

Předběžná oponentura disertační práce

Riziko výskytu klostridií v silážích a ve výkalech dojnic

Doktorandka: Ing. Veronika Mlejnková

Školitel: prof. MVDr. Ing. Petr Doležal, CSc.

Ústav výživy zvířat a pícninářství



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Klostridie

- Nežádoucí, patogen pro člověka i zvířata.
- Sporogenní, schopny opětovného růstu.
- Spory klostridií - do mléka (zkrmování siláží podřadné jakosti, prostředí).
- Ovlivní smyslové vlastnosti mléka a výrobků z něj (vady sýrů).
- Rezistentní vůči teplotě, záření, dezinfekci, kyslíku, trávicím šťávám.



Klostridie

- Zdroj půdní infekce – s posečenou pící i povrchová vrstva půdy (nežádoucí MO) do siláží.
- Činností klostridií – dekarboxilace AK → vznik biogenních aminů.
- Způsobují onemocnění – Botulizmus, Tetanus, Sněť šelestivá, Maligní edém, Enterotoxémie.



Cíl práce

Pokus I.

- Založit modelový pokus v laboratorních podmínkách a potvrdit či vyvrátit hypotézu, zda-li má vliv kontaminace siláží povrchovou vrstvou půdy během sklizně rostlinného materiálu na následný růst klostridií v anaerobních podmínkách siláží.
- Posouzení vlivu a vhodnosti použití různého typu silážního aditiva při různé míře kontaminace původní hmoty povrchovou vrstvou půdy na růst epifytní mikroflóry a výživnou hodnotu siláží.



Cíl práce

Pokus II.

- Potvrzení nebo vyvrácení hypotézy, zda se klostridie vyskytují v provozních podmínkách, a to v krmivech, ve stěrech z vemene, syrovém mléce, bachorové tekutině, ve výkalech a podestýlce.

Pokus III.

- Potvrdit přítomnost bakterie *Clostridium perfringens*, metodami molekulární biologie (PCR).



Pokus I. – materiál

- ❑ Jetel luční (*Trifolium pratense*, var. Start)
- ❑ Vojtěška setá (*Medicago sativa*, var. Palava)
 - těžce silážovatelné pícniny



- ❑ Povrchová vrstva půdy – z pokusných parcel,
max. do hloubky 1 cm



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pokus I. – materiál a metodika

Sledovaný faktor:

- přídavek povrchové vrstvy půdy (0, 20 a 40 g / kg sušiny hmoty)
- ✓ navrženo s ohledem na předpokládaný obsah popelovin v původní hmotě (okolo 8 %/kg sušiny)
- ✓ na záměr, aby obsah popelovin v kontaminovaných silážích přesahoval 10 % - v praxi považováno za hraniční hodnotu obsahu popelovin
- použití biologického a chemického silážního aditiva



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pokus I. –metodika

Modelové siláže:

- ❑ 8 kg zavadlé hmoty, 10 týdnů
- ❑ K0, K20, K40 (bez silážního aditiva)
- ❑ B0, B20, B40 (ošetřeny biologickým silážním aditivem)
- ❑ CH0, CH20, CH40 (ošetřeny chemickým silážním aditivem)
- ❑ vždy s přidavkem povrchové vrstvy půdy v množství 0, 20 a 40 g/kg sušiny hmoty



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



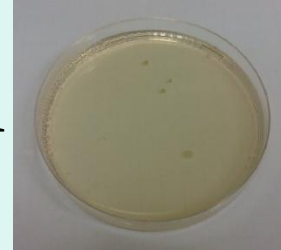
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pokus I. –metodika



1.) Mikrobiologická analýza

- Počet termorezistentních anaerobních (sporulujících) mikroorg. – PCA (Plate count agar) agar, 48 – 72 h., 30 °C, pasterace 85 °C 10 min.
- *Clostridium perfringens* – TSN (Tryptone sulfite neomycin) agar, 24 h., 46 °C.
- Vyjádřeno v KTJ/g siláže.

2.) Stanovení obsahu živin

- Obsah sušiny, popelovin, dusíkatých látek, tuku, vlákniny.

3.) Fermentační proces - pH, kvasné kyseliny.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pokus I. –metodika

- Výsledky statisticky zpracovány – Statistica 10, ANOVA, Schefféův test, $P < 0,05$.
- Statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) vyjádřen pomocí indexů – kde se indexy neshodují, statisticky průkazný rozdíl.



Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus I. – výsledky

Jetel luční – mikrobiologická analýza

- *Clostridium perfringens* – v povrchové vrstvě půdy 8 KTJ/g, u varianty B40 ($2,73 \cdot 10^2$) KTJ/g siláže.
- Termorezistentní anaerobní (sporulující) MO – čerstvě posečená hmota $1,32 \cdot 10^1$ KTJ/g, povrchová vrstva půdy $1,46 \cdot 10^1$ KTJ/g .

Vliv	Varianta	n	Průměr (KTJ/g)	Index
Povrchová vrstva půdy	0	9	17	a
	20	9	12	a
	40	9	15	a
Silážní aditivum	K	9	11	a
	CH	9	15	a
	B	9	17	a



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus I. – výsledky

Jetel luční – fermentační proces

- Sušina 200 – 211 g/kg – záměrně nižší
- pH 4,8 – 5,4, u všech variant s přidavkem silážních aditiv potvrzena statistická průkaznost ($P < 0,05$).
- Kys. máselná: u varianty K 40 a B40.

Vliv	Faktor	n	pH		Kys. mléčná v g/kg		Kys. octová v g/kg		Kys. propionová v g/kg	
			průměr	index	průměr	index	průměr	index	průměr	index
Povrchová vrstva půdy	0	12	5,115	a	124,2	b	57,55	a	0,159	b
	20	12	5,070	b	115,4	ab	57,70	a	0,393	a
	40	12	5,140	a	109,6	a	56,96	a	0,333	a
Silážní aditivum	K	12	5,435	c	105,7	a	57,39	b	0,326	b
	B	12	5,050	b	115,2	b	64,04	c	0,559	c
	CH	12	4,840	a	128,4	c	50,78	a	0,000	a



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus I. – výsledky

Jetel luční – živinové složení

- Uvedeno v g/kg v sušině.

Varianta	Popel	NL	Tuk	Vláknina	OH	BNLV
K0	131,91	230,31	80,27	169,50	868,10	388,01
K20	155,35	220,96	73,22	161,76	844,60	388,70
K40	174,48	209,66	79,86	165,03	825,50	370,98
B0	133,80	224,92	74,50	165,29	866,20	401,50
B20	159,65	214,38	75,15	161,38	840,40	389,40
B40	192,90	209,08	77,01	156,20	807,10	364,80
CH0	142,88	227,98	72,73	166,62	857,10	389,80
CH20	166,02	217,84	63,27	169,33	834,00	383,50
CH40	190,26	211,66	60,97	162,02	809,70	375,10



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus I. – výsledky

Vojtěška setá – mikrobiologická analýza

- *Clostridium perfringens* – v povrchové vrstvě půdy 2 KTJ/g siláže, v silážích se nevyskytovalo.
- Siláž. aditiva – snížila počet termorezistentních anaerobních (sporulujících) MO.

Mikroorganismus	Vliv	Varianta	Průměr (KTJ/g)	Indexy
Termoresistentní anaerobní (sporulující) mikroorganismy	Povrchové vrstvy půdy	0	297	a
		20	454	a
		40	277	a
	Silážního aditiva	K	713	b
		B	164	a
		CH	152	a



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pokus I. – závěr

- V povrchové vrstvě půdy *Cl. perfringens* obsaženo u jetele lučního i vojtěšky seté.
- V silážích jen u jetele lučního u varianty s vyšším přídatkem půdy (40g/kg suš. hm.) a po ošetření siláží biolog. silážním aditivem – nedostatečné okyselení siláží.
- U ostatních variant byly *Cl. perfringens* během fermentace potlačeny jinými MO, vliv i prostředí – laboratoř, řádné udusání, anaerobní prostředí, MO v ovzduší, atd.
- U vojtěšky seté se s přídatkem silážních aditiv snižovalo množství termorezistentních anaerobních MO. Byl potvrzen konzervační efekt aditiv.



Pokus I. – jetel luční - závěr

- Silážní aditiva měla vliv na snížení pH – pozitivní vliv na první fázi fermentace.
- S přidavkem povrchové vrstvy půdy se snižovala kys. mléčná, špatný průběh fermentace v dalších fázích fermentace, přeměna mléčného kvašení na klostridiální.
- Jedná se „klostridiální“ siláže, vyznačující se nízkým obsahem kyseliny mléčné a pH nad 4,8.
- Po přidavku silážních aditiv se množství kys. mléčné zvyšovalo. Poukazuje na skutečnost, že v modelových silážích došlo k silné acidifikaci, což potvrzuje i hodnota pH.
- Aditiva pozitivně ovlivnila průběh fermentace.



