň

<sup>3</sup> CEITEC, Veterinární univerzita, Brno

<sup>4</sup> Ústav biomedicínského inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Brno

<sup>5</sup> Research group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark

<sup>6</sup> Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Brno

#### Summary

*Plasmids are major players in the transmission of antibiotic resistance. Our study focused on changes in the plasmidome and resistome over time from chicken feces. We obtained samples from 3 separate chicken farms. In two of the chicken houses, the chickens were healthy and had young parents. However, in the third house, there was a higher mortality of chickens that had older parents and were treated with antibiotics, specifically enrofloxacin and metronidazole. Four samples were collected from each house at one-week intervals. Plasmid DNA was recovered from 7 samples and these samples were further sequenced using P2Solo. Various antibiotic resistance genes and mobile genetic elements were found on the plasmids. Differences in resistance genes were observed over time and between poultry houses. Administered antibiotics, enrofloxacin and metronidazole, did not correlate with the highest abundance of resistance genes. Fluoroquinolone resistance gene increase may be attributed to small plasmid-borne resistance genes, which remained stable during isolation and amplification via phi29.*

**Keywords:** Antibiotic resistance; plasmidome; resistome; chicken gut; long-read sequencing

#### Úvod

Antibiotika jsou jedním z nejdůležitějších nástrojů moderní medicíny, která ztrácí svou moc kvůli rozvoji rezistence u bakterií. Nyní vstupujeme do éry antibiotické krize, kdy mnoho bakteriálních infekcí již nelze léčit dostupnými antibiotiky. Šíření antibiotické rezistence výrazně pomohlo nadbytečné užívání antibiotik v živočišné výrobě[1]. Zásadní roli v šíření antibiotické rezistence hrají mobilní genetické elementy (MGE), které se mohou horizontálně šířit a přenášet na klinicky významné patogeny. Klíčovou roli mezi MGE sehrávají plazmidy, které si bakterie předávají pomocí konjugace. Střeva kuřat představují neprozkoumaný rezervoár genů antibiotické rezistence a nabízejí ideální prostředí pro přenos těchto genů[2]. Studium mikrobiomu trávicího traktu je však poměrně obtížné a většina současných metod vyžaduje kultivaci. Kultivace mikrobiomu snižuje úspěšnost zachycení obtížně kultivovatelných či anaerobních bakterií, proto byla zvolena cesta metagenomické izolace a přímého sekvenování. V tomto projektu jsme se zaměřili na kuřecí farmu v České republice a použili jsme sekvenování s dlouhými čteními k analýze plazmidomu a jeho souvislosti s rezistencí k antibiotikům ve střevním mikrobiomu kuřat během prvních čtyř týdnů jejich života.

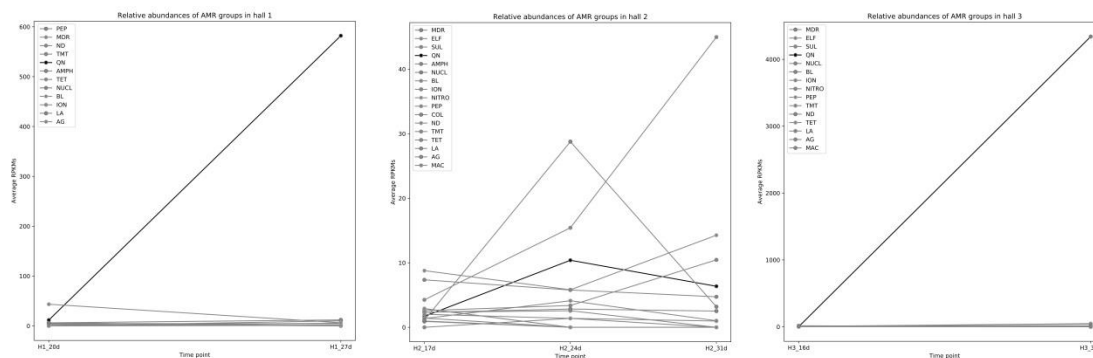
## **Materiál a metody**

Z farmy drůbeže Lukov v České republice bylo odebráno celkem 12 vzorků trusu. Tyto vzorky byly sbírány z tří různých hal a z každé haly byly získány vzorky ve čtyřech časových bodech vývoje drůbeže (7. den, 14. den, 21. den, 28. den života). Kuřata ze dvou chovů byla zdravá a měla mladé rodiče, zatímco kuřata ve třetím chovu měla starší rodiče, vykazovala vyšší úmrtnost a byla léčena enrofloxacinem a metronidazolem. V rámci tohoto projektu byl použit sekvenační přístup bez kultivace pro stanovení celkového obrazu obsahu plazmidů a rezistomu. Získané vzorky trusu byly podrobeny extrakci celkové plazmidové DNA pomocí QIAGEN Plasmid Midi Kit pro plazmidy o velikosti desítky až stovky kilobází a QIAGEN Plasmid Mini Kit pro plazmidy o velikosti jednotek kilobází podle pokynů výrobce se specifickými úpravami. Před izolací byl každý vzorek podroben půlhodinové inkubaci v roztoku obsahujícím 1,5 ml dodecylsírany sodného (SDS). Všechny objemy pufrů byly upraveny podle hmotnosti vzorku. Pro lepší rozpuštění buněčné stěny bylo ke každému vzorku v pufru P1 přidáno 200  $\mu$ l fosfátového pufru (PBS) obsahujícího lysozym ze slepičího vejce. Srážení bílkovin směsí pufru P3 se inkubovalo 20 min na ledu, eluční pufr QF a pufr EB se před použitím předeřály na 65 °C a po vysrážení izopropanolem se provedl krok promývání pelet DNA pomocí ledově studeného 70 % ethanolu. Pelet DNA plazmidu byl rozpuštěn ve 30  $\mu$ l pufru EB pro soupravu Mini a 200  $\mu$ l pro soupravu Midi. Vzorky byly inkubovány s Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase (Biosearch Technologies) pro odstranění kontaminantů a bakteriální chromozomální DNA. Následně byla DNA kruhových plazmidů amplifikována pomocí NxGen phi29 DNA Polymerase (Biosearch Technologies). Upravená DNA z jednoho vzorku byla následně smíchána pro snížení nákladů na sekvenování. Z plazmidové DNA byla připravena DNA knihovna s ligačním kitem SQK-LSK114 (Oxford Nanopore Technologies, ONT) a podrobena dlouhým čtením na platformě P2Solo (ONT) s filtrací kvality ( $Q \geq 9$ ).

Surová data z dlouhého čtení byla vyčištěna od adaptérů pomocí nástroje Porechop (ONT). Zpracované sekvence byly mapovány na geny rezistence, mobilní genetické elementy a plazmidy z veřejných databází (např. ResFinder, CARD, MGE finder, PLSDB) pomocí nástroje KMA. Relativní abundance jednotlivých genů a plazmidových replikonů byla vypočtena pomocí hodnoty RPKM (Reads Per Kilobase Million), která zohledňuje počet čtení namapovaných na daný gen, délku genu a celkové množství sekvenovaných dat. Získané analýzy byly vizualizovány pomocí knihovny Matplotlib v jazyce Python.

## **Výsledky**

Byly optimalizovány jednotlivé kroky izolace. Plazmidová DNA byla prozatím úspěšně získána ze 7 vzorků. Ty byly upraveny enzymy a sekvenovány. Sekvenováním s dlouhými čteními jsme získali v průměru 990,26 Mb na vzorek v rozmezí od 301,79 Mb do 3,54 Gb. Po sestavení byly přítomny i chromozomální sekvence, proporcionálně v rozmezí od 17 % do 64 % genomového obsahu. Na plazmidech ze 7 vzorků byly nalezeny různé geny antibiotické rezistence a mobilní genetické elementy. Pozorovali jsme rozdíly v genech antibiotické rezistence v průběhu času a v různých halách (Obr. 1)



**Obrázek 1.** Relativní abundance skupin genů rezistence v jednotlivých halách v různých časových bodech. Na každém grafu je černou barvou zvýrazněný nárůst genů rezistence proti fluorochinolonům. První graf představuje halu 1 s časovými body 2 a 3, druhý halu 2 s časovými body 2, 3 a 4 a třetí graf halu 3 s časovými body 2 a 4. V neléčených halách 1 a 2 můžeme vidět značný nárůst skupiny genů rezistence proti fluorochinolonům. Hodnota relativní abundance vyjádřena v RPKM (reads per kilobase per million) se mezi grafy liší. V hale 2 je maximální hodnota RPKM 45, v hale 1 je to 600 a v hale 3 je maximum 4000.

## Diskuze

Dosavadní výsledky nám umožnily pozorovat zastoupení genů rezistence v různých časových bodech ve třech chovných halách. V hale dvě byly podány antibiotika enrofloxacin a metronidazol. V rozporu s naší původní hypotézou nevykazovala ošetřená hala nejvyšší množství genů antibiotické rezistence. Nárůst genů rezistence k fluorochinolonům by mohl být zapříčiněn výskytem genu rezistence na malém plasmidu. Jelikož malé plasmidy jsou stabilnější oproti velkým plazmidům, které se mohly fragmentovat při izolaci na lineární úseky, které enzym DNáza zlikvidoval před amplifikací. V posledním kroku amplifikace pomocí phi29 mohou být malé plasmidy amplifikovány efektivněji než větší plasmidy, což může také ovlivnit konečný počet kopií [3].

## Závěr

Byla optimalizována metoda nezávislá na kultivaci k popisu plazmidomu a rezistomu trávicího traktu drůbeže. Byla sledována dynamika obsahu plazmidů nesoucí geny rezistence k antibiotikům v bakteriální populaci střeva drůbeže během jejich výkrmu ve třech halách konvenčního chovu. Náš projekt ukázal, že chovy kuřat jsou rezervoárem genů antibiotické rezistence, které se mohou potenciálně šířit pomocí plazmidů. Metagenomický přístup k analýze plazmidů pomocí sekvenování s dlouhými čteními ukázal dynamickou povahu plazmidů ve střevech zvířat.

## Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VETUNI 208/2024/FVHE a grantem Grantové agentury České republiky 22-16786S.

## Literatura

- [1] VAN BOECKEL T.P., et al. *Reducing antimicrobial use in food animals*. Science, 2017, 357 (6358), doi: 10.1126/science.aao1495
- [2] XIE T., et al. *Spatial features for Escherichia coli genome organization*. BMC Genomics, 2015, 16 (37), doi: 10.1186/s12864-015-1258-1.
- [3] KIRSTAHLER P., et al. *A Peek into the Plasmidome of Global Sewage*. Pamp SJ, 2021, mSystems 6:10.1128/msystems.00283-21.

**Kontaktní adresa:** Markéta Ryšavá, Ing., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22339@vfu.cz

## Luňáci červení ze střední Evropy předvádí jedinečnou migrační smyčku přes Jaderské moře

### Central European Red Kites perform unique loop migration over Adriatic Sea

Jan Škrábal<sup>1\*</sup>, R. Raab<sup>2</sup>, Ivan Literák<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 61242 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> TB Raab GmbH, Quadenstrasse 13, 2232 Deutsch-Wagram, Austria

<sup>3</sup> CEITEC, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 61242 Brno, Czech Republic

#### Summary

Migration is a complex phenomenon influenced by several factors, including environmental conditions and individual preferences. We investigated the unique loop migration of Central European Red Kites (*Milvus milvus*) to and from their wintering grounds in Italy. Utilizing telemetry data from nineteen tagged birds, we analysed migration routes, wind conditions, and route consistency. Our results revealed distinct patterns between autumn and spring migrations. During autumn, most birds chose a shorter route over the Adriatic Sea, facilitated by the katabatic Bora wind, while in spring, the majority chose a continental route along the east coast of Italy. Route choice showed high consistency, suggesting a fixed strategy influenced by experience and individual preference. Wind conditions played a crucial role, with the Bora wind facilitating autumn migrations but hindering spring crossings. Our findings underscore the ecological importance of coastal stopovers and over-sea passages for Red Kites and potentially other soaring raptors.

**Keywords:** *Milvus milvus*, Migration, Telemetry, Bio-tracking, Raptors

#### Úvod

Migrace je složitý jev pozorovaný u mnoha druhů ptáků, charakterizovaný sezónními pohyby na dlouhé vzdálenosti (Nourani et al., 2021). Evolučně byla migrační chování formována řadou faktorů včetně klimatických změn, přirozené selekce a dostupnosti potravních a hnízdních zdrojů (Sergio et al., 2022). Tyto adaptace vedly k vývoji různorodých migračních tras a strategií, které ptákům umožňují využívat příznivé environmentální podmínky a minimalizovat rizika během migrace (Nourani et al., 2016; Literák et al., 2022). Výběr migračních tras ovlivňují složité interakce vnějších a vnitřních faktorů. Mezi vnější faktory patří počasí, geografické prvky a dostupnost potravy (Vansteelant et al., 2023). Pod vnitřními vnitřní faktory si můžeme představit věk, pohlaví, morfologie a reprodukční stav (Panuccio et al., 2017). Povětrnostní podmínky jsou kritické pro tvarování migračních tras, zvláště mají-li v cestě přírodní bariéry jako otevřené moře nebo vysoké hory (Panuccio et al., 2017). Mnohé druhy ptáků využívají podpurné větry k usnadnění pohybu a snížení energetických nákladů, zatímco se vyhýbají čelním větrům, které by mohly jejich migraci ztížit (Nourani et al., 2016). Tato studie se zaměřuje na specifickou subpopulaci luňáků červených (*Milvus milvus*), která provádí jedinečnou migrační smyčku mezi střední Evropou a Itálií (Literák et al., 2022). Ptáci z této části populace překonávají riskantní mořské přechody na podzim a na jaře volí méně riskantní trasu podél východního pobřeží Itálie.

#### Materiál a Metody

V této studii jsme zkoumali migrační chování devatenácti luňáků červených z hnízdní populace ve střední Evropě na trojmezí Rakouska, Česka a Slovenska. Mláďata byla označena v letech 2015 až 2022 v Rakousku (6) a v České republice (13) telemetrickými loggery se

solárními panely (Ecotone, Polsko a Ornitela, Litva). Loggery byly umístěny na záda ptáků pomocí teflonového pásku. Data byla získávána pomocí systému GPS/GSM s různými časovými intervaly od 15 minut do 6 hodin, která byla pro analýzu sjednocena na interval 1 fix za hodinu. Pozice ptáků byly analyzovány v programu ArcGIS Pro. Data o větru nad Jaderským mořem byla získána z databáze ECMWF ERA5, s hodinovým rozlišením a prostorovým rozlišením 0,25°, pro období září až listopad a únor až květen. Z U a V složek větru byla vypočtena rychlost a směr větru. V rámci statistické analýzy byl prováděn Mann-Whitney U test k vyhodnocení rozdílů mezi jarní migrací přes pevninu a podzimní migrací přes moře. Konzistence výběru trasy jednotlivými ptáky byla hodnocena pomocí balíčku rptR, přičemž byli do analýzy zahrnuti pouze ptáci, kteří migrovali do Itálie a zpět alespoň dvakrát.

### Výsledky

Celkem jsme zaznamenali 51 podzimních migrací (4 po zemi a 47 přes moře) a 42 jarních migrací (35 po zemi a 7 přes moře). Během podzimní migrace většina ptáků přeletěla přes moře, pouze tři zvolili kontinentální trasu. Na jaře se vzor migrace lišil, tři ptáci provedli sedm migrací přes moře, z nichž jeden konzistentně migroval výhradně přes moře po dobu tří let. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v trvání, rychlosti nebo počtu zastávek mezi jarní a podzimní migrací, avšak podzimní trasa byla přibližně o 200 km kratší a obvykle rychlejší o jeden den. Větry nad Jaderským mořem se mírně lišily mezi sezónami; na podzim převážně vanuly z jihozápadu, zatímco na jaře z jihozápadu a jihovýchodu, což vytvářelo nepříznivé podmínky pro ptáky migrující na sever. Ptáci, kteří se rozhodli pro jarní přechod moře, si vybrali dny s příznivými povětrnostními podmínkami. Konzistence ve výběru trasy byla vysoká, s opakovatelností  $R = 0.89 \pm 0.12$  pro podzim a  $R = 0.90 \pm 0.22$  pro jaro ( $p < 0.05$ ).

Tabulka č. 1 Charakteristika podzimní a jarní migrace luňáků v době od 2015 do 2022.

Migrační komponent	N <sup>a</sup>	Podzim		Jaro		U	P
		Průměr ±SD	N <sup>a</sup>	Průměr ±SD			
Datum odletu <sup>b</sup>	47 (20)	275 ± 25	38 (18)	77 ± 34			
Datum příletu <sup>b</sup>	47 (20)	290 ± 19	38 (18)	90 ± 34			
Aktivní rychlost (km/dny aktivní migrace)	47 (20)		38 (18)				
		171 ± 48		174 ± 47	832	0.40	
Doba trvání (dny)	47 (20)	10.7 ± 5.5	38 (18)	12 ± 8	804	0.64	
Dny aktivní migrace	47 (20)	7 ± 3	38 (18)	9 ± 6	770	0.59	
Zastávky (dny)	47 (20)	3 ± 4	38 (18)	3 ± 3	764	0.29	
Délka (km)	47 (20)	1148 ± 252	38 (18)	1372 ± 448	631	<b>0.01</b>	

aPočet migračních epizod (počet označených jedinců). bJuliánské datum (1=1. ledna). Rozdíly byly testovány Mann-Whitney U testem pro neparametrická data a významné výsledky jsou zvýrazněny tučně.

### Diskuse a Závěr

Naše zjištění poskytují vhledy do složitého propojení mezi environmentálními podmínkami a výběrem migračních tras dravců. Pozorovali jsme odlišné vzory migračních tras mezi podzimem a jarem; většina podzimních migrací měla kratší trasu přes Jaderské moře, zatímco na jaře většina ptáků zvolila trasu přes Itálii. Zajímavé je, že tři ptáci se rozhodli pro přelet moře na jaře. Předpokládáme, že v jednom případě to mohlo být díky zkušenostem získaným v předchozích letech (Sergio et al., 2022). I přesto, že jsme nezaznamenali rozdíl v trvání

migrace, podzimní migrace byla obvykle rychlejší o jeden den díky čekání na podpůrné větry podél chorvatského pobřeží. Bora, katabatický vítr vanoucí nad Jaderským mořem, hraje důležitou roli při tvarování migrační smyčky, jelikož poskytuje příznivou podporu při přeletu a snižuje energetickou náročnost aktivního letu. Naše pozorování ukázala, že ptáci zahájili podzimní přelet moře právě při převládajících Bora větrech, zatímco na jaře zvolili trasu přes pevninu. Tato pozorování jsou v souladu s předchozími studiemi, které označily podpůrné větry jako významný faktor ovlivňující rozhodování o přeletu přes bariery a výběru trasy (Nourani et al., 2016). Naši ptáci projevovali vysokou konzistenci ve výběru trasy během obou migrací. Závěrem, naše výsledky naznačují, že výběr migrační trasy luňáků červených závisí na místních meteorologických podmínkách a individuálních preferencích. Katabatický vítr Bora, který periodicky vane nad Jaderským mořem, je hlavním faktorem za vznikem migrační smyčky. Tento vítr vytváří výhodnou trasu pro dravce během podzimní migrace, ale na jaře způsobuje nepříznivé větrné blokády, což vede k obletu podél východního pobřeží Itálie. Vysoká konzistence ve výběru trasy zdůrazňuje ekologický význam pobřežních zastávek a mořských přeletu pro středoevropské luňáky červené.

### Literatura

NOURANI, E., YAMAGUCHI, N. M., MANDA, A., & HIGUCHI, H. Wind conditions facilitate the seasonal water-crossing behaviour of Oriental Honey-buzzards *Pernis ptilorhynchus* over the East China Sea. *Ibis*. 2016, 158, 506–518. <https://doi.org/10.1111/ibi.12383>

SERGIO, F., BARBOSA, J. M., TANFERNA, A., SILVA, R., BLAS, J., & HIRALDO, F. Compensation for wind drift during raptor migration improves with age through mortality selection. *Nature Ecology & Evolution*. 2022, 6, 989–997. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01776-1>

LITERÁK, I., ŠKRÁBAL, J., KARYAKIN, I. V., ANDREYENKOVA, N. G., & VAZHOV, S. V.. Black Kites on a flyway between Western Siberia and the Indian Subcontinent. *Scientific Reports*. 2022, 12, article number 5581. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09246-1>

VANSTEELANT, W. M. G., GANGOSO, L., VIANA, D. S., SHAMOUN-BARANES, J. Z., & FIGUEROLA, J. A trans-African migrant shows repeatable route choice in males and repeatable timing in females. *Journal of Avian Biology*. 2023, article number e03050. <https://doi.org/10.1111/jav.03050>

PANUCCIO, M., DUCHI, A., LUCIA, G., & AGOSTINI, N. Species-specific behaviour of raptors migrating across the Turkish straits in relation to weather and geography. *Ardeola*. 2017, 64, 305–324. <https://doi.org/10.13157/arla.64.2.2017.ra2>

**Kontaktní adresa:** Jan Škrábal, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42, Brno, H22340@vfu.cz

## Molekulární a sérologická detekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato u drobných volně žijících savců

### Molecular and serological detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in small free-living mammals

<sup>1</sup>Edita Kozlíková, <sup>1</sup>Eva Bártová, <sup>2</sup>Alena Žáková

<sup>1</sup>Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

<sup>2</sup>Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

#### Summary

Free-living mammals serve as reservoir animals for the spirochetes *Borrelia burgdorferi* s.l. from which the infection can be transmitted through blood-sucking insects to other hosts, in which a disease called Lyme disease can occur. The presence of *B. burgdorferi* s.l. was determined in 170 small mammals caught in the wild according to the approved experimental project. During the autopsy, tissue samples (heart rinses and kidneys) were taken for antibody detection by the ELISA method and for direct detection of *B. burgdorferi* s.l. by PCR. The species of the animal was determined by using a morphological key, if there was doubt about the distinction between *Apodemus flavicollis* and *Apodemus sylvaticus*, AP-PCR was used. The prevalence of antibodies against *B. burgdorferi* s.l. was 10.5% (18/170) for IgM and 10% (17/170) for IgG without statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between the species, age, sex of animals and year season. The presence of *B. burgdorferi* s.l. was detected by PCR in 14.7% (25/170) of animals. No statistical significance was found in species, age and sex ( $p > 0.05$ ). The positivity statistically significantly differed in the seasons ( $p = 0.021$ ) with the highest positivity in spring and lowest positivity in autumn. We expected both antibody and Bbsl prevalence results around the landfill to be higher than in other areas due to the high presence of rodents in a small area, but the results are consistent with findings from other areas, so landfills are not more dangerous and there is no higher risk of Bbsl spreading. than in, for example, a forest park.

**Keywords:** Tick-borne diseases; zoonosis; reservoir animals; ELISA, PCR

#### Úvod

Drobní volně žijící savci jsou častá rezervoárová zvířata pro řadu infekčních onemocnění se zoonotickým potenciálem. Hlodavci se řadí mezi r-stratégy, tzn. mají mnoho životaschopných potomků a jejich přežívání závisí na dostupnosti potravy a množství úkrytů před predátory. Skládky komunálního odpadu mohou hlodavcům poskytnout dostatek úkrytů před predátory a přísunu potravy, což má za následek velké množství jedinců na malém území, čímž se vytváří ideální podmínky pro udržování a šíření nemocí. Spirochety *Borrelia burgdorferi* s.l. (Bbsl.) jsou původci onemocnění Lymeská borelióza, jejichž významnými rezervoáry jsou právě hlodavci. Vektorem Bbsl. jsou krev sající členovci, např. klíšťata, komáři nebo ovádi. Lymeská borelióza se může šířit pomocí krevsajících vektorů i na domácí mazlíčky a z nich na jejich majitele (Islam et al., 2021). Neléčená nebo chybně diagnostikovaná borelióza může mít za následek vážné zdravotní problémy i několik let po infikování jedince. Bakterie Bbsl. vytváří v těle cysty, z nichž dochází k postupnému uvolňování bakterií do organismu během imunosuprese nebo v průběhu jiné infekce, což je doprovázené projevy jako při prvotní infekci (Kalish et al., 2001). Cílem práce je zjištění prevalence Bbsl. u drobných volně žijících savců v okolí skládky komunálního odpadu a zjištění rizikových faktorů, které mohou ovlivňovat prevalenci infekce. Dílčím cílem práce je zavedení a optimalizace molekulární metody AP-PCR k rozlišení morfologicky podobných druhů myšic *Apodemus sylvaticus* a *A. flavicollis*.



## Materiál a metody

Od roku 2020 se provádí od jara do podzimu odchyt volně žijících drobných savců na skládce komunálního odpadu v Žabčicích dle schváleného projektu pokusů. Odchyt hlodavců se provádí pomocí sklapovacích pastí s návnadou (látkové knoty obalené v sádle) s kontrolou pastí v následujícím dni. Odchyty hlodavců pokračují i v letošním roce, kdy bude projekt ukončen. Doposud bylo odchyceno 170 drobných savců zahrnující druhy *Apodemus sylvaticus* (n=31), *Apodemus uralensis* (n=20), *Crocidura suaveolens* (n=1), *Microtus arvalis* (n=95) a *Sorex araneus* (n=23). Jedinci byli druhově určeni pomocí určovacích klíčů. Aby bylo možné rozlišit *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* byla na pracovišti zavedena a optimalizována metoda náhodné PCR (arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR) (Bugarski-Stanojevic et al., 2013) s primerem E8S. Protilátky proti *B. burgdorferi* s.l. byly detekovány ve výplachu srdce pomocí enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) a výsledky byly vyhodnoceny s využitím ELISA readeru. Ledviny hlodavců byly použity k izolaci DNA s využitím izolační soupravy Dneasy Blood & Tissue Kit a k následné přímé detekci *B. burgdorferi* s.l pomocí PCR s využitím primerů amplifikující hbb gen (Portnoi et al., 2006). Soubory dat byly porovnány dle druhu, pohlaví, věku hlodavců a ročního období ve statistickém programu STATISTICA 12.

## Výsledky

Celková prevalence protilátek proti Bbsl. byla 18,1 % (31/170), s tím že protilátky proti IgM byly detekovány u 10,5 % (18/170) hlodavců a protilátky proti IgG u 10 % (17/170) hlodavců. Souběžně byly protilátky IgM a IgG detekovány u 2,3 % (4/170) hlodavců. Nejvíce infikovaný byl druh *A. sylvaticus* (29 %, 9/31), naopak nejméně *Sorex araneus* (8,7 %, 2/23). Nicméně mezi sledovanými charakteristikami (druh, věk, pohlaví zvířat a roční období) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v seroprevalenci ( $p > 0.05$ ). Pomocí PCR byla Bbsl. zjištěna u 14,7 % (25/170) jedinců, a to 22,6 % (7/31) pro *A. sylvaticus* a 17,9 % (17/95) pro *M. arvalis*, ale bez statisticky významného rozdílu ( $p > 0.05$ ). Druh *A. uralensis* byl negativní (0/20). Věk a pohlaví hlodavců neměl vliv na pozitivitu ( $p > 0.05$ ). Statisticky významný rozdíl byl zjištěn v pozitivitě hlodavců v rámci ročních období ( $p = 0.021$ ), s nejvyšší pozitivitou na jaře (27 %, 10/37) a nejnižší pozitivitou v létě (8,5 %, 8/94). U 7 (4,1 %) jedinců byly detekovány protilátky a zároveň byla zjištěna přítomnost DNA bakterie. PCR pozitivní vzorky budou odeslány na sekvenování.

## Diskuze

Protilátky proti Bbsl. byly zjištěny u 18,1 % vyšetřovaných hlodavců, což je srovnatelné s 12 % prevalencí, která byla zjištěna na jiných územích jižní Moravy v letech 2010 a 2014 (Kučerová et al., 2019), ale 2x nižší než 43,7 % prevalence, která byla zjištěna u hlodavců rovněž na Moravě (Vostal a Žákovská, 2003). V naší práci a podobně i v práci Vostála a Žákovské (2003) byl nejvyšší seroprevalence zjištěna u *A. sylvaticus*, což odpovídá předpokladu, že myšice se řadí mezi významné rezervoárové živočichy pro Bbsl.. Pomocí PCR byla Bbsl. detekována u 14,7 % vyšetřovaných jedinců, což je téměř poloviční oproti 31,2 % pozitivitě zjištěné u drobných savců v Německu. V práci Obiegala et al. (2017) byla zjištěna nejvyšší pozitivita u druhu *M. glareolus* (32,9 %) a *A. flavicollis* (25,4 %). V Rakousku byla přítomnost Bbsl. zjištěna pomocí PCR u 24 % odchycených jedinců s nejvyšší pozitivitou u *A. flavicollis* (Khanakah et al., 2006). Námi zjištěné výsledky i výsledky z jiných podobně zaměřených prací potvrzují fakt, že myšice rodu *Apodemus* hrají významnou roli při udržování Bbsl. v přírodě.

## Závěr

Při monitoringu infekčních agens v prostředí se využívá přímý průkaz původce pomocí PCR, nebo lze detekovat přítomnost protilátek, které nás informují o tom, jestli se jedná o akutní nebo chronickou fázi infekce. Každá metoda má své výhody a nevýhody, a proto je vhodné obě metody kombinovat, pokud chceme mít komplexní přehled o výskytu daného patogenu na konkrétním území. Výsledná prevalence Bbsl. zjištěná u hlodavců na skládce komunálního odpadu v Žabčicích je nižší, než bychom očekávali vzhledem k množství potenciálních rezervoárových zvířat na malém území. Nicméně nižší prevalenci Bbsl. lze vysvětlit tím, že podmínky na skládce neodpovídají přirozenému prostředí pro výskyt klíšťat, které sehrávají roli hlavního vektora Bbsl.. Jelikož nebyl zatím prokázán vertikální přenos Bbsl. u rezervoárových zvířat, tak bez přítomnosti vektora je šíření infekce na další zvířata obtížné. Riziko možné infekce pracovníků skládky nebo zvířat v jejím okolí není zanedbatelné, ale není ani výrazně vyšší než v jiných oblastech jižní Moravy. Skládku komunálního odpadu lze tedy považovat za srovnatelný zdroj Bbsl. infekce, jako v jiných lokalitách.

## Literatura

- BUGARSKI-STANOJEVIĆ, V.; BLAGOJEVIĆ, J.; ADNAĐEVIĆ, T.; JOVANOVIĆ, V.; VUJOŠEVIĆ, M. Identification of the sibling species *Apodemus sylvaticus* and *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Muridae) Comparison of molecular methods. *Zoologischer Anzeiger*. 2013, vol. 252, no. 4, s. 579-587.
- ISLAM, M. M.; FARAG, E.; MAHMOUDI, A.; HASSAN, M. M.; MOSTAFAVI, E.; ENAN, K. A.; AL-ROMAIHI, H.; ATTA, M.; EL HUSSEIN, A. R. M.; MKHIZE-KWITSHANA, Z. Rodent-related zoonotic pathogens at the human–animal–environment interface in Qatar: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021, vol. 18, 5928.
- KALISH, R. A.; MCHUGH, G.; GRANQUIST, J.; SHEA, B.; RUTHAZER, R. et al. Persistence of Immunoglobulin M or Immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10–20 years after active Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, vol. 33, no. 6, s. 780-785.
- KHANAKAH, G.; KOCIANOVÁ, E.; VYROSTEKOVÁ, V.; ŘEHÁČEK, J.; KUNDI, M. et al. Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2006, vol. 118, no. 23-24, s. 754-758.
- KUČEROVÁ, H. L.; ŽÁKOVSKÁ, A.; MARKOVÁ, J.; ÁRTOVÁ, E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s.l. in wild small mammals and sensitivity of PCR and cultivation. *Veterinary Microbiology*. 2019, vol. 230, s. 241-243.
- OBIEGALA, A.; KRÓL, N.; OLTERSODORF, C.; NADER, J.; PFEFFER, M. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasites & Vectors*. 2017, vol. 10, no. 1, s. 115.
- PORTNOI, D.; SERTOUIR, N.; FERQUEL, E.; GARNIER, M.; BARANTON, G.; POSTIC, D. A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the hbb gene sequence. *FEMS Microbiology Letters*. 2006, vol. 259, no. 1, s. 35-40.
- VOSTÁL, K.; ŽÁKOVSKÁ, A. Two-year study of examination of blood from wild rodents for the presence of antiborrelial antibodies. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2003, vol.10, no. 2, s. 203-206.

**Kontaktní adresa:** Edita Kozlíková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22338@vfu.cz



Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. Mgr. Alena Zouharová, Ph.D.
Název:	XXVI. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
Počet stran:	87
Vydání:	1.
Rok vydání:	2024
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno

**ISBN 978-80-7305-957-6**