Pokus I. – jetel luční - závěr

- Nebyl potvrzen pozitivní efekt biolog. aditiva oproti kontrolní variantě. Poukazuje i vyšší tvorba kys. octové v silážích ošetřené biolog. aditivem oproti siláži ošetřené chemickým aditivem.
- Kys. propionová nebyla přítomna u siláží ošetřených chemickým silážním aditivem.
- S přidavkem povrchové vrstvy půdy se zvyšovalo množství popelovin a množství NL se snižovalo.



Pokus II. – materiál

Provozní podmínky: odběr vorků z provozu A, B:

- TMR (směsná krmná dávka)
- Bachorová tekutina
- Stěry z vemene
- Syrové mléko
- Výkaly
- Podestýlka



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Pokus II. –metodika

1.) Mikrobiologická analýza

- Počet termorezistentních anaerobních (sporulujících) mikroorganismů – PCA agar, 48 – 72 h, 30 °C, pasterace 85 °C 10 min.
- *Clostridium perfringens* – TSN agar, 24 hodin, 46 °C.
- Vyjádřeno v KTJ/g siláže.

2.) Stanovení obsahu živin

- Obsah popelovin, dusíkatých látek, tuku, vlákniny.



Pokus II. – výsledky

Mikrobiologická analýza

- v KTJ/g siláže

Vzorek	<i>Clostridium perfringens</i>				Ostatní anaerobní termorezistentní (sporulující) mikroorganismy			
	n	Podnik A	Podnik B	Průměr	n	Podnik A	Podnik B	Průměr
TMR	4	0	0	0	4	$5,18 \cdot 10^2$	$6,17 \cdot 10^4$	$3,11 \cdot 10^4$
Stěry z mléčné žlázy	32	0	0	0	24	$1,14 \cdot 10^0$	$7,58 \cdot 10^{-1}$	$9,47 \cdot 10^{-1}$
Syrové mléko	32	0	0	0	24	$1,38 \cdot 10^0$	$1,00 \cdot 10^0$	$1,19 \cdot 10^0$
Bachorová tekutina	32	$6,82 \cdot 10^0$	$4,55 \cdot 10^{-1}$	$3,64 \cdot 10^0$	24	$1,87 \cdot 10^3$	$6,99 \cdot 10^6$	$3,50 \cdot 10^6$
Výkaly	32	$1,48 \cdot 10^3$	$1,06 \cdot 10^1$	$7,43 \cdot 10^2$	24	$6,27 \cdot 10^3$	$1,15 \cdot 10^5$	$6,06 \cdot 10^4$
Podestýlka	32	$9,09 \cdot 10^1$	$1,55 \cdot 10^3$	$8,18 \cdot 10^2$	24	$8,55 \cdot 10^3$	$1,21 \cdot 10^5$	$6,50 \cdot 10^4$



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus II. – výsledky

Provozní podmínky – živinové složení

- Uvedeno v g/kg v sušině.

	podnik A		podnik B	
Živiny	TMR	podestýlka	TMR	podestýlka
Popeloviny	7,11	8,75	5,49	10,72
N-látky	15,50	10,10	14,19	10,40
Tuk	3,73	1,14	3,51	0,82
Vláknina	13,10	32,05	18,79	30,81
ADF	15,70	48,11	23,07	42,49
NDF	27,60	70,87	39,32	65,76



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus II. – závěr

- Zvýšené množství *Clostridium perfringens* bylo ve výkalech a podestýlce – hlavní zdroj infekce v provozních podmínkách. Příčina úmrtí telat po narození.
- Termorezistentní anaerobní (sporulující) MO se vyskytovaly ve všech odebraných vzorcích, nejvíce v TMR, bachorové tekutině, výkalech a podestýlce.

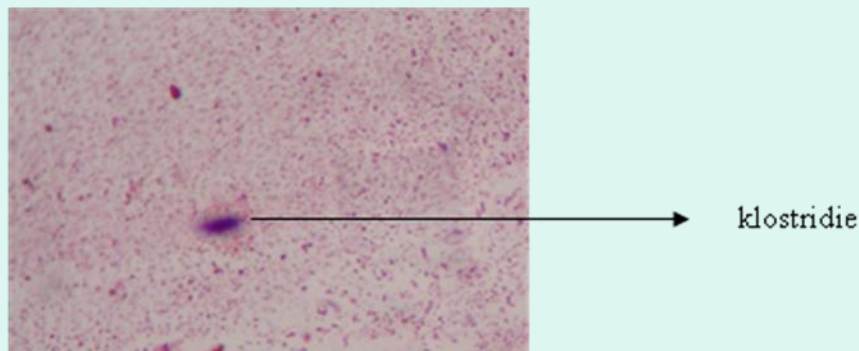


Pokus III. – materiál a metodika

1.) Identifikace klostridií

➤ Gramovo barvení

➤ zvětšení 1000 x



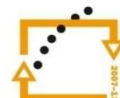
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

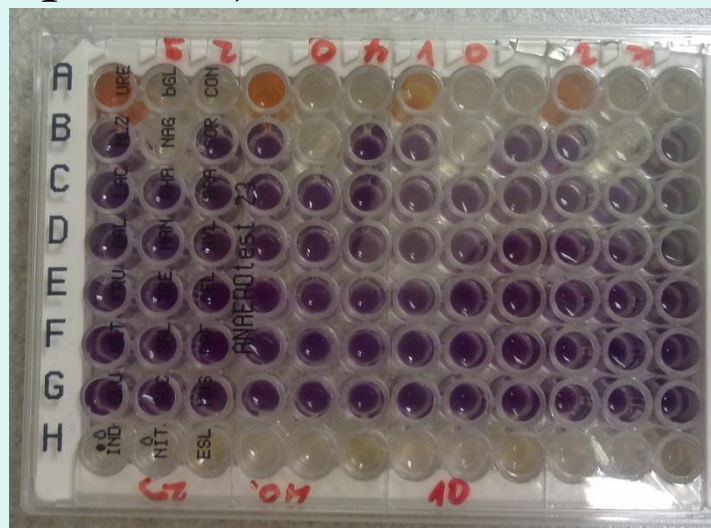
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus III. – materiál a metodika

1.) Identifikace klostridií

- Biochemický test ANAEROtest 23 (Erba Lachema, Česká republika)



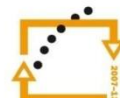
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus III. – materiál a metodika

2.) Přečištění a pomnožení vzorků

- Vzorky siláží, bachorové tekutiny, výkalů, podestýlky.
- Pomnoženy v tekutém médiu TSB agar (Buillon Tryptone-Soya Broth) s vrstvou parafinového oleje.



Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus III. – materiál a metodika

3.) PCR (polymerase chain reaction)

- Izolace DNA pomocí magnetických kuliček.
- Stanovení výtěžnosti - přístroj NanoPhotometerTM Pearl.
- PCR:



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

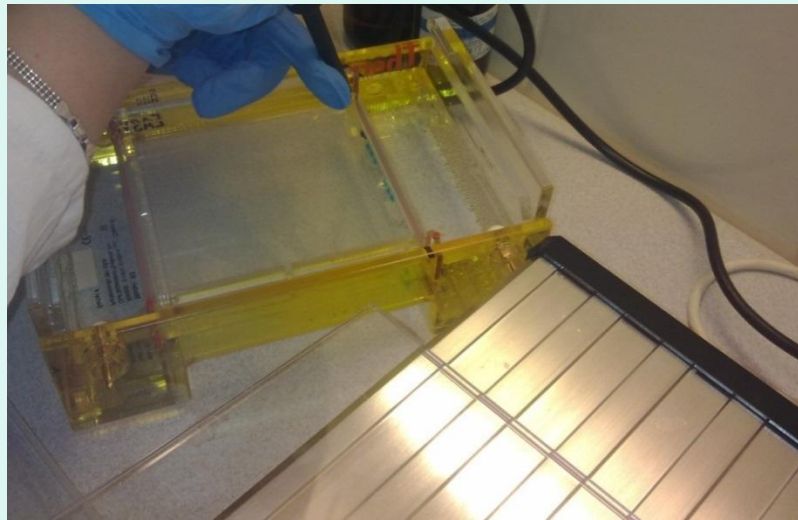
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus III. – materiál a metodika

4.) Agarosová elektroforéza PCR produktů

- příprava agaróзовého gelu
- vizualizace - transluminátor



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus III. – výsledky

Navázaly se primery na DNA našich izolátů - potvrzuje jejich příslušnost k druhu *Clostridium perfringens*.

pb



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Pokus III. – Závěr

- Pomocí PCR a následné agarosové elektroforéze byla potvrzena přítomnost bakterie *Clostridium perfringens* ve výkalech, bachorové tekutině a podestýlce v provozních podmínkách a v pokusných silážích jetele lučního.



Poděkování

- Excellence doktorského studia na AF MENDELU pro navazující evropskou vědecko – výzkumnou kariéru CZ.1.07/2.3.00/20.0005
- Podpořeno projekty: IGA AF č. IP 2/2012





Děkuji za pozornost



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky