



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**<<ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΟΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΤΟΜΕΑ ΚΑΙ ΤΗ  
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ>>**

Κατεύθυνση: Σύγχρονες Μέθοδοι Αύξησης της παραγωγικότητας στην  
Κτηνοτροφία

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Ανασκόπηση της χρήσης ψευδαργύρου (Zn) ως προσθετικό των  
ζωοτροφών

**ΑΡΓΥΡΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ**

Γεωπόνος

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΝΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2020**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μοναδικότητα του Zn έγκειται στο ότι είναι το δεύτερο πιο άφθονο ιχνοστοιχείο στο σώμα του ζώου αλλά δεν μπορεί να αποθηκευτεί σε αυτό, επομένως απαιτείται συνεχής πρόσληψή του μέσω της τροφής. Τα συνήθη σιτηρέσια για τα αγροτικά ζώα πρέπει να συμπληρωθούν με ψευδάργυρο (Zn) και λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ανταγωνιστικές ουσίες όπως το φυτικό οξύ. Οι τρέχουσες διατροφικές συστάσεις για τα διάφορα ζώα περιλαμβάνουν αρκετά γενναιόδωρα περιθώρια ασφαλείας εξαιτίας της αβεβαιότητας σχετικά με τις απαιτήσεις σε Zn υπό διαφορετικές συνθήκες εκτροφής. Επιπλέον, η χρήση φαρμακολογικών δόσεων Zn για την αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας και τη βελτίωση των αποδόσεων είναι ευρέως διαδεδομένη. Συνολικά, οι σύγχρονες δίαιτες για τους χοίρους και τα πτηνά περιέχουν πολύ περισσότερο Zn από ό,τι είναι απαραίτητο για την κάλυψη των αναγκών των ζώων, γεγονός που συνδέεται με ανησυχίες σχετικά με το περιβάλλον μια και ο Zn συγκαταλέγεται στα βαρέα μέταλλα, καθώς και με την ασφάλεια των ζώων και των καταναλωτών. Ως εκ τούτου, οι ευρωπαϊκές αρχές πρόσφατα μείωσαν τα επιτρεπόμενα ανώτατα όρια για τον Zn στις πλήρεις ζωοτροφές. Για να διατηρηθεί η παραγωγικότητα και η καλή διαβίωση των ζώων μειώνοντας παράλληλα το επίπεδο Zn στις πλήρεις ζωοτροφές, πρέπει να εφαρμοστούν όλα τα κατάλληλα μέτρα που σταθεροποιούν τη βιοδιαθεσιμότητα της ζωοτροφής σε Zn, χωρίς ωστόσο να μπορεί να αντικατασταθεί η φαρμακευτική χρήση του. Το σημαντικότερο είναι ότι πρέπει να παρέχονται αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την απαίτηση Zn σε πρακτικές συνθήκες, λαμβάνοντας υπόψη τη βιοδιαθεσιμότητα των φυσικών ή συμπληρωμένων ζωοτροφών Zn, του ανταγωνισμού με άλλους διαιτητικούς παράγοντες καθώς και της φυσιολογικής κατάστασης του ζώου. Αξίζει να σημειωθεί ότι για κάθε ζώο έχουν καθοριστεί ειδικές συστάσεις ανάλογα με το είδος και την ηλικία και σύμφωνα με αυτές η ΕΕ έχει θεσπίσει τα νέα όρια.

Πρόσφατα προτείνεται η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας και η παραγωγή νανοσωματιδίων του οξειδίου του ψευδαργύρου (nZn), τα οποία έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 1 έως 100 nm. Το nZn προωθεί την ανάπτυξη, μπορεί να λειτουργήσει ως αντιβακτηριακός παράγοντας καθώς επίσης ρυθμίζει την ανοσία και την αναπαραγωγή των ζώων. Τόσο στις χαμηλότερες όσο και στις υψηλότερες δόσεις των προδιαγραφών έχει επιδείξει ποικίλες επιδράσεις στις επιδόσεις των ζώων. Τα νανοσωματίδια του οξειδίου του ψευδαργύρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλότερες δόσεις και μπορούν να παρέχουν καλύτερα αποτελέσματα από τις συμβατικές πηγές Zn και επίσης να αποτρέψουν έμμεσα την περιβαλλοντική μόλυνση. Οι τοξικολογικές μελέτες παρέχουν μικτά αποτελέσματα σε ζωικά

μοντέλα. Έχουν διεξαχθεί μελέτες σε διαφοροποιημένα ζωικά είδη και έχουν αναφερθεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα εξαιτίας της συμπλήρωσης των ζωοτροφών με nZn. Ωστόσο, υπάρχει ανάγκη βελτιστοποίησης της δόσης και της διάρκειας χορήγησης του συμπληρώματος της ζωοτροφής nZn για τον άνθρωπο και το ζωικό κεφάλαιο, ανάλογα με τα βιολογικά αποτελέσματά του. Η πραγματική βιοδιαθεσιμότητα του nZnO στα ζώα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

## ABSTRACT

### **A review of the use of zinc (Zn) as a feed additive**

The uniqueness of Zn is that it is the second most abundant trace element in the animal's body but cannot be stored in the animal, so it is required for continuous intake through food. Common rations for farm animals should be supplemented with zinc (Zn) and because of their high content of competing substances such as vegetable acid. Current dietary recommendations for various animals include several generous safety margins due to uncertainty about the requirements for Zn under different breeding conditions. In addition, the use of Zn pharmacological doses to treat health problems and improve performance is widespread. Overall, modern diets for pigs and poultry contain much more Zn than is necessary to meet the needs of animals, which is linked to environmental concerns as Zn is a heavy metal and animal and consumer safety. As a result, the European authorities have recently lowered the permissible Zn levels in whole feed. In order to maintain productivity and animal welfare while reducing Zn levels in whole feeds, all appropriate measures should be taken to stabilize the Zn bioavailability of the feed, but its medicinal use cannot be replaced. Most importantly, reliable information on the requirement of Zn in practical conditions should be provided, taking into account the bioavailability of natural or supplemented Zn feed, antagonisms with other dietary factors as well as the animal's physiological status. It is worth noting that specific recommendations have been set for each animal according to species and age and accordingly the EU has set new limits.

It is recently proposed to implement nanotechnology and to produce zinc oxide (nZn) nanoparticles with sizes ranging from 1 to 100 nm. nZn promote growth, can act as an antibacterial agent as well as regulate the immunity and reproduction of animals. Both the lower and the higher doses of the specification have shown varying effects on animal performance. Zinc oxide nanoparticles can be used at lower doses and can provide better results than conventional Zn sources and also indirectly prevent environmental contamination. Toxicological studies provide mixed results in animal models. Studies in different animal species have been conducted and encouraging results have been reported due to supplementation with nZn. However, there is a need to optimize the dose and duration of administration of the nZn feed supplement for humans and livestock, depending on its biological effects. The actual bioavailability of nZnO in animals has not yet been elucidated.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΚΑΙ Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΣ ΣΤΑ ΖΩΑ .....	11
1.1 Ιστορική ανασκόπηση .....	11
1.2 Σημασία ψευδαργύρου .....	11
1.3 Απορρόφηση του ψευδαργύρου στον οργανισμό των ζώων.....	12
1.4 Διανομή ψευδαργύρου του ψευδαργύρου στον οργανισμό των ζώων .....	14
1.5 Βιοδιαθεσιμότητα του Zn.....	17
1.6 Μεταβολικός μηχανισμός και ρόλος .....	17
1.7 Ανεπάρκεια Zn.....	22
1.8 Τοξικότητα.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΑ ΖΩΑ.....	26
2.1 Δυνητικός ρόλος του Zn ως ιχνοστοιχείο στα ζώα.....	26
2.1.1 Οργανικές και ανόργανες πηγές Zn .....	27
2.2 Δυνητικός ρόλος του Zn ως αντιμικροβιακός παράγοντας στα ζώα.. .....	28
2.2.1 Επίδραση του Zn σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε χοίρους και πτηνά. 28	
2.2.2 Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης .....	29
2.2.3 Ανθεκτικότητα Zn σε μικροοργανισμούς των ζώων .....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ Zn - ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ – ΑΙΤΙΑ ΚΑΤΑΡΓΗΣΗΣ .....	41
4.1 Ανασκόπηση αιτιών κατάργησης.....	41
4.2 Νομοθεσία.....	43
4.2.1 Απαγόρευση του οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) στους χοίρους .....	46

4.3	Στρατηγικές για την αύξηση της ακρίβειας του προσδιορισμού της χορήγησης ψευδαργύρου σε ζώα .....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....		53
5.1	Ιδιότητες των νανο-ιχνοστοιχείων .....	53
5.2	Επίδραση του εμπλουτισμού νανοσωματιδίων οξειδίου του ψευδαργύρου (nZn) σε βιολογικά συστήματα .....	53
5.2.1	Ανάπτυξη .....	55
5.2.2	Παραγωγή γάλακτος .....	55
5.2.3	Ζύμωση στη μεγάλη κοιλία .....	55
5.2.4	Ανοσία .....	56
5.2.5	Αναπαραγωγή .....	56
5.2.6	Αντιβακτηριακή δραστηριότητα του nZn .....	57
5.2.7	Τοξικότητα του nZn .....	58
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....		60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....		62

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Κατανομή ψευδαργύρου στα κύτταρα. Οι μεταφορείς ZnT (πράσινα βέλη) και ZIP (κόκκινα βέλη) συντονίζονται για να ρυθμίζουν την κυτταρική ομοιόσταση του ψευδαργύρου. Η ολική συγκέντρωση του κυτταρικού ψευδαργύρου θεωρείται ότι είναι 10s-100s μM, αλλά σχεδόν όλα τα ιόντα ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) στο κυτταρόπλασμα είναι συνδεδεμένα με ένα πλήθος μεταλλοπρωτεϊνών και MT, ή απελευθερώνονται από ενδοκυτταρικά οργανίδια / κυστίδια μέσω των μεταφορέων ZnT ή ZIP, αντίστοιχα. ....	14
Εικόνα 2. Υποκυτταρικός εντοπισμός μεταφορέων ZnT στα θηλαστικά.....	16
Εικόνα 3. Παρακεράτωση σε χοίρο από έλλειψη Zn. ....	23
Εικόνα 4. Απόκριση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου σε ξηρό ιστό σε ζωτροφή με ποικίλλουσα περιεκτικότητα ψευδαργύρου .....	35
Εικόνα 5. Σχέση μεταξύ του φορτίου του ψευδαργύρου στην κόπρο και της ποσοστιαίας συγκέντρωσης φαινοτυπικών αντιμικροβιακών ουσιών ανθεκτικών στην <i>Escherichia coli</i> (Hölzel et al., 2012). Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τις εκτιμώμενες περιεκτικότητες ψευδαργύρου στην κόπρο.....	37
Εικόνα 6. Διάγραμμα διασποράς των ρύπων στο περιβάλλον μέσω της κόπρου .....	38
Εικόνα 7. Διαδικασία για την αναθεώρηση της ισχύουσας νομοθεσίας από την Ευρωπαϊκή Ένωση .....	43
Εικόνα 8. Επίδραση των πρόσφατα προτεινόμενων μέγιστων επιτρεπόμενων συγκεντρώσεων για τον ολικό ψευδάργυρο στις ζωτροφές .....	46
Εικόνα 9. Θεωρητική γραμμική απόκριση μιας τυχαίας παραμέτρου κατάστασης ψευδαργύρου (Zn) σε μεταβολές στη διατροφική συγκέντρωση του ψευδαργύρου. Σε αυτό το παράδειγμα, η παράμετρος (π.χ. φαινομενικά πεπτή χορήγηση Zn) παρουσιάζει ένα πλατό για απόκριση πάνω από ένα διατροφικό κατώτατο όριο 60 mg Zn/kg δίαιτας, κάτω από το οποίο μειώνεται ή αυξάνεται με κλίση 0,17/mg, αντίστοιχα. Το διατροφικό κατώφλι (σημείο διακοπής) αντιπροσωπεύει τις απαιτήσεις σε Zn σε δεδομένες πειραματικές συνθήκες. ...	50
Εικόνα 10. Θεωρητική ανταγωνιστική γραμμική απόκριση μιας τυχαίας παραμέτρου κατάστασης ψευδαργύρου σε μεταβολές στη διατροφική συγκέντρωση του ψευδαργύρου (Zn) από 2 διαφορετικά είδη συμπληρώματος Zn. Σε αυτό το παράδειγμα, η παράμετρος (π.χ. φαινομενικά πεπτή χορήγηση Zn) εμφανίζει ένα πλατό σε απόκριση πάνω από τα διατροφικά όρια των 60 και 50 mg Zn/kg δίαιτας όταν χορηγούνται με ψευδάργυρο τύπου A (μαύρο) και B (γκρι) αντίστοιχα. Κάτω από το αντίστοιχο όριο, η απόκριση των παραμέτρων στις	

μεταβολές της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου από τους τύπους Α και Β μειώνεται ή αυξάνεται κατά 0,17 και 0,26/mg μείωσης ή αύξησης του διατροφικού Zn, αντίστοιχα..... 51



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Zn και αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα σε στελέχη βακτηρίων που απομονώθηκαν από ζώα .....	31
Πίνακας 2 Επίδραση του νανο-ψευδαργύρου (nZn) στην απόδοση των ζώων .....	54

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΚΑΙ Ο ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΣ ΣΤΑ ΖΩΑ

## 1.1 Ιστορική ανασκόπηση

Μετά την ανακάλυψη του ψευδαργύρου (Zn) ως απαραίτητου θρεπτικού συστατικού σε αρουραίους και ποντίκια, οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι τα ζώα εκτροφής χρειάζονται τον ψευδάργυρο στη διατροφή τους στη δεκαετία του 1930 και του 1940. Ο ψευδάργυρος προστέθηκε στη λίστα των απαραίτητων ιχνοστοιχείων το 1934 από τον Todd και τους συνεργάτες του, οι οποίοι προκάλεσαν πενία του στοιχείου σε επίμυες. Στα παραγωγικά ζώα καταδείχθηκε η πενία Zn για πρώτη φορά το 1955 σε χοίρους που έπασχαν από παρακεράτωση. Πιο συγκεκριμένα, η κλασική έρευνα των Tucker και Salmon ανέφερε ότι οι υψηλές τιμές ασβεστίου που καταναλώνονται από τους χοίρους οδήγησαν σε παρακεράτωση και μπορούσαν να θεραπευτούν προσθέτοντας περισσότερο Zn στη τροφή, οδηγώντας άλλους επιστήμονες να μελετήσουν το μεταβολισμό και τη φυσιολογία του Zn σε ζώα εκμετάλλευσης (Hill & Shannon, 2019).

Ο Underwood (1981) σημείωσε ότι υπάρχουν πολλά εδάφη με έλλειψη σε Zn στον κόσμο που έχουν ως αποτέλεσμα τα λιβάδια και οι σοδειές να έχουν χαμηλή περιεκτικότητα στο στοιχείο αυτό. Ως εκ τούτου, στα παραγωγικά ζώα υπάρχουν κλινικά συμπτώματα ανεπάρκειας του Zn, όπως η μειωμένη ανάπτυξη και όρεξη, οι βλάβες του δέρματος, η κακή ποιότητα της τρίχας, του μαλλιού και των φτερών καθώς και η κακή αναπαραγωγή. Ως στοιχείο, ο Zn είναι σχετικά μη τοξικός, ωστόσο μετά την κατάποση υψηλής δόσης Zn προκαλείται εμετός στο ζώο. Τα συμπτώματα εξαρτώνται από την πηγή Zn και το χρονικό διάστημα πρόσληψής του και μπορεί να περιλαμβάνουν αφυδάτωση, ανισορροπία ηλεκτρολυτών, κοιλιακό άλγος, ναυτία, λήθαργο, ζάλη και μυϊκή έλλειψη συντονισμού.

## 1.2 Σημασία ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος (Zn) είναι το δεύτερο πιο άφθονο ιχνοστοιχείο στο σώμα των ζώων. Δεν μπορεί να αποθηκευτεί στο σώμα (Zalwski et al., 2005) και απαιτεί τακτική λήψη του μέσω της διατροφής για την κάλυψη των φυσιολογικών αναγκών. Η σημασία του Zn για την υγεία των ζώων έχει τεκμηριωθεί πριν από πολλά χρόνια. Ως συστατικό πολλών ενζύμων και ορμονών, ο Zn είναι απαραίτητος για τη σωστή φυσιολογική λειτουργία του ζωικού οργανισμού. Ένζυμα τα οποία περιέχουν Zn είναι η αλκοολική αφυδρογονάση, η αλκαλική φωσφατάση (ALP), η αλδολάση, η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), οι RNA και DNA πολυμεράσες, η αντίστροφη μεταγραφάση, η καρβοξυπεπτιδάση A, B, G και η υπεροξειδική

δισμουτάση (SOD). Επιπλέον, ο Zn είναι απαραίτητος για τις φυσιολογικές λειτουργίες του σώματος όπως η φυσιολογική ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η σύνθεση του DNA, η κυτταρική διαίρεση και η γονιδιακή έκφραση (Zhao et al., 2014), η οστεοποίηση, η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του σώματος (Zhao et al., 2014, Parashuramulu, Nagalakshmi, Rao, Kumar, & Swain, 2015) μέσω της παραγωγής ενέργειας, η πρωτεϊνική σύνθεση, η προστασία μεμβρανών από βακτηριακές ενδοτοξίνες, η αντιγραφή λεμφοκυττάρων και η παραγωγή αντισωμάτων. Ο Zn είναι ένα συστατικό που συμβάλει στην συλλογή των ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά τη διάρκεια διαφορετικών φυσιολογικών διεργασιών (Zhao et al., 2014) και απαιτείται επίσης για τη φυσιολογική κατάσταση της επιδερμίδας, του επιθηλίου, του δέρματος και των σπλών. Ο Zn παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της ινσουλίνης. Ο ρόλος του Zn στην αναπαραγωγή των ζώων αποκαλύφθηκε όταν ο Mussill (1941) ανέφερε ότι η στειρότητα των δαμαλίδων αποδόθηκε σε ανεπαρκή ποσότητα Zn στον οργανισμό τους. Έτσι, ο Zn συμπληρώνεται τακτικά σε ζωοτροφές για να επιτυγχάνονται κανονικές φυσιολογικές λειτουργίες καθώς και για να καλύπτονται οι ημερήσιες ανάγκες του οργανισμού των ζώων.

Ο Zn βρίσκεται σε πολλές ζωοτροφές. Οι ζύμες αποτελούν καλή πηγή του στοιχείου. Τα πίτυρα και τα ενδοσπέρμια των καρπών έχουν μεγάλη περιεκτικότητα στο στοιχείο, λόγω της συσσώρευσης που παρουσιάζει σε αυτά τα σημεία. Τα προϊόντα ζωικής προέλευσης όπως το κρεατάλευρο και το ιχθυάλευρο είναι συνήθως πλουσιότερα των φυτικής προέλευσης πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων.

### 1.3 Απορρόφηση του ψευδαργύρου στον οργανισμό των ζώων

Ο ψευδάργυρος είναι ευρέα κατανεμημένος στο ζωικό οργανισμό, με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται στο ήπαρ, στα οστά, στους νεφρούς, στους μύες, στο πάγκρεας, στους οφθαλμούς, στον προστάτη, στο δέρμα, στο τρίχωμα και στο έριο. Τα πενικά ζώα παρουσιάζουν μεγαλύτερη από το κανονικό συγκέντρωση Zn στο δέρμα, στους όρχεις, στο όσχεο, στους νεφρούς, στους μύες, στην καρδιά, στους πνεύμονες και στον σπλήνα, καταδεικνύοντας τις εξειδικευμένες ανάγκες των διάφορων ιστών και οργάνων. Μια και ο Zn αποτελεί συστατικό πολλών ενζύμων η κατανομή του στους ιστούς σχετίζεται άμεσα με την κατανομή των ενζύμων στα οποία συμμετέχει. Η συγκέντρωση του στοιχείου στο αίμα κατανέμεται σε αναλογία 9:1 μεταξύ κυττάρων και πλάσματος. Στο πλάσμα είναι συνδεδεμένος ασθενικά με τις αλβουμίνες (1:3) και πιο στενά με τις γλοβουλίνες (2:3).

Ο ψευδάργυρος αποτελεί συστατικό πολλών μεταλλοενζύμων, όπως της καρβοανυδράσης, καρβοξυπεπτιδάσης A και B, πολλών αφυδρογονασών, της αλκαλικής φωσφατάσης, ριβονουκλεάσης και της DNA πολυμεράσης. Ο Zn ενεργοποιεί μερικά ένζυμα και συμμετέχει στη σύνθεση τμημάτων του DNA και RNA.

Οι φυσιολογικές δράσεις του ψευδαργύρου σχετίζονται με αυτές των ενζύμων των οποίων αποτελεί συστατικό. Είναι ενεργοποιητής πολλών μεταλλοενζυμικών συστημάτων και πιθανότατα μοιράζεται με άλλα μεταλλικά ιόντα, που μπορεί να αντικαταστήσει, την ικανότητα ένωσης του αντιδρώντος υποστρώματος με το ενεργό ένζυμο. Είναι απαραίτητος επίσης για τη σύνθεση και το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και αποτελεί συστατικό της ινσουλίνης και μέσω αυτού συμμετέχει στο μεταβολισμό των υδατανθράκων.

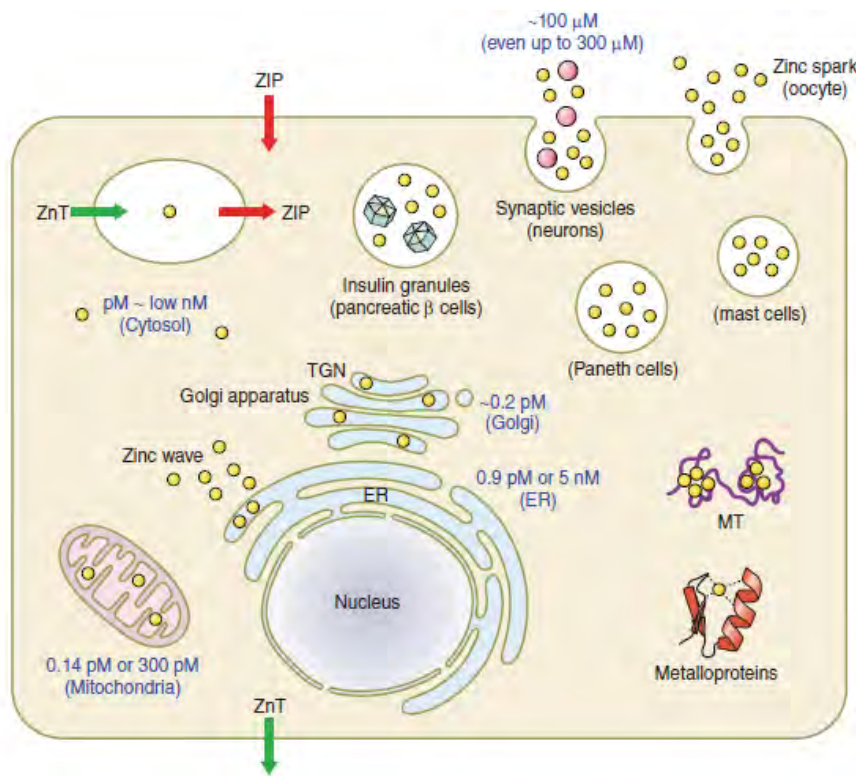
Απορροφάται από το λεπτό έντερο σε ποσοστό 5 έως 40 % της παρεχόμενης με την τροφή ποσότητας. Η απορρόφηση του Zn πραγματοποιείται με δύο τρόπους: ενεργός και παθητική μεταφορά. Η ενεργός μεταφορά πραγματοποιείται από συγκεκριμένους μεταφορείς και η αποτελεσματικότητά της αυξάνεται με την αύξηση της πρόσληψης Zn στη διατροφή. Η παθητική μεταφορά λειτουργεί με μηχανισμό διάχυσης και η αποτελεσματικότητά της είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του Zn στον εντερικό σωλήνα (Sloup, Jankovská, Nechybová, Peřínková, & Langroná, 2017). Η απορρόφηση του Zn σε κυτταρικό επίπεδο είναι μια διαδικασία εισόδου στο εντεροκύτταρο και ο Zn μέσω της βαστολικής μεμβράνης μεταφέρεται στο κυκλοφορικό σύστημα. Αυτή η διαδικασία διεξάγεται με τη χρήση αρκετών πρωτεϊνών γνωστών ως μεταφορείς ψευδαργύρου (Krebs, 2000).

Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση της απορρόφησης γίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Η μεταφορά από εκεί στο πλάσμα του αίματος γίνεται με τη βοήθεια της μεταλλοθειονίνης, μιας μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνης μεταφοράς που συντίθεται όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα του πλάσματος σε Zn. Η απορρόφηση επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση Ca στην τροφή και η παρουσία αλάτων του φυτικού οξέος την επιβαρύνει περαιτέρω, λόγω σχηματισμού αδιάλυτων και μη απορροφήσιμων συμπλόκων. Ο φώσφορος επίσης, δεσμεύει τον Zn, μειώνοντας την απορρόφησή του. Το παγκρεατικό υγρό αποτελεί τη βασική οδό έκκρισης ενδογενούς Zn. Σε κανονικές συνθήκες η απώλεια Zn από το ούρο είναι μικρή. Η μεταφορά μέσω του πλακούντα είναι ευθέως ανάλογη με το επίπεδο πρόσληψης από τη μητέρα. Σε ζώα που παρουσιάζουν έντονη εφίδρωση οι απώλειες μέσω του ιδρώτα μπορεί να είναι μεγάλες. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ζεστά κλίματα.

#### 1.4 Διανομή ψευδαργύρου του ψευδαργύρου στον οργανισμό των ζώων

Ο απορροφημένος Ζη μεταφέρεται στο πλάσμα που συνδέεται κυρίως με την αλβουμίνη (60-80%), λιγότερο με την  $\alpha$ -2-μακροσφαιρίνη και την τρανσφερίνη, αλλά επίσης δεσμεύεται με ελεύθερα αμινοξέα, ειδικά την ιστιδίνη και την κυστεΐνη. Ο δεσμευμένος Ζη σε πρωτεΐνες του πλάσματος είναι η πιο εύκολη διαθέσιμη παροχή Ζη στο σώμα, αν και αντιπροσωπεύει μόνο περίπου το 0,1% της συνολικής ποσότητας Ζη στο σώμα. Το αίμα περιέχει πέντε φορές περισσότερο Ζη από το πλάσμα. Στα ερυθροκύτταρα, το 80% του Ζη περιέχεται στη καρβονική ανυδράση και Ζη-δισμουτάση του υπεροξειδίου.

Ο Ζη που μεταφέρεται στο ήπαρ αργότερα απελευθερώνεται στο σώμα. Στα ηπατοκύτταρα, τα εντεροκύτταρα και άλλα κύτταρα, ο Ζη συγκρατείται επί των μεταλλοπρωτεϊνών. Οι μεταλλοπρωτεΐνες περιλαμβάνουν μεταλλοένζυμα, μόρια γονιδιακής ρύθμισης, πρωτεΐνες αποθήκευσης και μεταφορείς ψευδαργύρου. Ο Ζη στα ηπατοκύτταρα συνδέεται πρωτίστως με μεταλλοθειονίνες (MT) (Cousins, Liuzzi, & Lichten, 2006) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Κατανομή ψευδαργύρου στα κύτταρα. Οι μεταφορείς ZnT (πράσινα βέλη) και ZIP (κόκκινα βέλη) συντονίζονται για να ρυθμίζουν την κυτταρική ομοιόσταση του ψευδαργύρου. Η ολική συγκέντρωση του κυτταρικού ψευδαργύρου θεωρείται ότι είναι 10s-100s  $\mu$ M, αλλά σχεδόν όλα τα ιόντα ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) στο κυτταρόπλασμα είναι συνδεδεμένα με ένα

*πλήθος μεταλλοπρωτεϊνών και MT, ή απελευθερώνονται από ενδοκυτταρικά οργανίδια / κυστίδια μέσω των μεταφορέων ZnT ή ZIP, αντίστοιχα.*

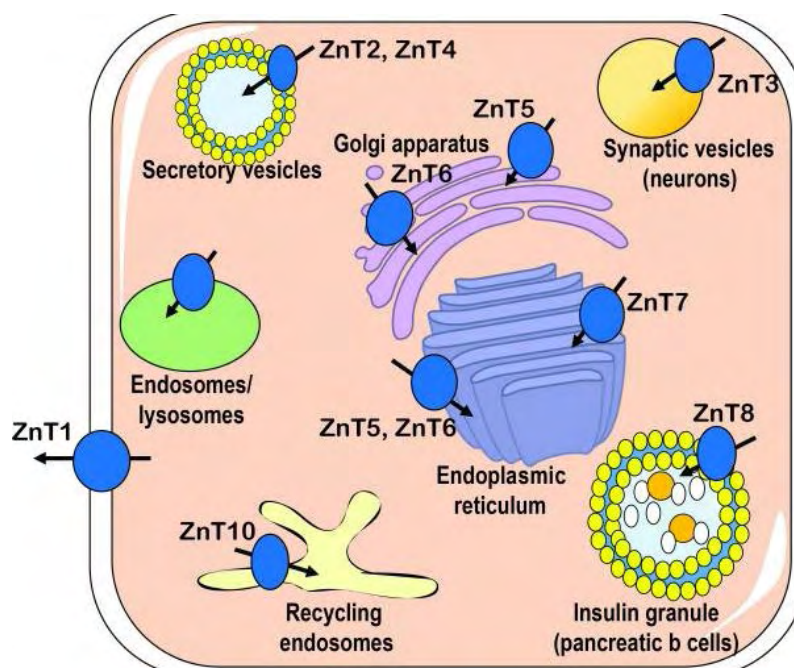
Το stress, μέσω της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών, μπορεί να αυξήσει τη συγκέντρωση ψευδαργύρου στο ήπαρ με ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης του στοιχείου στο πλάσμα. Πιθανολογείται ότι το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην αύξηση της σύνθεσης μεταλλοθειονίνης στο ήπαρ, η οποία αυξάνει το ποσό του Zn που βρίσκεται δεσμευμένο σε αυτή.

### **Μεταφορείς ψευδαργύρου**

Οι μεταφορείς ψευδαργύρου χωρίζονται σε δύο ομάδες: ZnT και ZIP (Εικόνα 2). Η ομάδα μεταφορέων ZnT εξάγει Zn από το κυτταρόπλασμα. Οι ZnT βρίσκονται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, το σύστημα Golgi, το ενδόσωμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τον ZnT-1, ο οποίος βρίσκεται στη μεμβράνη πλάσματος. Αυτή η πρωτεΐνη μεταφέρει τον Zn από το κύτταρο στον εξωκυτταρικό χώρο σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Επιπλέον, ο ZnT-2 μεταφέρει επίσης τον Zn από το κύτταρο, αλλά έχει την ικανότητα να τον μεταφέρει και σε κυστίδια αποθήκευσης στο κύτταρο (υπό συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων Zn στο κύτταρο). Αυτή η λειτουργία διεξάγεται κυρίως στα κύτταρα του παγκρέατος. Επιπλέον, βρίσκεται στο έντερο, στα νεφρά και στους όρχεις. Η δράση του ZnT-3 σχετίζεται με τη μεταφορά του Zn σε κυστίδια και η έκφρασή του περιορίζεται στον εγκέφαλο. Αυτό δείχνει τον σημαντικό ρόλο του Zn στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο ZnT-4 βρίσκεται στους αδένες και στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Ο ZnT-5 εντοπίζεται στα εκκριτικά κυστίδια του παγκρέατος και στη μεμβράνη των εντεροκυττάρων. Ο ZnT-10 εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Sloup et al., 2017)

Η ομάδα ZIP των μεταφορέων μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις υποομάδες: Zip I, Zip II, gufA και LZT. Οι περισσότερες πρωτεΐνες της ομάδας ZIP (Zip 4-8, Zip 10 και Zip 12-14) ανήκουν στην υποομάδα LZT. Το Zip 1-3 ανήκει στην υποομάδα ZIP II, το Zip 9 ανήκει στην υποομάδα ZIP I, και το Zip 11 είναι μέλος της υποομάδας gufA. Ο μεταφορέας ψευδαργύρου Zip 6 της υποομάδας LZT στη συνέχεια συμπεριλήφθηκε σε μια ξεχωριστή υποομάδα που φέρει την ένδειξη LIV-1 (Sloup et al., 2017). Βρέθηκε ότι ο ZIP ψευδάργυρος μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων από τον εξωκυτταρικό χώρο ή τα ενδοκυτταρικά κυστίδια. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, το Zip 7

βρίσκεται στο σύστημα Golgi. Το ZIP 14 κινητοποιείται στη μεμβράνη στα ηπατοκύτταρα στην περίπτωση οξείας φλεγμονής, αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση του Zn.



Εικόνα 2. Υποκυτταρικός εντοπισμός μεταφορέων ZnT στα θηλαστικά.

### Μεταλλοθειονίνη

Οι μεταλλοθειονίνες (MT) είναι μια ομάδα ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους. Η MT μπορεί να δεσμεύει κατιόντα δισθενούς μετάλλου, συμπεριλαμβανομένου του Zn και αποτελείται από 60-68 αμινοξέα, από τα οποία είκοσι είναι κυστεΐνες. Όλες οι MT χαρακτηρίζονται όχι μόνο από ένα υψηλό περιεχόμενο κυστεΐνης, αλλά και από τη δέσμευση μεταλλικών ιόντων με θειολικά άλατα και τη δημιουργία ομάδων κυστεΐνυλο-θειολικού (Adam et al., 2008).

Η MT εκτελεί πολλές λειτουργίες στο σώμα, το πολύ σημαντικό είναι η μεταφορά ιόντων βασικών μετάλλων και η αποτοξίνωση των τοξικών επιπέδων μεταλλικών ιόντων. Οι περισσότερες MT δεσμεύουν τον ψευδάργυρο.

## 1.5 Βιοδιαθεσιμότητα του Zn

Η απορρόφηση του Zn στο σώμα είναι πολύ μικρότερη και διαφέρει ανάλογα με την ηλικία του ζώου και τις θέσεις στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η καθαρή απορρόφηση του Zn που χορηγήθηκε ημερησίως ήταν διαφορετική στις ώριμες αγελάδες (12%), στους μόσχους 5 έως 12 μήνες (20%) και στους μόσχους ηλικίας εβδομάδας (55%). Στο σώμα των μηρυκαστικών, ο Zn απορροφάται κυρίως από το τελευταίο τμήμα του στομαχιού (abomasum) και το χαμηλότερο σημείο του λεπτού εντέρου. Η απορρόφηση στο άκρο του παχέος εντέρου (τυφλό έντερο) είναι ασήμαντη και η έκκριση ενδογενούς Zn προέκυψε από το άνω μέρος του λεπτού εντέρου (Swain, Rao, Rajendran, Dominic, & Selvaraju, 2016). Ο Zn μπορεί να ενσωματωθεί στη διατροφή με τη μορφή ανοργάνων αλάτων όπως το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) και ο θειικός ψευδάργυρος (ZnSO<sub>4</sub>) και ως αμινοξέων και οργανικών αλάτων σε χηλική μορφή όπως για παράδειγμα ο προπιονικός Zn (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>Zn) και ο οξικός Zn [Zn(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]. Παρόλο που η βιοδιαθεσιμότητα του Zn από οργανικές πηγές είναι υψηλότερη από εκείνη των ανόργανων αλάτων Zn, η χρήση οργανικού Zn σε χηλική μορφή σε σιτηρέσια για ζώα είναι περιορισμένη λόγω του υψηλότερου κόστους (Zhao et al., 2014). Τα υψηλότερα επίπεδα Zn που εκκρίνονται από τα ζώα που τρέφονται με συμπληρώματα διατροφής με ψευδάργυρο έχουν προκαλέσει ανησυχίες σχετικά με τη ρύπανση του περιβάλλοντος (Feng, Wang, Zhou, & Ai, 2009a). Έτσι, το πρόβλημα αυτό ανοίγει ένα παράθυρο για καλύτερα διαθέσιμες πηγές Zn και αν είναι δυνατόν, να μειωθεί η συμπληρωματική δόση του Zn στην τροφή των ζώων. Μεταξύ όλων των πιθανών προσεγγίσεων, η χρήση της νανοτεχνολογίας για την παραγωγή νανο-μεγέθους Zn που ονομάζεται νανο-Zn (nZn) είναι μια πιθανή εναλλακτική λύση τόσο στις οργανικές όσο και στις ανόργανες πηγές Zn. Η χρήση του nZn έχει αποδειχθεί ότι παράγει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις συμβατικές πηγές Zn και επίσης ο μικρό-Zn (μZn) και είναι επίσης λιγότερο τοξικός (Swain et al., 2016).

## 1.6 Μεταβολικός μηχανισμός και ρόλος

Ο ψευδάργυρος μπορεί να βρεθεί σε όλο το σώμα και χρησιμεύει ως συστατικό σε πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στη μεταγραφή, σε ενδο- και διακυτταρικά σήματα για το μηχανισμό μεταγραφής κυττάρων, ως φορείς πρωτεϊνών στη δέσμευση αμινοξέων για να διατηρήσουν τη δομή κλπ. Στα ένζυμα, ο Zn εμπλέκεται στη δομή καθώς και στη διαχείριση της δραστηριότητας του ενζύμου και είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητος για τη μεταφορά βιταμίνης Α. Ο ψευδάργυρος διεγείρει την παραγωγή μεταλλοθειονίνης (MT) που χρησιμεύει ως θέσεις αποθήκευσης και αποτοξίνωσης και παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις Cu / Zn. Στη



συνέχεια παρουσιάζονται ο μεταβολικός ρόλος του Zn στις βασικές κατηγορίες ζώων στις οποίες χορηγούνται ζωοτροφές (Hill & Shannon, 2019).

### **Πρόβατα**

Ο ψευδάργυρος έχει πολλούς ρόλους στην ανοσία και την αντοχή στις ασθένειες. Οι Droke & Spears (1993) ανέφεραν ότι πρόβατα που τράφηκαν με μια διατροφή με έλλειψη σε Zn, παρουσίασαν μειωμένη βλαστογόνο απόκριση σε ένα μιτογόνο T κυττάρου και αυξημένη απόκριση σε ένα T-εξαρτώμενο μιτογόνο B-λεμφοκυττάρων. Τα πρόβατα είχαν χαμηλότερο ποσοστό λεμφοκυττάρων και υψηλότερο ποσοστό ουδετερόφιλων.

Το εργαστήριο του Beeson ήταν το πρώτο που καθόρισε την απαίτηση Zn για τα πρόβατα χρησιμοποιώντας ειδικές ζωοτροφές. Τα πρόβατα φαίνεται να απαιτούν διπλάσια ποσότητα Zn για την παραγωγή μαλλιού καλής ποιότητας και υψηλή γονιμότητα (Hill & Shannon, 2019).

### **Βοοειδή**

Όπως αναμενόταν, τα βοοειδή απαιτούν Zn για επαρκείς αποδόσεις αλλά η υπερβολική ποσότητα Zn οδήγησε στο θάνατο μόσχων που τους χορηγήθηκε (περίπου 1,5 έως 2,0 g / ημέρα) με συνολική δόση 30 έως 66 g Zn.

Σε μία έρευνα των Graham et al., 1991, τα βοοειδή εμφάνισαν βελτιωμένες ιδιότητες όπως αύξηση του βάρους τους, όταν τους χορηγήθηκαν ζωοτροφές εμπλουτισμένες με Zn. Ωστόσο, η χορήγηση υψηλότερων επιπέδων Cu, Co, Mn και Zn σε σχέση με τις συνιστώμενες ποσότητες, μείωσαν την αναπαραγωγική τους απόδοση. Όταν περισσότερα από 700 ppm Zn χορηγήθηκαν σε μόσχους, η απόδοσή τους μειώθηκε. Οι μόσχοι που τράφηκαν με 706 ppm Zn εμφάνισαν αύξηση στα τετμημένα ουδετερόφιλα και μείωση των ηωσινοφίλων, του χρόνου προθρομβίνης και του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (Graham et al., 1991).

Οι Wright & Spears (2003) διαπίστωσαν ότι τα βοοειδή της φυλής Holstein είχαν παρόμοιες επιδόσεις με το θειικό και πρωτεϊνικό Zn όταν χορηγήθηκε σε ποσότητα 20 ppm Zn. Ωστόσο, όταν χορηγήθηκε ποσότητα 500 ppm από αυτές τις δύο πηγές, οι συγκεντρώσεις του Zn ήταν υψηλότερες στο δωδεκαδακτυλικό, στον ηπατικό και στο νεφρικό ιστό με την πηγή Zn που προέρχονταν από πρωτεΐνες. Το τοίχωμα των σπλών των ζώων περιείχε τρεις φορές περισσότερο Zn από το κάτω μέρος των σπλών και τα ζώα που έλαβαν θειικό άλας του

ψευδαργύρου εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτά που έλαβαν πρωτεϊνικό Zn. Για συγκριτικούς λόγους, όταν στα βοοειδή χορηγήθηκαν αυτές οι δύο πηγές Zn και ένα σιτηρέσιο που δεν περιείχε Zn, βρέθηκε ότι ο Zn που λάμβαναν τα βοοειδή τους πρόσφερε καλύτερη εμφάνιση, υψηλότερη απόδοση, ποιότητα, και λίπος στο παραγόμενο γάλα ανεξάρτητα από την πηγή Zn σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (Spears & Kegley, 2002).

Η αύξηση του συμπληρώματος Zn στη διατροφή των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων οδήγησε σε αύξηση του Zn στο γάλα ανεξάρτητα από το ποσοστό εμπλουτισμού των ζωοτροφών σε Zn. Έτσι, όταν χορηγήθηκαν 2000 ppm Zn σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η απόδοση γάλακτος και η πρόσληψη τροφής μειώθηκαν και το γάλα καθώς και το πλάσμα περιείχαν υψηλές ποσότητες Zn. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν με τη χορήγηση μικρότερης ποσότητας (1000 ppm) Zn στις αγελάδες.

Ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτηριστικό, το θανατηφόρο χαρακτηριστικό A46, εμφανίζεται στις φυλές βοοειδών Holstein και Shorthorn και οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα απορρόφησης του Zn. Οι μόσχοι με αυτό το κληρονομικό χαρακτηριστικό έχουν έναν αποδεκτό αριθμό λειτουργικών λεμφοκυττάρων κατά τη γέννησή τους, αλλά καθώς τα ζώα αναπτύσσονται παρουσιάζουν έλλειψη Zn και η δραστηριότητα των λεμφοκυττάρων μεταβάλλεται ( Hill & Shannon, 2019).

### **Χοίροι**

Εμφανή συμπτώματα ανεπάρκειας Zn στους χοίρους δεν παρατηρούνται όταν αυτά διατρέφονται με τυπικές δίαιτες που καλύπτουν τις ελάχιστες απαιτήσεις.

Οι Hoekstra, Falti, Lin, Robers, & Grummer (1967) ανέφεραν ότι όταν προστέθηκαν 100 ppm Zn σε μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ασβέστιο Ca (1,6%) για χοιρομητέρες, αυξήθηκε ο αριθμός των ζώντων γεννηθέντων χοιριδίων και η ποσότητα του Zn στον ορό, στο ήπαρ και στα οστά των απογόνων. Η διατροφική ανεπάρκεια του Zn στα θηλυκά κατά την αναπαραγωγική περίοδο και συγκεκριμένα στο τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη διάρκεια κύησης και τοκετό με χαμηλή βιωσιμότητα των απογόνων και με ανώμαλο οστικό ιστό.

Από το 1967, οι Ullrey, Miller, Brent, Bradley, & Hoefler (1967) ανέφεραν ότι οι συγκεντρώσεις Zn στον ορό κυμαίνονταν από 54 έως 141  $\mu\text{g} / 100 \text{ ml}$ . Οι Hill, Miller, Whetter, & Ullrey (1983) σημείωσαν ότι οι χοίροι που προέρχονταν από χοιρομητέρες που δεν είχαν λάβει κάποιο σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με Zn είχαν συγκέντρωση 52 ppm Zn στο ήπαρ τους, ενώ οι χοίροι

που προέρχονταν από χοιρομητέρες που τους χορηγήθηκε ζωοτροφή εμπλουτισμένη με 5000 ppm Zn, εμφάνισαν συγκέντρωση 1300 ppm Zn, αντίστοιχα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι χοιρομητέρες που διατράφηκαν με συμπλήρωμα ζωοτροφής συγκέντρωσης 0, 50 ή 500 ppm Zn, έδωσαν απογόνους οι οποίοι στην ηλικία των 21 ημερών εμφάνισαν αυξημένη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ σε σύγκριση με αυτούς που προέρχονταν από χοιρομητέρες που είχαν λάβει συμπλήρωμα 5000 ppm Zn.

Αρκετοί ερευνητές ανέφεραν ότι το οξείδιο του Zn που απορροφάται ελάχιστα, όταν χορηγείται σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις, διεγείρει την ανάπτυξη και μειώνει την ανάπτυξη στελεχών του βακτηρίου *Escherichia coli* στον οργανισμό. Οι Smith, Tokach, Goodband, Nelssen, & Richert (1997) έδειξαν ότι οι χοίροι που απογαλακτίστηκαν σε ηλικία περίπου 15 ημερών είχαν βελτιωμένη μέση ημερήσια αύξηση (ADG) όταν ελάμβαναν 3000 ppm Zn από οξείδιο του Zn. Οι Hill et al. (2000) ανέφεραν ότι πρώιμοι απογαλακτισμένοι (12 ημέρες) ή τυπικά απογαλακτισμένοι χοίροι (25 ημέρες) χρειάστηκαν 3000 ppm Zn ως οξείδιο για τουλάχιστον 2 εβδομάδες αμέσως μετά τον απογαλακτισμό για να επιτευχθεί η αυξημένη απόδοσή τους.

Οι Rincker, Hill, Link, Meyer, & Rowntree (2005) έδειξαν ότι όταν χοίροι έλαβαν 2000 ppm Zn είτε ως οξείδιο Zn είτε με μεθειονίνη, ο ρυθμός απέκκρισης μέσω των κοπράνων δεν αυξήθηκε μέχρις ότου τα όργανα φορτώθηκαν με Zn για περίπου 14 ημέρες. Όταν συγκρίθηκαν πέντε πηγές οργανικού Zn, οι οποίες χορηγήθηκαν σε συγκέντρωση 500 και 2000 ppm σε χοίρους [129], η μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής (ADFI) και η μέση ημερήσια αύξηση (ADG) ήταν μεγαλύτερες στα ζώα με συμπλήρωση διατροφής συγκέντρωσης 2000 ppm Zn.

Παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση των GLO1, PRDX4 και ACY1 mRNA στο ήπαρ χοίρων που τρέφονται με Zn και συγκεκριμένα οι τιμές ήταν υψηλότερες σε χοίρους που τράφηκαν με 1000 ή 2000 ppm Zn έναντι 150 ppm (Martínez-Montemayor et al., 2008). Ίσως, αυτή είναι μια ένδειξη του τρόπου με τον οποίο η λειτουργία των κυττάρων και η υγεία επηρεάζονται από τη συμπλήρωση της διατροφής με Zn. Η διατροφή υψηλών επιπέδων διατροφικού ψευδαργύρου μετά από μια εβδομάδα μπορεί να μη βελτιώνει την απόδοση των χοίρων καθώς παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης mRNA των μεταφορέων ψευδαργύρου (ZIP4), τα οποία εξασθένησαν την ομοίωση του ψευδαργύρου (Martin, Pieper, Vahjen, & Zentek, 2013). Αυτή η θεωρία υποστηρίζεται από την έρευνα των Pieper et al. (2015) που αναφέρουν ότι τα πεπτικά ένζυμα (αλφααμυλάση, λιπάση, τρυψίνη και χυμοθρυψίνη) και η αντιοξειδωτική ικανότητα (TEAC ή αντιοξειδωτική ικανότητα

ισοδύναμου Trolox) στο πάγκρεας χοίρων αυξήθηκαν όταν οι χοίροι χορηγήθηκαν με υψηλό διαιτητικό ψευδάργυρο (2425 mg/kg).

Οι Gowanlock, Mahan, Jolliff, & Hill (2015) έδειξαν ότι οι αναπτυσσόμενοι χοίροι μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες τους σε Cu, Fe και Mn με συνήθη σιτηρέσια που βασίζονται στο καλαμπόκι και το σογιάλευρο. Ωστόσο, ο Zn πρέπει να χορηγηθεί ως συμπλήρωμα. Διαπίστωσαν επίσης ότι η πρωτεΐνη MT του ήπατος και του δωδεκαδακτύλου αυξήθηκε, καθώς αυξήθηκαν τα μεταλλικά στοιχεία στη διατροφή. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταφορείς μεταλλοθειονίνης και Zn εκφράζονται στα δωδεκαδακτυλικά κύτταρα του βλεννογόνου (Feldrausch, Weber, Hill, Link, & Mahan, 2013).

### **Πτηνά**

Τα συμπτώματα της ανεπάρκειας Zn στα πτηνά περιλαμβάνουν μειωμένη ανάπτυξη, λέπτυνση των οστών, κακή ανάπτυξη φτερών και γρήγορη και έντονη αναπνοή. Το φυτικό οξύ που υπάρχει σε πολλές τροφές φυτικής προέλευσης καθιστά τον Zn λιγότερο διαθέσιμο σε μη μηρυκαστικά ζώα και για αυτό το λόγο το ένζυμο, φυτάση, χρησιμοποιείται σε δίαιτες.

Έρευνες ανέφεραν ότι οι νεοσσοί που έλαβαν υψηλές συγκεντρώσεις Zn είχαν MT στο ήπαρ, στα νεφρά, στο πάγκρεας και στο βλεννογόνο του εντέρου. Όταν τα πτηνά που τρέφονταν με υψηλές δίαιτες Zn, άλλαξαν τη διατροφή τους σε δίαιτες με χαμηλά επίπεδα Zn, δεν υπήρχε πλέον ο Zn στη μεταλλοθειονίνη (MT) δείχνοντας το ρόλο της MT στην ομοιοστάση του Zn.

Οι Wang, Fosmire, Gay, & Leach (2002) διαπίστωσαν ότι η ανεπάρκεια Zn στους νεοσσοί έχει άμεση επίδραση στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση στα χονδροκύτταρα της ανάπτυξης των οστών. Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης μειώνεται κατά τη διάρκεια της ανεπάρκειας Zn στα οστά της γαλοπούλας. Οι Bettger, Savage, & O'Dell (1981) έδειξαν την επίδραση του Zn στον μεταβολισμό του νερού στα κύτταρα κατά τη μελέτη της έλλειψης Zn στον οργανισμό.

Οι σχετικά μεγάλες ποσότητες σε Zn (1000 ppm) που ελήφθησαν από τη ζωοτροφή αξιολογήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στη συγκέντρωση ανίχνευσής τους στους ιστούς των ορνιθίων. Οι συγκεντρώσεις του Zn ήταν μεγαλύτερες στα οστά, στο πάγκρεας, στα νεφρά και στο συκώτι. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις του Zn (3000 έως 4000 ppm) μπορεί να επηρεάσουν την έκκριση της ορμόνης από την αδenoϋπόφυση, τα επινεφρίδια και τα εξωκρινικά και ενδοκρινικά τμήματα του παγκρέατος. Μετά από 2

εβδομάδες χορήγησης επαρκούς ποσότητας Zn, οι λειτουργίες αυτών των οργάνων επέστρεψαν στο φυσιολογικό επίπεδο.

Οι ορνίθες χρειάζονται περίπου 65 ppm Zn και 4,0% Ca για την παραγωγή φυσιολογικών νεοσσών. Χωρίς τη συμπλήρωση με Zn, οι νεοσσοί που θα εκκολαφθούν με έλλειψη Zn θα είναι αδύναμοι και ανίκανοι να σταθούν, να τρώνε και να πίνουν. Η ποσότητα του Zn στις όρνιθες αναπαραγωγής επηρεάζει την εκκόλαψη και η συμπλήρωση της διατροφής με Zn κατά τη διάρκεια της επώασης επηρεάζει την ανάπτυξη και λειτουργικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος (Cui, Peng, Junliang, & Guang, 2004).

### **Ίπποι**

Δεδομένου ότι τα περισσότερα άλογα χρησιμοποιούνται ως ζώα αναψυχής και όχι για παραγωγή κρέατος και αγροτικές εργασίες, υπάρχει περιορισμένη έρευνα σχετικά με τις ανάγκες τους σε Zn. Η σύσταση του NRC για ποσότητα των 9 ppm Zn δεν φαίνεται να προκαλεί οστεοχόνδρωση στις βραχυπρόθεσμες μελέτες που έχουν ολοκληρωθεί. Οι Ott & Asquith (1989) ανέφεραν ότι η συμπλήρωση των ζωοτροφών με ανόργανα ιχνοστοιχεία (Fe, Zn, Mn, Cu) είναι πιθανόν απαραίτητη, εάν η διατροφή τους είναι χαμηλότερη από τις συστάσεις του NRC (40 ppm).

## 1.7 **Ανεπάρκεια Zn**

Το πλέον καταφανές σύμπτωμα της πενίας Zn είναι η καθυστέρηση στην ανάπτυξη και η ανορεξία, που καταγράφηκε σε όλα τα είδη των παραγωγικών ζώων, καθώς και η μείωση των επιπέδων Zn και αλκαλικής φωσφατάσης στο αίμα. Πύκνωση ή υπερπαρακερατινοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων είναι συνήθης, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στην παρακεράτωση στους χοίρους.



*Εικόνα 3. Παρακεράτωση σε χοίρο από έλλειψη Zn.*

Στους αρουραίους παρατηρούνται ρωγμές στα νύχια και ουλές στα άκρα, ακατάστατο τρίχωμα και αλωπεκία. Στα πρόβατα επισυμβαίνουν αλλαγές στην ποιότητα του ερίου και των κεράτων, ενώ στα πτηνά η πτεροφυΐα δεν είναι κανονική και παρατηρούνται και περιστατικά δερματίτιδας.

Η έλλειψη Zn προκαλεί καθυστέρηση στο σχηματισμό των οστών και σχετίζεται με μειωμένη διαίρεση και πολλαπλασιασμό των χόνδρων στις επιφύσεις. Η αλκαλική φωσφατάση των οστών μειώνεται και κατά συνέπεια και η πυκνότητα των οστών, καθώς και η συγκέντρωση του Zn στα οστά και το ήπαρ.

Όρνιθες που ελάμβαναν σιτηρέσιο πτωχό σε Zn για μακρύ χρονικό διάστημα δεν έδειξαν κάποιες ανωμαλίες, αλλά οι νεοσσοί που προήλθαν από αυτές είχαν μικρή βιωσιμότητα και υψηλά ποσοστά δυσμορφιών. Νεοσσοί που προήλθαν από όρνιθες που ελάμβαναν επαρκή ποσότητα Zn, αλλά στη συνέχεια διατράφηκαν με σιτηρέσιο πτωχό σε Zn, παρουσίασαν συμπτώματα παρόμοια με της πύρωσης. Τα προβλήματα αυτά ξεπεράστηκαν όταν στους νεοσσούς δόθηκε μαζί με το ελλειμματικό σιτηρέσιο ιστιδίνη ή ισταμίνη, χωρίς όμως να έχει κατανοηθεί ο μηχανισμός προστασίας.

Προβατίνες που ελάμβαναν σιτηρέσιο ελλειμματικό σε Zn κατά τη διάρκεια της κυοφορίας και της γαλουχίας παρουσίασαν χαμηλή περιεκτικότητα του στοιχείου στο πλάσμα και το έριο, ενώ οι αμνοί τους εκδήλωσαν συμπτώματα πενίας σε ηλικία 6 εβδομάδων.

Η έλλειψη Zn έχει δραματική επίδραση στο αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού. Παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη των γονάδων σε όλα τα είδη καθώς και της ανάπτυξης των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλλου. Σε νεαρά ζώα είναι δυνατόν να αποκατασταθεί το μέγεθος των όρχεων και η παραγωγή σπέρματος εάν δοθεί πολύ μεγάλη ποσότητα Zn.

Η επούλωση των πληγών καθυστερεί σημαντικά σε πενικά ζώα. Αν και δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός θεωρείται ότι οφείλεται στο ρόλο που διαδραματίζει ο Zn στη σύνθεση των πρωτεϊνών.

## 1.8 Τοξικότητα

Η ανοχή σε υπερβάλλουσες ποσότητες Zn είναι μεγάλη. Παρόλα αυτά είναι δυνατή η πρόκληση τοξίκωσης εάν η χορηγούμενη ποσότητα είναι ιδιαίτερα μεγάλη (π.χ. 4 έως 8 g/kg τροφής).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο Zn είναι σχετικά ασφαλής για το ίδιο το ζώο μέχρι συγκεντρώσεις περίπου 500 mg/kg ξηράς ουσίας και 25-30 mg/kg ξηράς ουσίας ανάλογα με το στάδιο απογαλακτισμού του κάθε ζώου. Σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 500 mg Zn/kg dm, ο Zn έχει αρνητική επίδραση στην απορρόφηση χαλκού (Cu) και σιδήρου (Fe), οδηγώντας σε συμπτώματα ανεπάρκειας αυτών των ιχνοστοιχείων (Cu ή Fe). Εκτός από την οξεία δηλητηρίαση, μια χρόνια υπερφόρτωση Zn οδηγεί επίσης σε εκφυλιστικές διεργασίες και συσσώρευση Zn στο ήπαρ, στα νεφρά και στο πάγκρεας προκαλώντας προβλήματα υγείας. Τα υψηλά επίπεδα του Zn επηρεάζουν επίσης το μεταβολισμό των ερυθρών κυττάρων, πιθανώς μέσω μιας τοξικής επίδρασης στους μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με τα ισχύοντα πρότυπα διατροφής και διαχείρισης στην Ευρώπη, περισσότερο από το 50% των βοοειδών γαλακτοπαραγωγής κάτω των 75 ημερών βρέθηκε να έχει περιεκτικότητα Zn στο σκώτι άνω των 500 mg Zn/kg dm η οποία θεωρείται επιβλαβής για την υγεία των ζώων (Goselink & Jongbloed, 2012).

Σε αρουραίους παρατηρήθηκε αναιμία, ανάρρωση της ανάπτυξης και θάνατος. Σε χοίρους εμφανίζεται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, δυσκαμψία, αιμορραγία στην περιοχή των αρθρώσεων και εκτεταμένη αναρρόφηση των οστών. Τα πτηνά εμφανίζουν παρόμοια ευαισθησία με τους χοίρους απέναντι στην υπερδοσολογία Zn σε αντίθεση με τα μηρυκαστικά που έχουν πολύ μικρότερη ανοχή. Στα τελευταία παρατηρείται μειωμένη όρεξη για πρόσληψη τροφής. Τα ζώα μασούν το έριο ενώ αυξάνουν κατακόρυφα την κατανάλωση πλακών λείξης. Η μειωμένη ανεκτικότητα οφείλεται στην αρνητική επίδραση που έχει ο Zn στην μικροχλωρίδα των προστομάχων.

Μια και η αναιμία που προκαλείται από υπερέπάρκεια Zn μπορεί να προληφθεί από τη χορήγηση επιπλέον ποσότητας Cu και Fe, έχει θεωρηθεί ότι ουσιαστικά αποτελεί εκδήλωση πενίας των δύο τελευταίων στοιχείων, ως αποτέλεσμα της μειωμένης απορρόφησής τους από τον πεπτικό σωλήνα.

Πολλοί παράγοντες ευνοούν την εμφάνιση τοξίκωσης από Zn. Σε αυτούς περιλαμβάνονται ο μόλυβδος που υπάρχει στις ζωοτροφές, η έλλειψη χαλκού, η οριακή λήψη σεληνίου καθώς και η περιορισμένη πρόσληψη ασβεστίου. Η πρωτεΐνη σόγιας μειώνει τα αρνητικά αποτελέσματα συγκρινόμενη με την καζεΐνη, λόγω της ύπαρξης αλάτων φυτικού οξέος.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΣΤΑ ΖΩΑ

### 2.1 Δυνητικός ρόλος του Zn ως ιχνοστοιχείο στα ζώα

Οι κύριες πηγές ζωοτροφών για τη διατροφή των ζώων είναι φυτικές. Στην περίπτωση των μονογαστρικών ειδών, αυτό σημαίνει ότι η βιοδιαθεσιμότητα των ιχνοστοιχείων είναι χαμηλή. Σε μια πρόσφατη μελέτη, η χρήση διατροφής που περιλάμβανε αραβόσιτο χωρίς τη χρήση συμπληρώματος ψευδαργύρου (φυσική περιεκτικότητα σε Zn: 28 mg/kg) σε απογαλακτισμένα χοιρίδια προκάλεσε μέσες ημερήσιες απώλειες Zn του σώματος μέσω περιττωματικής αποβολής 2,7 mg/kg τροφής (Brugger & Windisch, 2015). Ως εκ τούτου, είναι αναπόφευκτο να χρησιμοποιηθούν συμπληρώματα ιχνοστοιχείων στην διατροφή των ζώων. Λόγω της αβεβαιότητας όσον αφορά την βιοδιαθεσιμότητα των ιχνοστοιχείων, χρησιμοποιούνται μεγάλα περιθώρια ασφαλείας που ξεπερνούν τις απαιτήσεις ώστε να αντισταθμιστούν οι διακυμάνσεις της διατροφικής προσφοράς και της φυσιολογικής κατάστασης (NRC, 2006; NRC, 2012). Για παράδειγμα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση επιτρέπεται μια συνολική περιεκτικότητα σε ψευδάργυρο 150 mg/kg σε μικτές ζωοτροφές (European Union, 2005), η οποία αντιστοιχεί σε 2,5 φορές μεγαλύτερη περιεκτικότητα από τις απαιτήσεις ψευδαργύρου για την ανάπτυξη των χοιριδίων (60 mg/kg) σύμφωνα με το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (NRC, 2012). Εξετάζοντας ορισμένες πρακτικές διατροφής στα μονογαστρικά ζώα, ειδικά όσον αφορά τον ψευδάργυρο, η χρήση πολύ υψηλότερων ποσοτήτων φαίνεται να είναι διαδεδομένη ευρέως. Τέτοιες αποκαλούμενες «φαρμακολογικές δόσεις» έχουν δειχθεί ότι παρουσιάζουν θετική επίδραση στην εμφάνιση διάρροιας στα χοιρίδια (Højberg, Canibe, Poulsen, Hedemann, & Jensen, 2005). Ακόμα, ήταν προφανείς οι δράσεις ενίσχυσης της ανάπτυξης (Smith, Tokach, Goodband, Nelssen, & Richert, 1997; Byun et al., 2018). Ο μηχανισμός δράσης οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη βακτηριοκτόνο φύση των υψηλών δόσεων του Zn. Η αυξημένη περιεκτικότητα ψευδαργύρου εντός του γαστρεντερικού σωλήνα συσχετίζονται με τη μείωση της αφθονίας παθογόνων βακτηρίων και την αυξημένη διαθεσιμότητα διαλυτών θρεπτικών ουσιών στο έντερο (Vahjen, Pietruszyńska, Starke, & Zentek, 2015; Starke, Zentek, & Vahjen, 2013). Τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανή μόνο για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα (~ 2 εβδομάδες) στα πρώτα στάδια του απογαλακτισμού και εξαφανίζονται στην περαιτέρω πορεία της εκτροφής χοιριδίων.

### 2.1.1 Οργανικές και ανόργανες πηγές Zn

Οι συνιστώμενες ποσότητες Zn που ενσωματώνονται στις ζωοτροφές μπορεί να προέρχονται από ανόργανες ή οργανικές πηγές. Η κύρια διαφορά μεταξύ αυτών των πηγών είναι ότι οι ανόργανες ενώσεις δεν έχουν άνθρακα. Ωστόσο, οι οργανικές ενώσεις περιέχουν πάντα άνθρακα και έχουν δεσμούς άνθρακα-υδρογόνου (C-H).

Τα ανόργανα άλατα, όπως τα θειικά άλατα και τα οξείδια, συνήθως ενσωματώνονται στις ζωοτροφές πάνω από τις συνιστώμενες απαιτήσεις για τη βελτίωση των ζωοτροφών και τη μεγιστοποίηση των επιδόσεων παραγωγής (Abd El-Hack et al., 2017): το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO), περιέχει 72-75% Zn και το μονοένυδρο θειικό άλας του ψευδαργύρου ( $ZnSO_4 \cdot H_2O$ ) 36% Zn. Το μεγαλύτερο μέρος (80-90%) του Zn που χρησιμοποιείται στις ζωοτροφές προέρχεται από το ZnO, το οποίο είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμο από το θειικό Zn. Ωστόσο, το θειικό (όξινο άλας) είναι περισσότερο υδατοδιαλυτό, επιτρέποντας στα δραστικά ιόντα μετάλλων να προάγουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Αυτό μπορεί να υποστηρίξει τις χημικές αντιδράσεις που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση των βιταμινών και τελικά την υποβάθμιση των λιπαρών και των αιθέριων ελαίων, μειώνοντας την διατροφική αξία των ζωοτροφών. Τα οξείδια είναι λιγότερο δραστικά, αλλά είναι και πάλι λιγότερο βιοδιαθέσιμα. Οι οργανικές πηγές, για παράδειγμα η χηλική ένωση ψευδαργύρου με μεθειονίνη ή ο προπιονικός ψευδάργυρος, είναι πιο βιοδιαθέσιμες πηγές από τις ανόργανες (Rahman, Wahed, Fchs, Bayuı, & Alvarez, 2002) και μπορούν να δώσουν καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την υγεία και την απόδοση των ζώων.

Γενικότερα, οι Jahanian, R., Nassirimoghaddam, H., Rezaei & Haghparast (2008) ανέφεραν υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα των πηγών οργανικού Zn από αυτές των ανόργανων μορφών (οξείδιο και θειικό άλας). Οι πηγές οργανικών Zn έχουν καταστεί συστατικό σε πιο σύγχρονες τροφές που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ζωοτροφών. Οι Abd El-Hack et al. (2017) διαπίστωσαν ότι οι ζωοτροφές πτηνών που εμπλουτίστηκαν με τη χηλική ένωση ψευδαργύρου με μεθειονίνη (Zn-Met) που αντικατέστησε ανόργανες πηγές αύξησαν την ανοσοαπόκριση των ζώων έναντι της λοιμώδους βρογχίτιδας και άλλων λοιμώξεων (Newcastle disease). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν προστέθηκαν Zn-Met ή Zn-Lys στις δίαιτες ορνιθίων πάχυνσης (Jahanian & Rasouli, 2015), επιδεικνύοντας μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των πηγών. Ο οργανικός Zn έχει οφέλη και από περιβαλλοντική άποψη. Βοηθά στην ελαχιστοποίηση των επιπέδων Zn στο περιβάλλον λόγω της υψηλής βιοδιαθεσιμότητάς του, η οποία επιτρέπει καλύτερη απορρόφηση και αξιοποίηση των θρεπτικών ουσιών στο ζώο, επιτρέποντας χαμηλότερα επίπεδα τροφής και

μειωμένη απέκκριση χωρίς να επηρεάζεται η απόδοση (Mohammadi, Ghazanfari, Mohammadi-Sangcheshmeh, & Nazaran, 2015).

Πολλοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει οργανικό Zn σε ζωοτροφές ορνιθίων κρεοπαραγωγής και διαπίστωσαν αύξηση σωματικού βάρους. Υψηλότερη βιολογική αποτελεσματικότητα του Zn-Met ως προς την αύξηση της ανάπτυξης των ζώων παρατηρήθηκε όταν ο Zn συνδυάζεται με φυτικές ίνες σε βασικές δίαιτες. Οι Jahanian, R., Nassirimoghaddam, H., Rezaei & Haghparast (2008) διενήργησαν μια πειραματική δοκιμή για να διερευνήσουν τις δυνατότητες των διατροφικών οργανικών πηγών Zn (Zn-λυσίνη, Zn-μεθειονίνη κ.α.) στην απόδοση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής και τα χαρακτηριστικά του σφάγιου. Το αποτέλεσμα έδειξε σημαντική αύξηση της πρόσληψης τροφής με την ενσωμάτωση οργανικού Zn, ενώ η συνολική μετατρεψιμότητα της τροφής βελτιώθηκε με την προσθήκη 80 mg οργανικού Zn/kg ζωοτροφής. Πρόσφατα, οι Jahanian & Rasouli (2015) παρατήρησαν ότι η μερική υποκατάσταση του ανόργανου Zn από το Zn-Met βελτίωσε ( $P < 0,01$ ) την αύξηση βάρους των ορνιθίων πάχυνσης.

Γενικά, η πλειοψηφία των μελετών επιβεβαίωσε ότι οι οργανικές πηγές Zn όπως το Zn-Met ή ο προπιονικός-Zn ήταν καλύτερες από τις ανόργανες πηγές όπως ZnO ή ZnSO<sub>4</sub> εξαιτίας της μεγαλύτερης βιοδιαθεσιμότητάς τους.

## .2.2 Δυνητικός ρόλος του Zn ως αντιμικροβιακός παράγοντας στα ζώα..

Η συνεχής χρήση συμβατικών αντιβιοτικών οδήγησε στην ανάπτυξη και εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών σε πολλαπλά φάρμακα. Έτσι, είναι απαραίτητη η ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων ως εναλλακτική λύση σε ένα συμβατικό αντιβιοτικό. Ο Zn έχει εφαρμοστεί και εξεταστεί πρόσφατα για τις εξαιρετικές του δράσεις όπως η αντιβακτηριακή και η αντιμυκητιακή (Yazdankhah, Rudi, & Bernhoft, 2014).

### 2.2.1 Επίδραση του Zn σε παθογόνους μικροοργανισμούς σε χοίρους και πτηνά

Στα μικροβιακά οικοσυστήματα υπάρχει μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των ιχνοστοιχείων όπως ο Zn και ο χαλκός (Cu) ως περιοριστικοί παράγοντες και το τοξικό αποτέλεσμα αυτών. Ο Zn είναι κοινός συν-παράγοντας στα ένζυμα, ενώ η επίδραση της αυξημένης έκθεσης σε αυτόν είναι πολυδιάστατη και μπορεί να περιλαμβάνει από την αντικατάσταση άλλων ιχνοστοιχείων έως την πρόσδεση σε ένζυμα και την οξειδωση. Έχει υποθεθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση του Zn οδηγεί στην προώθηση της ανάπτυξης του ζώου με παρόμοιο

τρόπο όπως η επίδραση που προκαλούν τα αντιβιοτικά. Για τον Zn, πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να έχουν ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι της φυσιολογικής μικροχλωρίδας υπό συνθήκες περιορισμού του Zn, προωθώντας έτσι μια φλεγμονώδη κατάσταση (Gielda & DiRita, 2012). Η διάρροια από μόνη της μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση του Zn και αυτό θα μπορούσε επίσης να προάγει την επιβίωση των παθογόνων μικροοργανισμών.

### 2.2.2 Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης

Οι δυνητικοί μηχανισμοί των δράσεων του Zn αποδίδονται στην αντιμικροβιακή του δραστηριότητα που είναι παρόμοια με εκείνη των αντιβιοτικών, και βασίζεται στο γεγονός ότι η μικροβιακή χλωρίδα μεταβάλλεται για να μειωθεί η απώλεια των θρεπτικών συστατικών και να κατασταλούν τα παθογόνα βακτήρια του εντέρου. Τα δεδομένα από τους Højberg et al. (2005) έδειξαν μειωμένα μεγέθη κύριων ομάδων βακτηρίων μεταξύ της μικροχλωρίδας σε χοίρους, όπως των γαλακτοβακίλλων και των στρεπτοκόκκων με αυξημένες δόσεις ZnO στην τροφή. Η μείωση του πληθυσμού αυτών των βακτηρίων οδηγεί σε μικρότερη επίδραση της ανταγωνιστικής δράσης τους στο τμήμα της γαστρεντερικής οδού, γεγονός που μπορεί να ωφελήσει το ζώο-ξενιστή εξασφαλίζοντας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε θρεπτικά συστατικά και ενισχύοντας την ανάπτυξή του. Επιπλέον, η χορήγηση υψηλών δόσεων ZnO στα ζώα μέσω της ζωοτροφής έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των επιπέδων της συσσώρευσης οργανικών οξέων, με χαμηλότερα επίπεδα γαλακτικού και ηλεκτρικού οξέος να ανιχνεύονται στο στομάχι και το λεπτό έντερο και να παρατηρείται μεγαλύτερη συσσώρευση αυτών των ενώσεων στο παχύ έντερο και το κόλον. Ο τρόπος με τον οποίο αυτό επηρεάζει τη φυσιολογία των ζώων χρειάζεται λεπτομερέστερη διευκρίνιση, δεδομένου ότι το γαλακτικό οξύ που παράγεται στο στομάχι θεωρείται κανονικά ως μέρος του φυσικού αμυντικού μηχανισμού του ζώου-ξενιστή, ενώ η συσσώρευση του γαλακτικού οξέος στο παχύ έντερο έχει παρατηρηθεί κυρίως σε συνδυασμό με διάφορες διαταραχές.

Ο Zn μπορεί να είναι τοξικός για τα βακτήρια και αυτή η μικροβιακή τοξικότητα μπορεί να οφείλεται στη χημική συγγένειά τους με τις ομάδες θειόλης μακρο-βιομορίων, αλλά επίσης εξαρτάται από τη διαλυτότητα των μεταλλικών ενώσεων υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Για να αποφευχθεί η κυτταρική τοξικότητα σε αυξημένη έκθεση σε ιχνοστοιχεία, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής στα μεταλλικά στοιχεία. Τόσο οι μηχανισμοί

τοξικότητας όσο και η αντοχή σε ιχνοστοιχεία των βακτηρίων συζητούνται εκτενώς στο άρθρο των Seiler & Berendonk (2012). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι εκτός από τους αντιβιοτικούς παράγοντες, τα βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία και την υδατοκαλλιέργεια μπορεί να προωθήσουν τη διάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μέσω της εφαρμογής τους. Έχει αποδειχθεί ότι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες εκτός από τα αντιβιοτικά έχουν την ικανότητα να προάγουν μια διαδικασία αντίστασης (Baker-Austin, Wright, Stepanauskas, & McArthur, 2006). Τα ιχνοστοιχεία όπως ο Zn φαίνεται να έχουν τη δυνατότητα να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη της αντοχής του Zn και των αντιβιοτικών όχι μόνο σε επίπεδο κτηνοτροφικής μονάδας αλλά και στο περιβάλλον.

Οι συνολικές ποσότητες και οι συγκεντρώσεις Zn που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ των χωρών, λόγω των περιορισμών που επιβάλλονται από την εθνική νομοθεσία. Στοιχεία σχετικά με την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας έναντι του Zn στα βακτήρια ανθρώπινης προέλευσης είναι ανεπαρκή.

### 2.2.3 Ανθεκτικότητα Zn σε μικροοργανισμούς των ζώων

Σε βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από ζώα (Πίνακας 1), ανιχνεύθηκαν αυξημένες τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) σε Zn σε πολλά είδη βακτηρίων σε σύγκριση με συμβατικά αντιβιοτικά. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται σε αυτές τις μελέτες δείχνουν ότι τέτοια αύξηση στις τιμές MIC μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη έκθεση των ζώων στο ιχνοστοιχείο μέσω των ζωοτροφών. Η MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός δεδομένου παράγοντα που αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού υπό συνθήκες εργαστηριακές συνθήκες. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει τυποποιημένη και εγκεκριμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των τιμών MIC για τον Zn.

Αρκετές μελέτες στον Πίνακα 1 έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ ανθεκτικότητας στον Zn και στη μεθικιλίνη σε σταφυλόκοκκους (Aarestrup, Cavaco, & Hasman, 2010; Cavaco et al., 2010). Οι Cavaco et al. (2010) διαπίστωσαν ότι τα στελέχη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) από χοίρους σε ευρωπαϊκές χώρες, τον Καναδά και την Κίνα είχαν υψηλό επιπολασμό της αντοχής του Zn (που συνδέεται κυρίως με το γονίδιο *czrC*), ενώ τα αντίστοιχα στελέχη του ευαίσθητου στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (MSSA) ήταν ευαίσθητα σε αυτόν. Παρόμοια συσχέτιση μεταξύ της ανθεκτικότητας στον Zn και της αντοχής στη μεθικιλίνη

παρατηρήθηκε επίσης σε δείγματα από κτηνοτροφικές μονάδες από τις Κάτω Χώρες. Η μεθικιλίνη δεν επιλέγεται ως φάρμακο για τη θεραπεία της λοίμωξης στην κτηνιατρική σε καμία από τις χώρες της ΕΕ. Υπάρχει έλλειψη γνώσης σχετικά με την πηγή των ανθεκτικών σταφυλόκοκκων στη μεθικιλίνη και του Ζη στα ζώα. Δεν είναι σαφές εάν οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκοι σε ζώα είναι ανθρώπινης προέλευσης και είναι ανθεκτικοί στον Ζη μετά την έκθεση του ζώο σε τροφή ή οι ανθεκτικοί σε Ζη σταφυλόκοκκοι είναι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη, λόγω έκθεσης σε αντιβιοτικά.

Μία πρόσφατη δημοσίευση από τη Γερμανία (Bednorz, Oelgeschla, Kinnemann, Hartmann, & Neumann, 2013) έδειξε μεγαλύτερη ποικιλία κλώνων *E. Coli* σε χοιρίδια που τράφηκαν με ζωτροφές συμπληρωμένες με Ζη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η αναλογία ανθεκτικών *E. Coli* αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα Ζη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (αντιβιοτικό). Οι συγγραφείς πρότειναν δύο πιθανούς μηχανισμούς για τα αποτελέσματά τους: 1) συν-επιλογή (co-selection) μέσω αντοχής Ζη καθώς μερικά από τα στελέχη που απομονώθηκαν ήταν αμφότερα ανθεκτικά σε Ζη και στο αντιμικροβιακό. 2) ενισχυμένη πρόσληψη πλασμιδίου υπό την επίδραση του Ζη, καθώς οι συγγραφείς ανίχνευαν διάφορα πλασμίδια ανθεκτικότητας σε στελέχη που απομονώθηκαν στη ομάδα δειγμάτων που είχαν τραφεί με Ζη. Πανομοιότυποι κλώνοι δεν υπήρχαν στην ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 1. Ζη και αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα σε στελέχη βακτηρίων που απομονώθηκαν από ζώα

Αναφορά	Χώρα	Είδος	Είδη βακτηρίων	Ευαισθησία σε ιχνοστοιχείο	Ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες	Συμπέρασμα
(Aarestrup et al., 2010)	Δανία	Χοίροι	<i>MRSA</i> , <i>MSSA</i>	Zn	Μεθικιλίνη, ερυθρομυκίνη, πενικιλίνη, τετρακυκλίνη	Η χρήση Ζη μπορεί να εμπλακούν στην εμφάνιση κάποιων στελεχών <i>MRSA</i>
(Aarestrup & Hasman, 2004)	Δανία	Ζώα αγροκτήματος	<i>Salmonella</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>E. faecalis</i> <i>S. faecium</i>	Zn, Cu	Χλωριούχο βενζαλκόνιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, χλωροεξιδίνη	Η αντίσταση Ζη βρέθηκε μόνο σε εντερόκοκκους λόγω εφαρμογής απολύμανσης.

<b>(Cavaco et al., 2010)</b>	Δανία	Χοίροι	<i>S. aureus</i>	Zn	Μεθικιλίνη,	Αντοχή σε Zn που μπορεί να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στη συν-επιλογή του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη <i>S. aureus</i> .
<b>(Cavaco, Hasman, &amp; Aarestrup, 2011)</b>	Δανία	Χοίροι και μοσχάρια	<i>S. aureus</i>	Zn, Cu	Μεθικιλίνη	Η ανθεκτικότητα στο Zn και το γονίδιο <i>czrC</i> είναι ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των στελεχών απομόνωσης CC398 MRSA και η χρήση του Zn στη ζωοτροφή μπορεί να συνέβαλε στην εμφάνιση του MRSA.
<b>(Bednorz et al., 2013)</b>	Γερμανία	Χοιρίδια	<i>E. coli</i>	Zn	Αμπικιλίνη, στρεπτομυκίνη, χλωραμφενικόλη γενταμικίνη, τετρακυκλίνη, ενροφλοξασίνη κετοταξίμη	Η αναλογία των πολυανθεκτικών <i>E. Coli</i> αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα ψευδαργύρου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.
<b>(Holzel et al., 2012)</b>	Γερμανία	Χοίροι	<i>E. coli</i>	Zn, Cu	β-λακτάμες, αμινογλυκοζίτες	Η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα στη μικροχλωρίδα των χοίρων μπορεί να αυξηθεί με τον Zn και το Cu.

Συμπερασματικά, τα βακτήρια στα ζώα μπορεί να αναπτύξουν αντίσταση στον Zn. Τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτό το ιχνοστοιχείο εντοπίζονται σε ορισμένα είδη βακτηρίων από ζώα. Η αντίσταση στον Zn και η σύνδεσή του με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε ορισμένα είδη βακτηρίων που προέρχονται από ζώα έχει αναγνωριστεί. Τα γονίδια ανθεκτικότητας στον Zn βρίσκονται συχνά σε πλασμίδια, τα οποία μπορεί να μεταφερθούν σε άλλα βακτήρια, εντός και μεταξύ των ειδών.

Αν και η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την ιατρική είναι εν μέρει υπεύθυνη για το αυξημένο επίπεδο ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, η έκθεση σε ιχνοστοιχεία όπως ο Zn μπορεί επίσης να συμβάλει στην ανοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, ακόμη και αν αυτά δεν εφαρμόστούν. Ένας σύνδεσμος ανθεκτικότητας μεταξύ Zn και μεθικιλίνης έχει ταυτοποιηθεί σε σταφυλόκοκκους ζωικής προέλευσης. Η συμπλήρωση της ζωοτροφής με Zn μπορεί να αυξήσει την αναλογία πολυανθεκτικών *E. Coli* στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου των ζώων.

Όλα τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τις επιπτώσεις του Zn στο περιβάλλον, που θα συζητηθούν στο επόμενο κεφάλαιο, αποτελούν τους κύριους λόγους της απαγόρευσης της εκτεταμένης χρήσης του Zn στις ζωοτροφές. Αξίζει να αναφερθεί ότι οργανικός ψευδάργυρος [οργανικά άλατα σε χηλική μορφή όπως ο προπιονικός Zn ( $C_6H_{10}O_4Zn$ ) και ο οξικός Zn ( $Zn(CH_3CO_2)_2$ )] μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις ζωοτροφές, διότι δεν απαγορεύεται από τη νομοθεσία (Κεφάλαιο 4).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ Zn - ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΠΙΒΑΡΥΝΣΗ

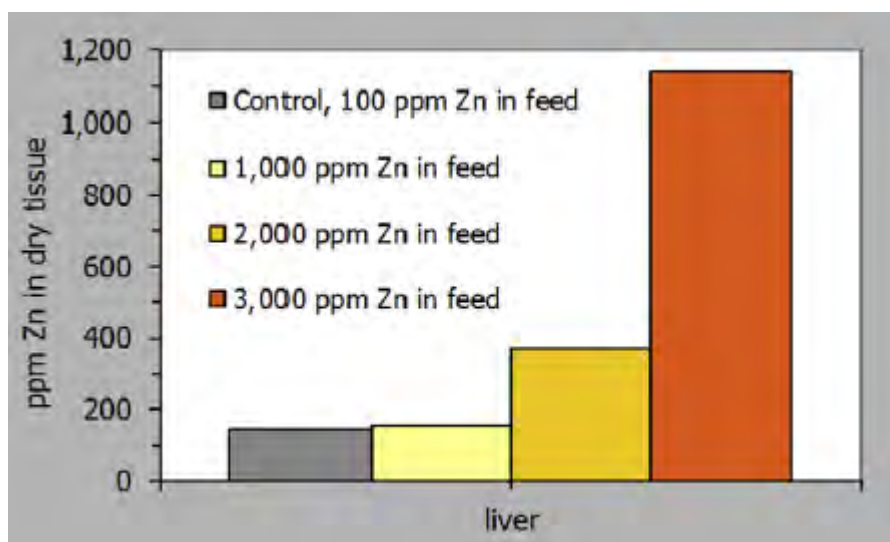
Η υπερτροφοδότηση των σιτηρεσίων των ζώων με Zn μπορεί να είναι ιδιαίτερα επιβλαβής για το περιβάλλον. Η προσθήκη Zn στη διατροφή σε επίπεδα υψηλότερα από τις φυσιολογικές απαιτήσεις οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση και συσσώρευση Zn στο περιβάλλον.

Εκτός από πιθανές αρνητικές συνέπειες όσον αφορά την αποδοτικότητα της παραγωγής, οι η διατροφή εμπλουτισμένη σε ψευδάργυρο μπορεί να έχει ποικίλες ανεπιθύμητες επιπτώσεις στο περιβάλλον. Όπως επισημάνθηκε παραπάνω, ο οργανισμός αντιδρά στην είσοδο του Zn σε σημαντικές ποσότητες πάνω από το όριο των καθημερινών απαιτήσεων με δραστική μείωση της αποτελεσματικότητας της απορρόφησης. Αυτό σημαίνει ότι κάθε επιπλέον ποσότητα (mg) που υπερβαίνει τη ζήτηση των οργανισμών μεταφέρεται στην κόπρο. Με την εξάπλωση αυτών των οργανικών λιπασμάτων σε γεωργικά εδάφη ενδέχεται να συσσωρευθούν βαρέα μέταλλα στο έδαφος. Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για τη διατροφή των ζώων ως βασική αιτία της συσσώρευσης του Zn σε γεωργικές περιοχές (Wuana & Okieimen, 2011). Επιπλέον, οι υψηλές δόσεις Zn ενδεχομένως να προσφέρουν και βακτηριοκτόνο δράση στο έδαφος. Ένα λειτουργικό μικροβιακό έδαφος απαιτείται για την κανονική ανάπτυξη των φυτών. Ως εκ τούτου, η τοξική υπερφόρτωση με Zn στα εδάφη επηρεάζει την παραγωγή των φυτών (Rout & Das, 2003b). Η υψηλή περιεκτικότητα των ιχνοστοιχείων στο έδαφος αποτελεί επίσης απειλή για τα ύδατα, και ως εκ τούτου, για την ανθρώπινη υγεία (Asada, Toyota, Nishimura, Jun-Ichi, & Hori, 2010).

Μια άλλη αρνητική πτυχή των αυξημένων φορτίων Zn στο έδαφος είναι η δυνατότητα μεταφοράς του στα φυτά. Έχει αποδειχθεί ότι τα φυτά που αναπτύσσονται σε εδάφη με περιεκτικότητα Zn μεταξύ 32 και 640 mg/kg dm συσσωρεύουν Zn στο φυτικό ιστό μεταξύ 8,1 και 82,6 mg/kg dm (Sauvé, Cook, Hendershot, & McBride, 1996). Αυτά τα φυτά είναι δυνητικά ακατάλληλα για τη διατροφή των ζώων και των ανθρώπων όσον αφορά τα δημοσιευμένα συνιστώμενα ανώτατα όρια του Zn στη ζωοτροφή.

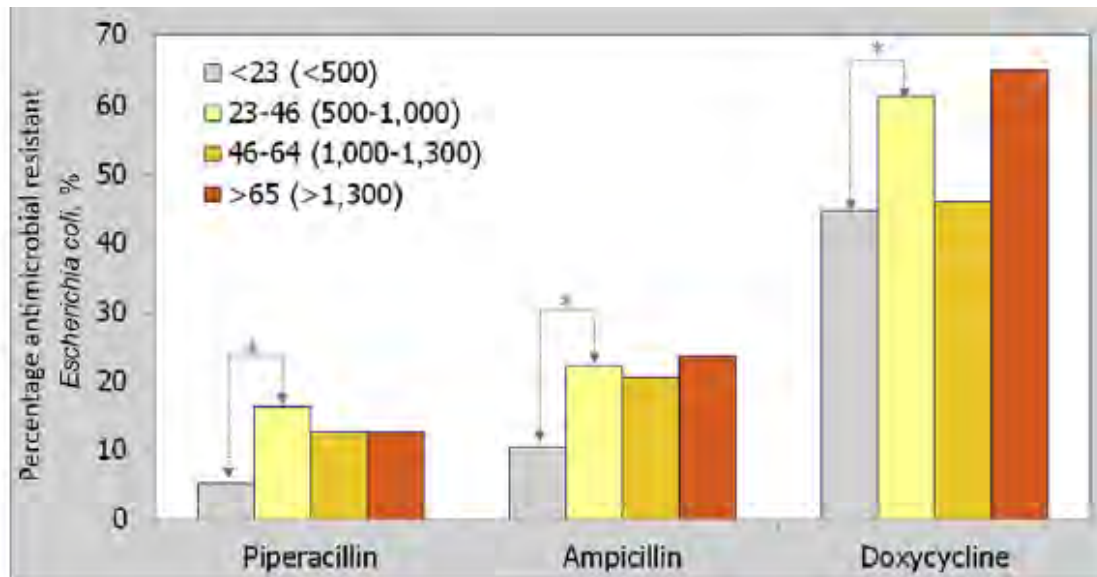
Όσον αφορά την ασφάλεια των καταναλωτών, η πιθανότητα αύξησης της συσσώρευσης του Zn, όταν συμπληρώνεται στις ζωοτροφές σε φαρμακολογικές δόσεις μπορεί να είναι

σημαντική. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα ιχνοστοιχεία ανταγωνίζονται ως δεσμευτικά στα πεπτιδία μεταφοράς. Μία ζωτροφή που είναι εμπλουτισμένη με φαρμακολογική δόση Zn σημαίνει ότι παρόλο που η κύρια πηγή Zn είναι μειωμένη, εξακολουθεί να υπάρχει κάποια μη ρυθμιζόμενη εισροή Zn, χρησιμοποιώντας άλλους μηχανισμούς μεταφοράς κατιόντων (Martin, Lodemann, et al., 2013). Πράγματι, μια τέτοια εισροή δεν είναι τόσο αποτελεσματική όσο μέσω πεπτιδίων ειδικών για τον Zn αλλά φαίνεται να είναι επαρκώς αποτελεσματική ώστε να συσσωρεύεται ο Zn σε ορισμένους ιστούς (π.χ., ήπαρ, νεφρό) (Martin, Lodemann, et al., 2013). Καθώς το συκώτι και τα νεφρά είναι δυνητικά βρώσιμα ζωικά προϊόντα, αυτή η πρακτική διατροφής μπορεί να αποτελεί απειλή για την ασφάλεια των τροφίμων. Αυτό γίνεται ιδιαίτερα εμφανές συγκρίνοντας τα συνιστώμενα ανώτατα όρια για την πρόσληψη του Zn (25 έως 45 mg Zn/d όπως προτείνεται από την SCF (2003) και τις αναφερθείσες ποσότητες στο ήπαρ και στα νεφρά των ζώων που έλαβαν φαρμακολογικές δόσεις (400 και 1.500 mg Zn/kg ξηρού ηπατικού ιστού σε ζώα που έλαβαν 2.000 και 3.000 Zn/kg) (Εικόνα 4) (Fry et al., 2012). Η χρήση τέτοιων ζωικών προϊόντων εμπλουτισμένων με Zn στην ανθρώπινη διατροφή θα ήταν προφανώς κρίσιμη όσον αφορά τη διατήρηση των ημερήσιων επιπέδων πρόσληψης του Zn εντός ανεκτών ορίων. Συνεπώς, υπό το φως των πιθανών κινδύνων για την ασφάλεια των καταναλωτών, η φαρμακολογική δοσολογία στη διατροφή των ζώων πρέπει να επανεξεταστεί επειγόντως.



Εικόνα 4. Απόκριση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου σε ξηρό ιστό σε ζωτροφή με ποικίλλουσα περιεκτικότητα ψευδαργύρου

Μια άλλη πτυχή που έχει αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον κατά τα τελευταία χρόνια είναι η θετική συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων φορτίων Zn στην κόπρο και της αφθονίας των ανθεκτικών βακτηρίων στην αντιμικροβιακή δράση του ιχνοστοιχείου αυτού. Οι Hölzel et al. (2012) κατέδειξαν ότι η περιεκτικότητα Zn πάνω από 23 ppm σε κόπρο, που αντιπροσωπεύει περίπου  $\geq 500$  ppm σε ξηρή ουσία, αύξησε σημαντικά την ποσοστιαία ποσότητα ανθεκτικών στελεχών *E. coli* (περίπου 100% των βακτηρίων *E. coli* στην κόπρο (Εικόνα 5). Αυτή η αντοχή των βακτηρίων στον Zn έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο και έχει αποδειχθεί και από τους Vahjen et al. (2015) οι οποίοι παρατήρησαν επίσης εμφανή ανθεκτικότητα εντός της γαστρεντερικής οδού χοιριδίων, όπου υπήρξαν σημαντικά αυξημένοι αριθμοί αντιγράφων ανθεκτικών εντεροβακτηριδίων σε τετρακυκλίνη και σε σουλφοναμίδιο. Ο μηχανισμός δράσης φαίνεται να είναι μια ρύθμιση ορισμένων αντλιών εκροής εντός της μεμβράνης του πλάσματος των βακτηρίων. Αυτή η συμπεριφορά αντιπροσωπεύει μια αποτελεσματική αμυντική στρατηγική των βακτηρίων έναντι των αντιμικροβιακών ουσιών (Blair, Richmond, & Piddock, 2014). Ο μηχανισμός φαίνεται να είναι επίσης αποτελεσματικός έναντι της τοξικότητας του Zn. Επιπλέον, εξηγεί τις αναφορές σχετικά με την απώλεια στην υγεία και στην ανάπτυξη που επιφέρουν οι αυξημένες φαρμακολογικές δόσεις σε Zn. Προφανώς, η μικροβιακή κοινότητα προσαρμόζεται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα στην συνεχιζόμενη υπερφόρτωση του συστήματος με Zn με αυξημένη απέκκριση μέσω αντλιών εκροής.



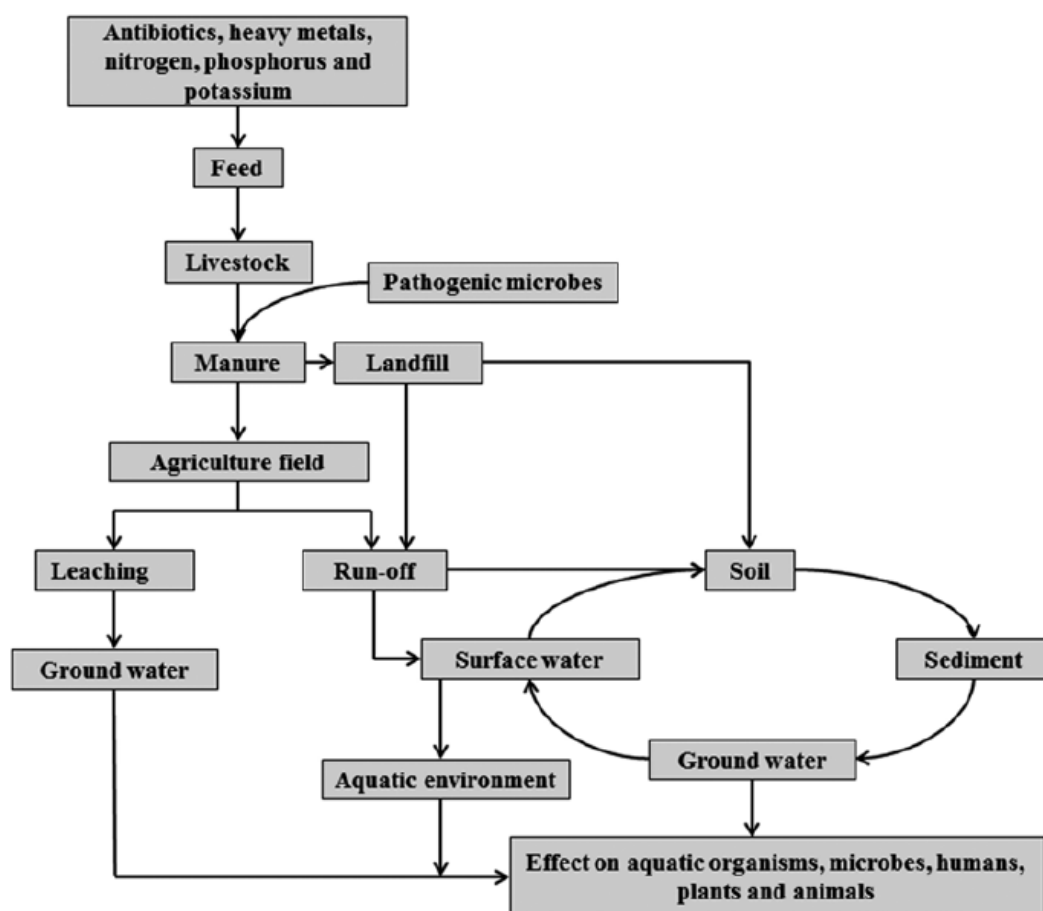
Εικόνα 5. Σχέση μεταξύ του φορτίου του ψευδαργύρου στην κόπρο και της ποσοστιαίας συγκέντρωσης φαινοτυπικών αντιμικροβιακών ουσιών ανθεκτικών στην *Escherichia coli* (Hölzel et al., 2012). Οι τιμές στις παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν τις εκτιμώμενες περιεκτικότητες ψευδαργύρου στην κόπρο

### Επίδραση στο νερό και στο έδαφος

Οι συνήθεις πρακτικές αντιμετώπισης των μεγάλων ποσοτήτων ζωικών λιπασμάτων από τους παραγωγούς ζωικού κεφαλαίου είναι η αποθήκευσή τους σε ειδικά διαμορφωμένους χώρους και η διαχείρισή τους με σκοπό να μειώσουν τις συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών και παθογόνων οργανισμών ή η διασπορά τους στο χώμα για να καλύψουν τις ανάγκες των καλλιεργειών τους σε θρεπτικά συστατικά (Kumar, Park, & Cho, 2013).

Η κόπρος που εισέρχεται σε ρέματα, λίμνες, ή υπόγεια ύδατα αποτελεί βασική ανησυχία λόγω των τεσσάρων παραγόντων: θρεπτικά συστατικά, εξάντληση οξυγόνου, αιωρούμενα στερεά και συγκέντρωση βακτηρίων. Τα θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο, ο φωσφόρος και το κάλιο που δεν αφομοιώνονται από τα ζώα επιστρέφονται στο έδαφος, όπου χρησιμοποιούνται από την καλλιέργεια (Εικόνα 6). Ωστόσο, όταν δεν ακολουθείται σωστή διαχείριση της κόπρου, η διάβρωση, η απορροή και η έκπλυση μπορεί να μεταφέρουν τα θρεπτικά συστατικά μακριά από το έδαφος και σε πηγές νερού, προκαλώντας ρύπανση. Το οργανικό υλικό στην κόπρο αποσυντίθεται καταναλώνοντας το διαλυμένο οξυγόνο στο νερό, με πιθανό αποτέλεσμα το θάνατο των ψαριών. Τα θρεπτικά συστατικά στην κόπρο μπορεί να αυξήσουν την ανάπτυξη των υδρόβιων φυτών, γεγονός που μπορεί να διαταράξει το

τοπικό οικοσύστημα. Μπορούν να εισαχθούν βακτήρια και ιοί, αυξάνοντας τις δυνατότητες εξάπλωσης ασθενειών και η υψηλή ποσότητα νιτρικών αλάτων στο πόσιμο νερό μπορεί να δημιουργήσει κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Μια παρατεταμένη υπερβολική εφαρμογή κόπρου μπορεί να οδηγήσει σε μια ανισορροπία στη χημεία του εδάφους που θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των αποδόσεων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις κόπρου είναι τοξικές για τα φυτά. Μέσα σε ένα χρόνο από την εφαρμογή κόπρου, καλλιέργειες ψυχανθών ή κάποιο άλλο είδος χλωρίδας πρέπει να φυτευτούν για να προσλάβουν τα θρεπτικά συστατικά που εφαρμόζονται στο έδαφος (Smith, Owens, Leytem, & Warnemuende, 2007).



Εικόνα 6. Διάγραμμα διασποράς των ρύπων στο περιβάλλον μέσω της κόπρου

### **Κίνδυνοι που οφείλονται σε βαρέα μέταλλα (Zn) και παθογόνους μικροοργανισμούς στην κόπρο ζώων**

Η κόπρος των ζώων αποτελεί μια εναλλακτική πηγή λιπάσματος στη βιολογική γεωργία (Wong, Ma, Fang, & Cheung, 1999), και ένα οικονομικό υποκατάστατο του χημικού

λιπάσματος. Ωστόσο, ορισμένοι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι μπορεί να προκύψουν από την εφαρμογή κόπρου, συμπεριλαμβανομένης της τοξικότητας της κόπρου στα φυτά, και τη συσσώρευση ιχνοστοιχείων σε φυτά που ενδέχεται να θέσουν σε κίνδυνο τον άνθρωπο ή το ζωικό κεφάλαιο. Τα υπολείμματα βαρέων μετάλλων στα περιττώματα μπορούν να συσσωρευτούν σε επιφανειακά εδάφη ως αποτέλεσμα μακροχρόνιας γεωργικής δραστηριότητας (J. Shi et al., 2011). Η συσσώρευση βαρέων μετάλλων δεν επηρεάζει μόνο τη γονιμότητα του εδάφους και την ποιότητα των καλλιεργούμενων προϊόντων (Guan, He, Zhang, & Bai, 2011), αλλά προωθεί και τη μετανάστευση μετάλλων μέσω της έκπλυσης και της απορροής (Chibuike & Obiora, 2014).

Οι Zhou, Hao, Wang, Dong, & Cang (2005) διερεύνησαν τις συγκεντρώσεις ψευδαργύρου και χαλκού σε ιστούς από ραπανάκι και κινέζικο λάχανο (*Brassica rapa campestris subsp., Napus var. Pekinensis*, αντίστοιχα) και ανέφεραν ότι οι συγκεντρώσεις Zn και Cu στα λαχανικά αυξήθηκαν όταν το οι συγκεντρώσεις τους αυξάνονται στο χώμα με την εφαρμογή της κόπρου. Μια μελέτη των Xiong et al. (2010) αποκάλυψε ότι υψηλές συγκεντρώσεις Zn απαντώνται σε ζωικά περιττώματα που οφείλονται στην αυξημένη προσθήκη στις ζωοτροφές. Οι συγγραφείς συγκέντρωσαν 215 δείγματα ζωικής κόπρου και 210 ζωοτροφές. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι μέσες συγκεντρώσεις Zn σε δείγματα κόπρου χοίρων, βοοειδών, πτηνών και προβάτων ήταν 399,6, 31,8, 81,8 και 66,85 mg/kg, αντίστοιχα. Οι Nicholson, Chambers, Williams, & Unwin (1999) μελέτησαν 183 ζωοτροφές και 85 δείγματα ζωικής κόπρου που συλλέχθηκαν από φάρμες στην Αγγλία και στην Ουαλία για να προσδιοριστεί το περιεχόμενό τους σε βαρέα μέταλλα (Zn, Cu, Ni, Pb, Cd, As, Cr και Hg). Οι κοπριές χοίρων γενικά περιείχαν 500 mg Zn και 360 mg/kg. Τυπικές συγκεντρώσεις σε κόπρο πτηνών ήταν 400 Zn και 80 mg Cu/kg και σε κόπρο βοοειδών 180 Zn και 50 mg/kg, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι Hölzel et al. (2012b) ανέφεραν ότι η συγκέντρωση του Zn σε κόπρο χοίρων κυμάνθηκε από 93,00 έως 8239,00 mg/kg DM στη Γερμανία (Βαυαρία). Οι Shi et al. (2019) ανέφεραν υψηλότερη μέση συγκέντρωση Zn και Cu σε κόπρο χοίρων σε σύγκριση με την κόπρο βοοειδών και προβάτων στην Κίνα (1313.00, 514.70 mg/kg, αντίστοιχα). Μέσω της κόπρου, ένας μεγάλος αριθμός ιόντων μετάλλων μπορεί να απορροφηθεί στο έδαφος, παρεμποδίζοντας έτσι την ποιότητα της καλλιέργειας ή την αύξηση της ρύπανσης του εδάφους (Liu et al., 2018).

Πρόσφατα, η ΕΕ έχει απαγορεύσει την προσθήκη των φαρμακολογικών επιπέδων του ZnO (European Medicine Agency (EMA), 2017) στις ζωοτροφές μετά το 2022 επειδή η συνολική

σχέση οφέλους-κινδύνου για τα πρόσθετα που περιέχουν ZnO παραμένει αρνητική. Λόγω της πρόσφατης νομοθεσίας και της έλλειψης δεδομένων σχετικά με τη ρύπανση των βαρέων μετάλλων, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων και θρεπτικών συστατικών που προέρχονται από ζωοτροφές, στο νερό και στα κόπρανα στα σύγχρονα συστήματα εκτροφής ζώων όπως χοίρων και βοοειδών, προκειμένου να αναπτυχθούν αποτελεσματικές στρατηγικές για την αύξηση της βιωσιμότητας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ – ΑΙΤΙΑ ΚΑΤΑΡΓΗΣΗΣ

### 4.1 Ανασκόπηση αιτιών κατάργησης

Για να κατανοηθούν οι επιδράσεις της υπερβολικής δόσης του Zn στον οργανισμό των ζώων καθώς και στο περιβάλλον, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν οι βασικές αρχές του μεταβολισμού του Zn. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο Zn είναι δυνατό να παρουσιάζει τοξικότητα εάν τα επίπεδα εντός ενός βιολογικού συστήματος υπερβαίνουν ένα συγκεκριμένο όριο. Ο τρόπος δράσης βασίζεται στη σύνδεση του Zn στα πεπτίδια. Επομένως στην περίπτωση της υπερφόρτωσης με Zn, αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να φαίνεται μη συγκεκριμένη και ανεξέλεγκτη, η οποία έχει συσχετιστεί με τοξικές παρενέργειες (Goldhaber, 2003; Valko, Morris, & Cronin, 2005). Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί πολύπλοκοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί στον οργανισμό των ζώων που ελέγχουν την πρόσληψη του Zn από τη διατροφή καθώς και την απέκκριση του στο περιβάλλον (Lichten & Cousins, 2009).

Οι πιο σημαντικές παράμετροι της ομοιοστατικής ρύθμισης του Zn φαίνεται να είναι η απορρόφηση του Zn και η έκλυση του στον γαστρεντερικό σωλήνα. Παλαιότερες μελέτες σε αρουραίους επισημασμένους με <sup>65</sup>Zn κατέδειξαν με σαφήνεια τον τρόπο με τον οποίο αυξάνεται η σχετική αποτελεσματικότητα απορρόφησης σε χρόνους ανεπαρκούς παροχής. Ταυτόχρονα, η απέκκριση του ενδογενούς Zn στο γαστρεντερικό σωλήνα μειώθηκε σε μια αναπόφευκτη ποσότητα. Οι αληθείς και οι φαινομενικά πεπτές ποσότητες Zn καθώς και οι απώλειες του στον γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) έδειξαν μια άμεση μη γραμμική απόκριση στην αύξηση της ποσότητας του Zn μέσω της διατροφής (H. W. Windisch & Kirchgessner, 1999). Όλες οι παράμετροι έδειξαν σημαντική μεταβολή στη συμπεριφορά σε μια συγκεκριμένη δόση Zn, η οποία σηματοδοτεί το σημείο ικανοποιητικών απαιτήσεων σε Zn. Ο εμπλουτισμός της διατροφής με Zn πάνω από τις απαιτήσεις προωθεί μια δραστική μείωση της σχετικής απόδοσης απορρόφησης Zn και ταυτόχρονα μια αύξηση της αποτελεσματικότητας της απέκκρισής του. Συνεπώς, οποιαδήποτε ποσότητα Zn που καταναλώνεται σε περίσσεια ως προς τις μεταβολικές απαιτήσεις θα αποβάλλεται αναπόφευκτα και θα συσσωρεύεται στην κόπρο (Brugger & Windisch, 2017).

Σε μια επιστημονική μελέτη, η διατροφή εμπλουτισμένη με ψευδάργυρο σε περιεκτικότητα ~ 30 mg Zn/kg πάνω από το ελάχιστο όριο απαιτήσεων (88,0 έναντι 58,0 mg Zn/kg δίαιτας



υπό συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες) προκάλεσε διπλασιασμό του περιεχόμενου Zn στην κόπρο (Brugger, Buffler, & Windisch, 2014). Ως εκ τούτου, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος συσσώρευσης Zn στο περιβάλλον, δηλαδή στο έδαφος και στα υπόγεια ύδατα (Asada et al., 2010). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο Zn έχει ισχυρά τοξικός. Αυτό δεν ισχύει μόνο για τους ζωικούς οργανισμούς αλλά για τα βιολογικά συστήματα γενικά, συμπεριλαμβανομένης της χλωρίδας και της πανίδας των εδαφών. Στην πραγματικότητα, το αυξανόμενο φορτίο του Zn έχει συσχετιστεί με μια διαταραχή του μικροβιακού φορτίου του εδάφους, η οποία έχει αρνητικές συνέπειες στην ανάπτυξη των φυτών (Rout & Das, 2003a). Επιπλέον, η κινητικότητα του Zn στο έδαφος μπορεί να είναι υψηλή. Συνεπώς, μεταφέρεται αρκετά γρήγορα στα υπόγεια ύδατα όπου αποτελεί πιθανή απειλή για την αλυσίδα εφοδιασμού με πόσιμο νερό.

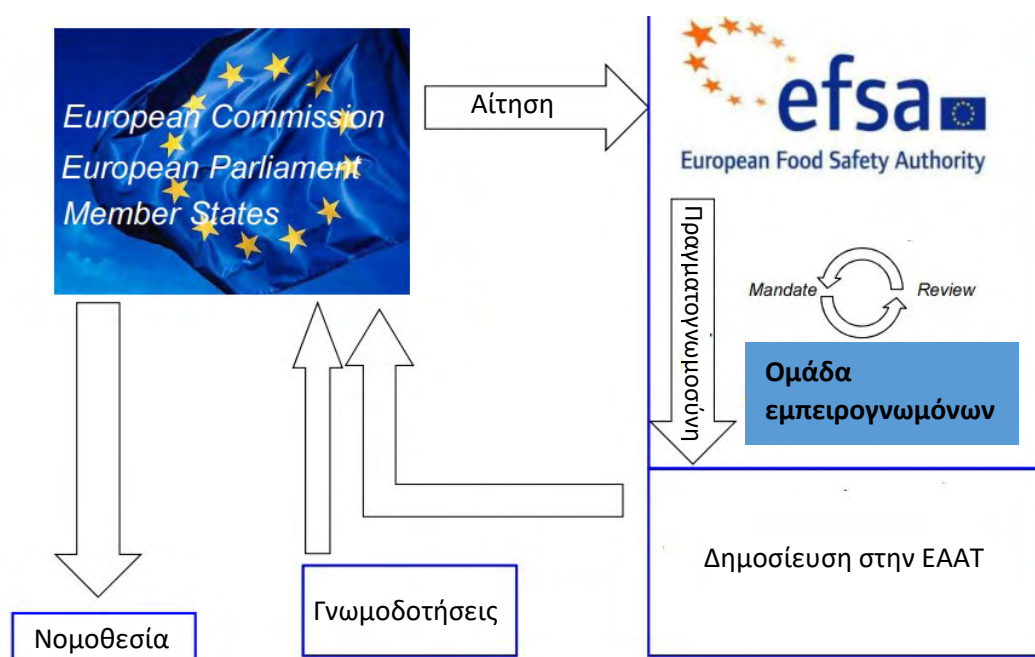
Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα ποσά Zn που υπερβαίνουν τις πραγματικές απαιτήσεις διατροφής μπορούν να συσσωρευτούν στους ζωικούς ιστούς μέσω της ανεξέλεγκτης παθητικής εισροής. Πειράματα σε χοιρίδια που έλαβαν φαρμακολογικές δόσεις Zn, προήγαγαν συγκεντρώσεις ~1,100 και ~125 mg Zn/kg ξηρού βάρους στο ήπαρ και στο πάγκρεας, αντιστοίχως (Pieper et al., 2015). Αυτό ξεπερνά σαφώς τα βασικά επίπεδα που αναγνωρίζονται στα χοιρίδια που τρέφονται σύμφωνα με τις τρέχουσες συστάσεις διατροφής (NRC, 2012), π.χ. ~127 και ~91 mg/kg ξηρού βάρους ήπατος και παγκρέατος (Brugger et al., 2014). Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι ειδικά αυτά τα κλάσματα των ιστών επηρεάζονται, καθώς εμπλέκονται στην ανακατανομή και αποβολή (αποτοξίνωση) του Zn στον οργανισμό (Brugger & Windisch, 2015). Εκτός από τον πιθανό κίνδυνο για την ασφάλεια των καταναλωτών (το ήπαρ είναι πιθανό τρόφιμο ζωικής προέλευσης), η συσσώρευση Zn στους ιστούς συνοδεύεται από αυξημένο κυτταρικό στρες (Valko et al., 2005). Το λειτουργικό υπόβαθρο αυτών των παρατηρήσεων μπορεί να είναι μια υψηλότερη σύνθεση πεπτιδίων που δεσμεύονται με Zn που σχετίζονται με την αποθήκευση και την απέκκριση ενδοκυτταρικού Zn. Οι Pieper et al. (2015) κατέδειξαν ότι το πάγκρεας των χοιριδίων που έλαβαν φαρμακολογικές δόσεις για αρκετές εβδομάδες παρουσίασαν αυξημένο περιεχόμενο Zn στον ιστό (~4 φορές σε σύγκριση με τον ιστό της ομάδας ελέγχου) και ταυτόχρονα υψηλότερες ποσότητες σε μεταλλοθειονίνες, πεπτικά ένζυμα καθώς και πεπτίδια που ανταποκρίνονταν στο στρες. Ως εκ τούτου, η μακροχρόνια χορήγηση υπερβολικών ποσοτήτων διαιτητικού Zn μπορεί να επηρεάσει την καλή διαβίωση των ζώων.

Οι αυξανόμενες ενδείξεις υποδεικνύουν μια σύνδεση μεταξύ των υψηλών περιεχομένων Zn μεταξύ του γαστρεντερικού συστήματος και της κόπρου, αντίστοιχα, και μια αυξημένη αφθονία ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριδίων (Hölzel et al., 2012b, Vahjen et al., 2015).

Αυτό φαίνεται να είναι μια προσαρμοστική αντίσταση, η οποία εξαφανίζεται όταν το περιεχόμενο σε Zn μειώνεται στα βασικά επίπεδα. Διάφοροι μηχανισμοί προτείνονται για να ερμηνεύσουν την αντοχή σε αντιβιοτικά και σε μέταλλα. Συνεπώς, η χρήση φαρμακολογικών δόσεων Zn ως μέτρο προαγωγής της υγείας μπορεί να επηρεάσει, υπό ορισμένες συνθήκες, την κτηνιατρική παρέμβαση.

## 4.2 Νομοθεσία

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, η νομοθεσία που αφορά τη συγκέντρωση του Zn στις ζωοτροφές έχει καθοριστεί και αναθεωρηθεί τα τελευταία χρόνια, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Διαδικασία για την αναθεώρηση της ισχύουσας νομοθεσίας από την Ευρωπαϊκή Ένωση

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 θεσπίζει τους κανόνες που διέπουν την έγκριση πρόσθετων υλών που χρησιμοποιούνται στη διατροφή των ζώων. Ειδικότερα, το άρθρο 10, παράγραφος 2 του εν λόγω κανονισμού, ορίζει ότι για τα υφιστάμενα προϊόντα κατά την έννοια του άρθρου 10 παράγραφος 1 υποβάλλεται αίτηση σύμφωνα με το άρθρο 7 το αργότερο ένα έτος πριν από την ημερομηνία λήξης της εξουσιοδότησης σύμφωνα με την οδηγία 70/524/ΕΟΚ για τις πρόσθετες ύλες με περιορισμένη περίοδο έγκρισης και εντός επτά ετών κατ' ανώτατο όριο μετά την έναρξη ισχύος του παρόντος κανονισμού για τις πρόσθετες

ύλες που επιτρέπονται χωρίς χρονικό περιορισμό ή σύμφωνα με την οδηγία 82/471/ΕΟΚ (ΕFSA, 2016).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έλαβε αίτημα από την Grillo Zinkoxid GmbH/EMFEMA για επανεκτίμηση των ζωοτροφών που περιέχουν ψευδάργυρο (οξειδίο του ψευδαργύρου), όταν αυτός χρησιμοποιείται ως πρόσθετη ύλη ζωοτροφών για όλα τα είδη ζώων.

Σύμφωνα με το άρθρο 7 παράγραφος 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1831/2003, η Επιτροπή διαβίβασε την αίτηση στην Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (ΕΑΑΤ) σύμφωνα με το άρθρο 10 παράγραφος 2 (επαναξιολόγηση εγκεκριμένης πρόσθετης ύλης ζωοτροφών). Η ΕΑΑΤ έλαβε απευθείας από τον αιτούντα τον τεχνικό φάκελο προς υποστήριξη αυτής της αίτησης.6 Σύμφωνα με το άρθρο 8 του εν λόγω κανονισμού, η ΕΑΑΤ, ύστερα από την επαλήθευση των στοιχείων και των εγγράφων που υποβλήθηκαν από τον αιτούντα, προβαίνει σε εκτίμηση προκειμένου να διαπιστώσει εάν η πρόσθετη ύλη ζωοτροφών πληροί τους όρους που καθορίζονται στο άρθρο 5. Τα στοιχεία και τα έγγραφα θεωρήθηκαν έγκυρα από την ΕFSA στις 2 Αυγούστου 2011.

Το οξειδίο του ψευδαργύρου ως πρόσθετη ύλη είχε εγκριθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) για όλα τα είδη ζώων "χωρίς χρονικό περιορισμό" [κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1334/2003] και τροποποιήσεις. Σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 10 παράγραφος 1 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1831/2003, η ένωση περιελήφθη στο μητρώο πρόσθετων υλών ζωοτροφών της ΕΕ στην κατηγορία "Διατροφικά πρόσθετα" και στη λειτουργική ομάδα "Ενώσεις των ιχνοστοιχείων".

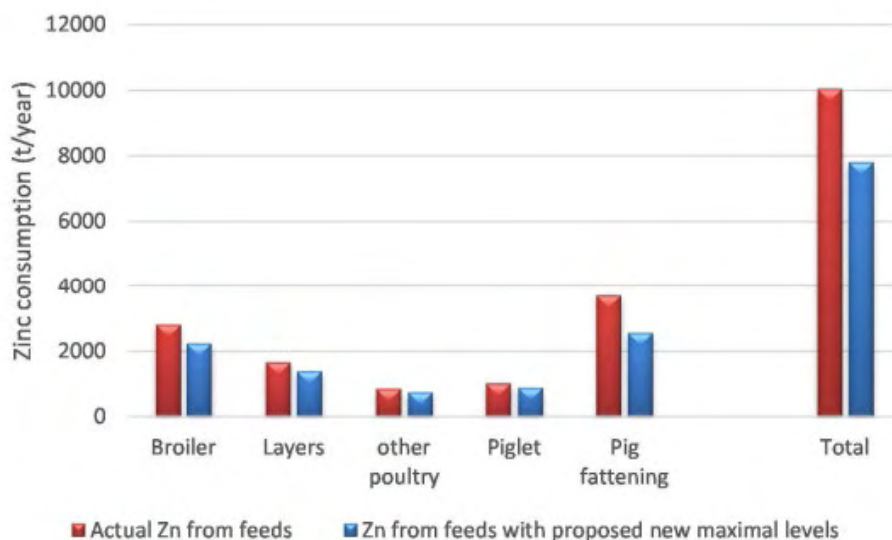
Η επιστημονική επιτροπή για τη διατροφή των ζώων (SCAN) εξέδωσε γνώμη σχετικά με τη χρήση ψευδαργύρου στις ζωοτροφές. Η ΕFSA εξέδωσε γνωμοδοτήσεις σχετικά με την ασφάλεια των χηλικών μορφών σιδήρου, χαλκού, μαγγανίου και ψευδαργύρου με τη συνθετική γλυκίνη στις ζωοτροφές και σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα ενός χηλικού συμπλόκου ψευδαργύρου (Mintrex®Zn) και σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του χλωριούχου ψευδαργύρου για όλα τα είδη ζώων. Η ΕFSA εξέδωσε γνωμοδοτήσεις σχετικά με την επαναξιολόγηση και μια νέα χρήση μονούδρου θειικού ψευδαργύρου και την εκ νέου αξιολόγηση χηλικού ψευδαργύρου ενυδατωμένων αμινοξέων (ΕFSA, 2012).

Πρόσφατα, εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, οι νομοθετικές αρχές αναγνώρισαν ήδη τα προβλήματα που συνδέονται με τα υψηλά φορτία Zn στις ζωοτροφές. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε πρόσφατα τον κανονισμό (ΕΕ) 2016/1095, ο οποίος μειώνει τα επιτρεπόμενα ανώτατα όρια του Zn σε πλήρεις ζωοτροφές για χοίρους σε διατροφή 150 και 120 mg/kg (για

χοιρίδια / χοιρομητέρες και χοίρους προς πάχυνση) (EFSA, 2016). Η απόφαση αυτή βασίστηκε σε προηγούμενη γνωμοδότηση που δημοσίευσε η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Στο ίδιο έγγραφο η ΕΑΑΤ πρότεινε ακόμη χαμηλότερα περιεχόμενα (-30%) παρουσία 500 FTU δραστηριότητας φυτάσης/kg διατροφής. Αυτό θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί σε νομικούς κανονισμούς σε μεσοπρόθεσμη κλίμακα. Ως εκ τούτου, το επιτρεπτό εύρος για τα περιθώρια ασφαλείας Zn σε πλήρη διατροφή συρρικνώνεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επείγουσα ανάγκη να αυξηθεί η ακρίβεια του προσδιορισμού της χορήγησης Zn.

Συγκεκριμένα, ο νέος κανονισμός - 2016/1095 - ορίζει το ανώτατο όριο για την πλήρη σίτιση σε 180 mg ψευδαργύρου ανά kg πλήρους ζωοτροφής για τις σολομονίδες και τα βοοειδή, 150 mg/kg για χοιρίδια, χοιρομητέρες, κουνέλια και άλλα ψάρια και 120 mg/kg σε πλήρεις ζωοτροφές για γαλοπούλες προς πάχυνση και 100 mg/kg σε πλήρεις ζωοτροφές για όλα τα άλλα είδη και κατηγορίες. Αυτές οι αλλαγές θα οδηγήσουν σε συνολική μείωση των εκπομπών ψευδαργύρου από ζωική παραγωγή κατά περίπου 20%, σύμφωνα με την ΕΑΑΤ. Η επίδραση των πρόσφατα προτεινόμενων μέγιστων επιτρεπόμενων συγκεντρώσεων για τον ολικό ψευδάργυρο στις ζωοτροφές παρουσιάζεται στην Εικόνα 8.

Η μείωση της ποσότητας ψευδαργύρου στις ζωοτροφές καθορίστηκε από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) τον Μάιο του 2014, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των καταναλωτών, η υγεία και η καλή μεταχείριση των ζώων και να μην υπάρξουν δυσμενείς επιπτώσεις στην παραγωγικότητα των ζώων. Η ΕΑΑΤ πραγματοποίησε την αναθεώρησή της λόγω ανησυχιών σχετικά με τον πιθανό ρόλο των υπερβολικών επιπέδων ψευδαργύρου από τα ζώα παραγωγής τροφίμων που προκαλούν περιβαλλοντική ζημία στα συστήματα αποστράγγισης και στα επιφανειακά ύδατα που θα μπορούσαν να αποκατασταθούν δύσκολα.



Εικόνα 8. Επίδραση των πρόσφατα προτεινόμενων μέγιστων επιτρεπόμενων συγκεντρώσεων για τον ολικό ψευδάργυρο στις ζωτροφές

#### 4.2.1 Απαγόρευση του οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) στους χοίρους

Όσον αφορά τους χοίρους, το 2003, η Ευρωπαϊκή Ένωση καθόρισε ανώτατο όριο στη συγκέντρωση ψευδαργύρου στις ζωτροφές χοίρων από 250 mg/kg κάτω από 150 mg/kg. Οι περισσότερες πλήρεις ζωτροφές περιέχουν 30-40 ppm φυσικού ψευδαργύρου, και επιτρέπεται ο εμπλουτισμός τους, κυρίως από οξείδιο ψευδαργύρου ή θειικό ψευδάργυρο, σε όχι περισσότερο από 110 mg/kg σε Zn. Για τις περισσότερες ζωτροφές χοίρων, αυτό το επίπεδο είναι περισσότερο από αρκετό, καθώς οι απαιτήσεις δεν υπερβαίνουν τα 100 mg/kg. Για τους απογαλακτισμένους χοίρους, υπάρχει ένα πρόβλημα με αυτό το ανώτατο όριο.

Με τον κανονισμό 1334/2003 της ΕΕ η ευρεία χρήση του οξειδίου του ψευδαργύρου σε φαρμακολογικές δόσεις (από 2.000 έως 4.000 mg/kg ψευδάργυρο) σταμάτησε, μόνο για να γίνει εκ νέου αποδεκτή βάσει κτηνιατρικής συνταγής το 2005 για να αντιμετωπίσει το πρόβλημα της κακής υγείας του εντέρου καθώς τα αντιβιοτικά που προωθούν την ανάπτυξη καταργήθηκαν σταδιακά.

Μία πτυχή του ψευδαργύρου στη διατροφή των ζώων είναι η αλληλεπίδραση του ψευδαργύρου με τη φυτάση. Αυτό το ένζυμο είναι ικανό να απελευθερώνει δεσμευμένο ψευδάργυρο (και ως εκ τούτου, μη διαθέσιμο στο ζώο) στο φυτικό οξύ, μαζί με φωσφόρο. Η ΕΕ πιστεύει ότι η ευρεία χρήση της φυτάσης μπορεί να επιτρέψει την περαιτέρω μείωση του ανώτατου ορίου για τον ψευδάργυρο. Για παράδειγμα, εκτιμάται ότι η χρήση φυτάσης μπορεί να αποτελέσει κίνητρο για τη μείωση του ανώτατου ορίου ψευδαργύρου από 150 σε

110 mg/kg, γεγονός που θα επιτρέψει την παροχή μόνο έως 70 mg/kg ψευδαργύρου με ανόργανες μορφές.

Η χρήση του οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) στους χοίρους έχει απαγορευτεί από το 2017. Η απόφαση εγκρίθηκε από την πλειοψηφία των ευρωπαϊκών κρατών μελών. Τα κράτη μέλη της ΕΕ πρέπει εντός πενταετίας να εφαρμόσουν την απαγόρευση της χώρας τους. Αναμένεται ότι ορισμένες χώρες θα χρειαστούν περισσότερο χρόνο προσαρμογής. Σύμφωνα με τις έρευνες που έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, τα στελέχη του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (MRSA) μπορεί να μεταφέρουν γονίδια αντοχής στο ψευδάργυρο. Επιπλέον, το ZnO έχει αρνητική επίδραση όταν εισέρχεται στο περιβάλλον μέσω της λύσης. Για την ΕΕ, όλα αυτά αρκούν για να καταργήσουν το οξείδιο του ψευδαργύρου καθώς τα οφέλη του για την πρόληψη της διάρροιας μετά το απογαλακτισμό δεν αντισταθμίζουν τα μειονεκτήματα αυτά (Byrne, 2019).

#### 4.3 Στρατηγικές για την αύξηση της ακρίβειας του προσδιορισμού της χορήγησης ψευδαργύρου σε ζώα

Οι έρευνες σχετικά με τα επίπεδα Zn στην κόπρη χοίρων και βοοειδών σε κτηνοτροφικές μονάδες στην Κεντρική Ευρώπη έδειξαν προφανείς διαφορές. Η περιεκτικότητα σε Zn σε χοίρους υπερέβη εκείνη σε βοοειδή κατά 5 τάξεις μεγέθους, με μέγιστα επίπεδα ~ 1.500 mg/kg ξηράς ουσίας (έναντι ~ 300 mg/kg ξηράς ουσίας σε βοοειδή) (Hölzel et al., 2012a; Kickingger, Würzner, & Windisch, 2009). Οι χοίροι σύμφωνα με τις δημοσιευμένες συστάσεις για τη διατροφή των ζώων (NRC, 2012) αποδίδουν επίπεδα Zn στην ξηρά ουσία κόπρου μεταξύ 500 και 700 mg/kg (Brugger et al., 2014; Kickingger et al., 2009). Ως εκ τούτου, ο τομέας της εκτροφής χοίρων φαίνεται να είναι ο κύριος χρήστης υπερβολικών δόσεων Zn που υπερβαίνουν κατά πολύ τις τρέχουσες συστάσεις για τη διατροφή. Νέες ανώτερες οριακές τιμές 200-450 mg Zn/kg ξηρής βάσης συζητούνται για την κόπρη, οι οποίες επί του παρόντος φθάνει μόνο σε εκτροφές βοοειδών.

Για να μειωθεί το περιεχόμενο ζωοτροφών σε Zn χωρίς να τεθεί σε κίνδυνο η παραγωγικότητα και η ευημερία των ζώων, πρέπει να αντιμετωπιστούν 2 σημεία. Εκτός από την αύξηση της ακρίβειας του προσδιορισμού στη ζωοτροφή του Zn, η βιοδιαθεσιμότητα της ζωοτροφής σε Zn από τη φυτική βιομάζα πρέπει να αυξηθεί και να σταθεροποιηθεί με την κατάλληλη διαιτητική παρέμβαση.

Συζητήθηκε αρχικά ότι η κυριότερη πηγή πρόσληψης του Zn από τη φυτική βιομάζα είναι η υψηλή περιεκτικότητά της σε άλλα συστατικά όπως οι φυτάσες. Οι δίαιτες απαλλαγμένες από φυτάσες σε αναπτυσσόμενα χοιρίδια οδηγούν σε απαιτήσεις Zn στη διατροφή ~15 mg/kg. Αντίθετα, κάτω από πρακτικές συνθήκες διατροφής (με βάση τα δημητριακά και το σογιάλευρο), το όριο αυτό αυξάνεται κατά ~ 3 έως 4 τάξεις μεγέθους (~50-60 mg Zn/kg ζωοτροφής) (Brugger & Windisch, 2017). Ως εκ τούτου, οι διαιτητικές παρεμβάσεις για τη βελτιστοποίηση της χρήσης του Zn κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες χορήγησης πρέπει να αντισταθμίζουν το δυναμικό ανθεκτικότητας της φυτικής βιομάζας.

Στα συμβατικά συστήματα εκτροφής ζώων, οι χρήσεις των συμπληρωμάτων φυτάσης για τη διάσπαση του συμπλόκου φυτασών είναι ήδη σε εφαρμογή. Για παράδειγμα, οι Windisch & Kirchgessner (1995) έδειξαν ότι η προσθήκη 600 FU/kg σε δίαιτες για χοίρους και ορνίθια αύξησε τις ποσότητες της φαινομενικά αφομοιωμένης ζωοτροφής σε Zn κατά 1,6 και 1,8 τάξεις μεγέθους, αντίστοιχα. Περαιτέρω μελέτες κατέληξαν σε συγκρίσιμα συμπεράσματα (Ettle, Windisch, & Strain, 2005). Συνεπώς, η απέκκριση του Zn από τους χοίρους και τα πτηνά που τρέφονται με ζωοτροφές με καθορισμένη ποσότητα Zn, μειώνεται εξαιτίας της απόκρισής τους στη δραστηριότητα της φυτάσης. Η προσθήκη άλλων συμπληρωμάτων ενζύμων (π.χ. πρωτεάσες, αμυλάσες, ξυλανάσες κλπ.) μπορεί επίσης να αυξήσει τις ποσότητες του διαθέσιμου Zn στο έντερο των ζώων. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πιο αποτελεσματική κατανομή της ζωοτροφής στον οργανισμό (Cowieson, 2005). Στο γενικό πλαίσιο των συμπληρωμάτων ενζύμων στη διατροφή ζώων, η διαγονιδιακή τροποποίηση των ζωικών οργανισμών αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα είναι το λεγόμενο *Environig*, το οποίο εκφράζει σημαντική δραστηριότητα φυτάσης εντός του σάλιου (Forsberg et al., 2013). Έτσι είναι σε θέση να αξιοποιήσει καλύτερα την φυσική περιεκτικότητα της φυτικής βιομάζας σε ιχνοστοιχεία (Zn) σε σύγκριση με αγριόχοιρους (Golovan et al., 2001).

Η χημική μορφή (είδος) στην οποία συμπληρώνεται ο Zn στη διατροφή επηρεάζει άμεσα τη βιοδιαθεσιμότητα της ζωοτροφής σε Zn. Ο ψευδάργυρος μεταφέρεται σε ιοντική μορφή (Zn<sup>2+</sup>) μέσω βιολογικών μεμβρανών (Lichten & Cousins, 2009). Η ποσότητα του διαθέσιμου Zn (ελεύθερη μορφή και ήπια συνδεδεμένα ιόντα Zn) στο έντερο των ζώων οφείλεται στην αποτελεσματικότητα των πεπτικών διεργασιών καθώς και της αλληλεπίδρασης των χημικών ειδών Zn μεταξύ τους και με άλλα διαιτητικά συστατικά. Υπάρχουν ακόμη πολλές μελέτες

που δημοσιεύονται κάθε χρόνο με στόχο την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ορισμένων συμπληρωμάτων Zn υπό πρακτικές συνθήκες διατροφής. Ωστόσο, λόγω των σύνθετων χημικών αλληλεπιδράσεων εντός της γαστρεντερικής οδού (GIT) καθώς και των διαφορών στις πειραματικές ρυθμίσεις, τα διαθέσιμα δεδομένα είναι αρκετά αντιφατικά και στις περισσότερες περιπτώσεις αντικατοπτρίζουν μόνο ημι-ποσοτικές συγκρίσεις. Επιπλέον, η *in vitro* διαλυτότητα ενός συμπληρώματος διατροφής με Zn έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι απαραίτητως προβλέψιμη για τη βιοδιαθεσιμότητά του (Brugger & Windisch, 2017).

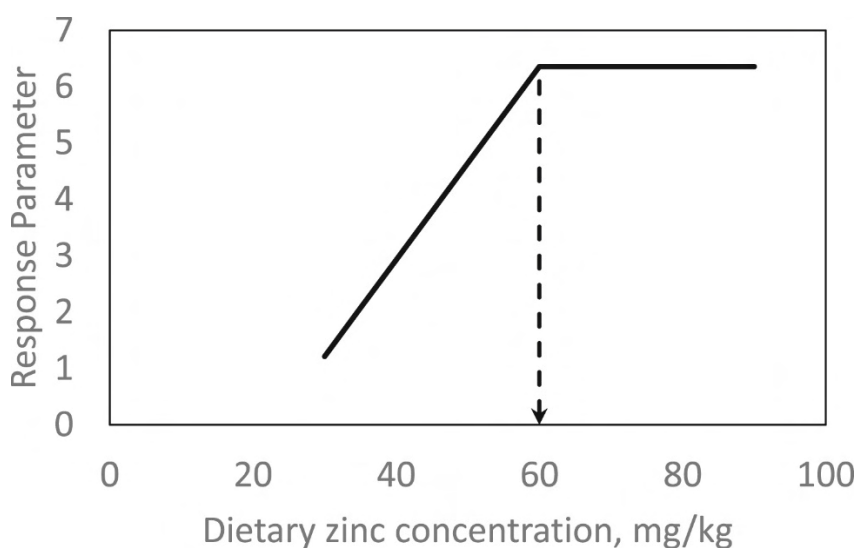
Το πιο προφανές μέτρο για την αύξηση της χρήσης ιχνοστοιχείων σε συνήθεις δίαιτες θα ήταν η μείωση των συνολικών ποσοτήτων ανταγωνιστικών ουσιών. Για παράδειγμα, η αντικατάσταση των πηγών φυτικών πρωτεϊνών (κυρίως σόγιας και αραβοσίτου) από αυτές ζωικής προέλευσης μειώνει δραστικά τη συνολική περιεκτικότητα σε φυτάσες. Ωστόσο, οι ισχύοντες νομικοί κανόνες απαγορεύουν τη χρήση ζωικών πρωτεϊνών στην πρακτική διατροφή. Σε αυτό το πλαίσιο, θα πρέπει να ενταθεί η αναζήτηση εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης με μειωμένη ή μη περιεκτικότητα ανταγωνιστών στη χρήση ιχνοστοιχείων. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν να συλλεχθούν συμπυκνώματα πλούσια σε πρωτεΐνες από χυμούς φυτών, των οποίων η πρωτεΐνη ισούται με εκείνη του αλεύρου της σόγιας (Brugger & Windisch, 2017). Δεδομένου ότι οι φυτάσες εντοπίζονται στους σπόρους και στους πυρήνες (κουκούτσια) (Humer, Schwarz, & Schedle, 2015), ο Zn και άλλα ιχνοστοιχεία εντός αυτών των συμπυκνωμάτων μπορεί να εμφανίζουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Εντούτοις, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να διερευνηθεί η αξία των ζωοτροφών αυτών και ιδιαίτερα η επίδρασή τους στα ιχνοστοιχεία των ζωοτροφών.

Συνολικά, υπάρχουν πολλά υποσχόμενες προσεγγίσεις που μπορούν να αυξήσουν και να σταθεροποιήσουν τη διαθεσιμότητα χορήγησης Zn και ταυτόχρονα να μειώσουν τις απαραίτητες ποσότητες ολικού Zn στη διατροφή. Εντούτοις, για να καταστεί δυνατή η ακρίβεια του προσδιορισμού της χορήγησης Zn σε χοίρους και πτηνά, χρειάζονται αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με τις απαιτήσεις του ζώου σε Zn, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές στη διαθεσιμότητα Zn φυσικής προέλευσης και εμπλουτισμένου μέσω κατάλληλων ζωοτροφών, τον ανταγωνισμό μεταξύ Zn και άλλων διαιτητικών παραγόντων, και την κατάσταση του ζώου. Επιπλέον, πρέπει να εξεταστούν και απρόβλεπτα γεγονότα όπως λοίμωξη, φλεγμονή, στρες κλπ., που πιθανώς προκαλούν προσωρινή αύξηση της ημερήσιας απαίτησης σε Zn.

Μια πειραματική προσέγγιση για την εκτίμηση των απαιτήσεων Zn πρέπει να διασφαλίζει τη διαφοροποίηση μεταξύ επαρκώς και ανεπαρκώς εμπλουτισμένων ζώων. Επομένως, πρέπει



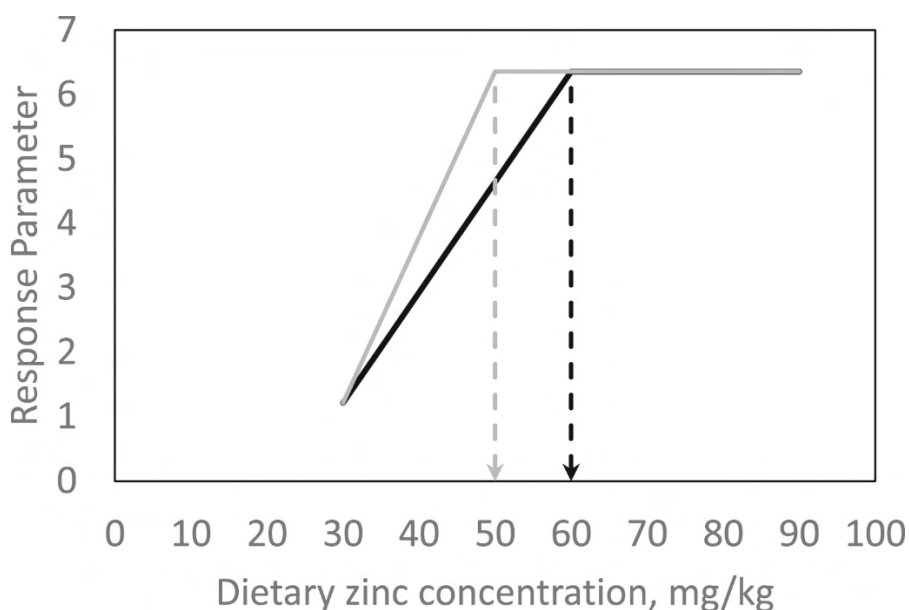
να εφαρμοστεί μια μελέτη απόκρισης με εξαιρετικά διαβαθμισμένες διαφορές στη προσφορά Zn μέσω της διατροφής, η οποία να καλύπτει το εύρος από τα δυνητικά ανεπαρκή επίπεδα έως την ήπια υπερπροσφορά. Ένα τέτοιο μοντέλο δημοσιεύθηκε πρόσφατα για χοίρους (Brugger et al., 2014). Σε αυτή τη μελέτη, η ποσότητα της φαινομενικά αφομοιωμένης χορήγησης Zn χρησιμοποιήθηκε ως παράμετρος απόκρισης για την εκτίμηση των απαιτήσεων σε Zn. Έχει αποδειχθεί νωρίτερα σε αρουραίους επισημασμένους με  $^{65}\text{Zn}$ , ότι αυτό το μέτρο συσχετίζεται άμεσα με τις πραγματικά απορροφούμενες ποσότητες Zn από τη γαστρεντερική οδό (GIT). Η ένταση της απόκρισης των παραμέτρων στην αύξηση της χορήγησης Zn μεταβάλλεται σημαντικά στο επίπεδο των ικανοποιητικών απαιτήσεων σε Zn. Αυτό το επίπεδο μπορεί να εκτιμηθεί με μοντέλα παλινδρόμησης (Robbins, Saxton, & Southern, 2006) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Θεωρητική γραμμική απόκριση μιας τυχαίας παραμέτρου κατάστασης ψευδαργύρου (Zn) σε μεταβολές στη διατροφική συγκέντρωση του ψευδαργύρου. Σε αυτό το παράδειγμα, η παράμετρος (π.χ. φαινομενικά πεπτή χορήγηση Zn) παρουσιάζει ένα πλατό για απόκριση πάνω από ένα διατροφικό κατώτατο όριο 60 mg Zn/kg διαίτας, κάτω από το οποίο μειώνεται ή αυξάνεται με κλίση 0,17/mg, αντίστοιχα. Το διατροφικό κατώφλι (σημείο διακοπής) αντιπροσωπεύει τις απαιτήσεις σε Zn σε δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Ένα τέτοιο πείραμα θα μπορούσε επίσης να διεξαχθεί για να συγκριθεί η διαθεσιμότητα ορισμένων συμπληρωμάτων σε Zn. Συνεπώς, με διπλασιασμό του μεγέθους του δείγματος, δηλ. 96 αντί για 48 ζώα στην περίπτωση των Brugger et al. (2014), και τα δύο συμπληρώματα

ενδιαφέροντος μπορούν να αξιολογηθούν παράλληλα μεταξύ τους. Οι διαφορές στην αποτελεσματικότητα θα ήταν εμφανείς συγκρίνοντας τα σημεία διακοπής ως προς την αυξανόμενη χορήγηση Zn, καθώς και τις κλίσεις ως προς τις ανεπαρκώς παρεχόμενες ποσότητες στο επίπεδο των ικανοποιητικών απαιτήσεων του Zn, αντίστοιχα. Μια υψηλότερη κλίση ή χαμηλότερο όριο διατροφής, αντίστοιχα, θα έδειχνε υψηλότερη ποσοστιαία χρήση της χορήγησης Zn υπό δεδομένες συνθήκες διατροφής (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Θεωρητική ανταγωνιστική γραμμική απόκριση μιας τυχαίας παραμέτρου κατάστασης ψευδαργύρου σε μεταβολές στη διατροφική συγκέντρωση του ψευδαργύρου (Zn) από 2 διαφορετικά είδη συμπληρώματος Zn. Σε αυτό το παράδειγμα, η παράμετρος (π.χ. φαινομενικά πεπτή χορήγηση Zn) εμφανίζει ένα πλατό σε απόκριση πάνω από τα διατροφικά όρια των 60 και 50 mg Zn/kg δίαιτας όταν χορηγούνται με ψευδάργυρο τύπου A (μαύρο) και B (γκρι) αντίστοιχα. Κάτω από το αντίστοιχο όριο, η απόκριση των παραμέτρων στις μεταβολές της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου από τους τύπους A και B μειώνεται ή αυξάνεται κατά 0,17 και 0,26/mg μείωσης ή αύξησης του διατροφικού Zn, αντίστοιχα.

Οι περισσότερες δοκιμές, που αποσκοπούσαν στη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας ορισμένων στρατηγικών διατροφής σε Zn, χρησιμοποίησαν ομάδες ζώων με περισσότερο ή λιγότερο έντονες καταστάσεις κλινικής (σοβαρής) ανεπάρκειας σε Zn. Ωστόσο, υπό τις συνθήκες μιας κλινικής ανεπάρκειας Zn εμφανίζεται ένα πλήθος σοβαρών δευτερογενών μεταβολικών συμβάντων (Brugger & Windisch, 2017). Αυτά τα γεγονότα συσχετίζονται μόνο

έμμεσα με την ομοιοστατική ρύθμιση του Zn. Η εμφάνιση κλινικής ανεπάρκειας Zn στην πρακτική διατροφή είναι μάλλον απίθανη, καθώς η πλήρης διατροφή συμβατικών ζώων συμπληρώνεται με Zn. Αντίθετα, υποκλινικά συμβάντα ανεπαρκούς χορήγησης Zn συμβαίνουν συχνότερα. Η υποκλινική ανεπάρκεια του Zn ορίζεται από τη μείωση της πρόληψης των ζώων σε Zn και των μεταβολών στις αντίστοιχες αντισταθμιστικές μεταβολικές οδούς, αλλά ταυτόχρονα και την απουσία ορατών συμπτωμάτων (μείωση της ανάπτυξης, ανορεξία, δερματική νέκρωση κλπ.). Η ήδη αναφερθείσα προσέγγιση των Brugger et al. (2014) προκαλεί μια τέτοια υποκλινική έλλειψη Zn, η οποία πιθανώς συμβαίνει στην πρακτική εκτροφή χοιριδίων. Αυτό έχει συσχετισθεί με εξασθενημένες βιοχημικές λειτουργίες, π.χ. πέψη. Υπό αυτές τις συνθήκες, η χρήση του Zn και η βιοδιαθεσιμότητα της χορήγησής του (ζωοτροφή) μπορεί να εκτιμηθεί πολύ πιο ρεαλιστικά, επειδή η απόκριση των μηχανισμών απορρόφησης / εκκρίσεως του Zn συμβαίνει εντός των βασικών ορίων. Αντίθετα, τα ζώα που παρουσιάζουν κλινική έλλειψη Zn δεν πρέπει να ικανοποιούν μόνο τις βασικές τους απαιτήσεις σε Zn, αλλά και να αναπληρώνουν τα αποθέματα που έχουν εξαντληθεί και να αντισταθμίσουν τις εκφυλιστικές διεργασίες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η χρήση της νανοτεχνολογίας για την παραγωγή νανο-μεγέθους Zn που ονομάζεται nanoZn (nZn) είναι μια πιθανή εναλλακτική λύση τόσο στις οργανικές όσο και στις ανόργανες πηγές Zn. Η χρήση του nZn έχει δείξει ότι παράγει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις συμβατικές πηγές Zn και επίσης ο nZn είναι επίσης λιγότερο τοξικός (Swain et al., 2016).

### 5.1 Ιδιότητες των νανο-ιχνοστοιχείων

Τα νανο-ιχνοστοιχεία, έχουν διαστάσεις κάτω των 100 nm και είναι σταθερά υπό υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Λόγω του μικρού τους μεγέθους, είναι ευκολότερο να ληφθούν από τον γαστρεντερικό σωλήνα, έτσι είναι πιο αποτελεσματικά από το μεγαλύτερο μέγεθος ZnO σε χαμηλότερες δόσεις (Feng, Wang, Zhou, & Ai, 2009b). Στο σώμα των ζώων, τα νανο-ιχνοστοιχεία αλληλεπιδρούν αποτελεσματικότερα με οργανικές και ανόργανες ουσίες λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας τους (Zaboli, Aliarabi, Bahari, & Abbasalipourkabir, 2013). Τα νανοσωματίδια (NP) οξειδίου ψευδαργύρου έχουν επίσης ελάχιστη δυσμενή επίδραση στα ανθρώπινα κύτταρα. Έχουν την ικανότητα να διασχίζουν το λεπτό έντερο και να διανεμηθούν περαιτέρω στο αίμα, τον εγκέφαλο, τον πνεύμονα, την καρδιά, το νεφρό, τον σπλήνα, το συκώτι, το έντερο και το στομάχι. Οι λειτουργικές δραστηριότητες όπως οι χημικές, καταλυτικές ή βιολογικές επιδράσεις των νανοσωματιδίων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος των σωματιδίων των νανο-μετάλλων. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου βρέθηκαν κυρίως να διατηρούνται στο ήπαρ μετά από 14 ημέρες (Sharma, Singh, Pandey, & Dhawan, 2012) από του στόματος χορήγηση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα.

### 5.2 Επίδραση του εμπλουτισμού νανοσωματιδίων οξειδίου του ψευδαργύρου (nZn) σε βιολογικά συστήματα

Όπως και οι συμβατικές πηγές, το nZn παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στα ζώα (Πίνακας 2). Αν και υπάρχει λίγη βιβλιογραφία για αυτό το σημαντικό θέμα, παρατίθενται στη συνέχεια τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα των διαφόρων μελετών που έγιναν στο nZn.

Πίνακας 2 Επίδραση του νανο-ψευδαργύρου (nZn) στην απόδοση των ζώων

Είδος	Δράση	Αποτέλεσμα	Αναφορά
Συμπλήρωση <i>in vitro</i> των 100 και 200 mg / kg του nZnO στην 6η και 12η ώρα επώασης	Ζύμωση	Βελτιωμένη συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων και μικροβιακή ακατέργαστη παραγωγή πρωτεΐνης και ζύμωση οργανικής ύλης. Η συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου και η αναλογία οξικού προς προπιονικού οξέος επηρεάζονται αρνητικά.	(Chen, Wang, & Wang, 2011)
Χοίροι	Ανοσία	Η συχνότητα διάρροιας μειώθηκε	(Hongfu, 2008)
Βοοειδή (Holstein Friesian)	Παραγωγή γάλατος	Μείωση του αριθμού κυττάρων υποκλινικής μαστίτιδας. Αύξηση της παραγωγής γάλακτος.	(Rajendran, Kumar, Ramakrishnan, & Shibi, 2013)
Πρόβατα	Αναπαραγωγή	Υψηλή συχνότητα αμβλώσεων και θνησιγενών στις προβατίνες σε διατροφική ανεπάρκεια του nZnO	(Lina, Fenghua, Huiying, Jianyang, & Wenli, 2009)
Πτηνά	Ανάπτυξη	Βελτιώνει την απόδοση ανάπτυξης	(Najafzadeh et al., 2013)

### 5.2.1 Ανάπτυξη

Τα νανοσωματίδια οξειδίου ψευδαργύρου έχουν αναφερθεί ότι ενισχύουν τις επιδόσεις ανάπτυξης, βελτιώνουν τη χρησιμότητα των ζωοτροφών και παρέχουν οικονομικά οφέλη στα απογαλακτισμένα χοιρίδια και τα πτηνά (Mishra, Swain, Mishra, Panda, & Sethy, 2014). Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη μέση ημερήσια πρόσληψη λήφθηκαν με τη διατροφή των βασικών ζωοτροφών συμπληρωμένων με 200, 400, 600 mg/kg nZnO ή 3.000 mg/kg ZnO (Hongfu, 2008). Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου έχουν βρεθεί ότι βελτιώνουν την απόδοση παραγωγής και την απόδοση φτερώματος των ορνιθίων σε 42 ημέρες σίτισης στο επίπεδο των 40 mg / kg στη διατροφή (Lina et al., 2009). Οι Mishra et al. (2014) παρατήρησαν σημαντική βελτίωση στον ρυθμό ανάπτυξης των νεοσσών με προσθήκη nZn στη διατροφή τους από ό, τι με ανόργανο Zn ακόμη και στο 1/500 του επιπέδου του nZn και παρατηρήθηκε επίσης αύξηση των επιπέδων γλυκόζης και ALP στον ορό και μείωση της αμινοτρανσφοράς της αλανίνης (ALT) σε αυτό το επίπεδο της συμπλήρωσης με nZn. Σε μηρυκαστικά, μεγάλες δόσεις Zn δεν μπορούν να δράσουν ως αυξητικοί παράγοντες, ωστόσο, δόσεις έως και 3.000 mg/kg ζωοτροφών έχουν αποδειχθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη στους χοίρους (Hongfu, 2008). Ο Hongfu (2008) μελετά την επίδραση του nZnO στην απόδοση ανάπτυξης χοιριδίων και στο ποσοστό διάρροιας με μειωμένες δόσεις nZnO (200, 400, 600 mg / kg) ως υποκατάστατο των υψηλών δόσεων του ανόργανου ZnO (3.000 mg/kg) και ανέφερε ότι οι βασικές δίαιτες που συμπληρώθηκαν με 400 mg/kg ZnO NP μείωσαν το ποσοστό διάρροιας κατά 49,1%, γεγονός που έδειξε μη σημαντικές διαφορές με τα χοιρίδια που συμπληρώθηκαν με 3,000 mg/kg ZnO.

### 5.2.2 Παραγωγή γάλακτος

Έχει αναφερθεί ότι το nZn μειώνει τον αριθμό σωματικών κυττάρων στις αγελάδες με υποκλινική μαστίτιδα και βελτιώνει την παραγωγή γάλακτος σε σύγκριση με άλλες συμβατικές πηγές ZnO. Έτσι, το nZn μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο ως προληπτικό όσο και ως θεραπευτικό μέσο για τον έλεγχο της υποκλινικής μαστίτιδας στις αγελάδες (Rajendran et al., 2013).

### 5.2.3 Ζύμωση στη μεγάλη κοιλία

Οι Chen, Wang, & Wang (2011) μελέτησαν την επίδραση της συμπλήρωσης nZnO (0, 50, 100, 200, 400 mg/kg ξηρής βάσης) του πρότυπου ζύμωσης στη μεγάλη κοιλία. Η συμπλήρωση των ζωοτροφών με nZnO, *in vitro*, έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αυξάνει την πρωταρχική σύνθεση μικροβιακών πρωτεϊνών και αυξάνει

την απόδοση της ενεργειακής αξιοποίησης της επώασης σε πρώιμη φάση (6 έως 12 ώρες). Υπάρχει μια αύξηση της συγκέντρωσης πτητικών λιπαρών οξέων, παραγωγής μικροβιακών ακατέργαστων πρωτεϊνών και της ζύμωση οργανικής ύλης ενώ η συγκέντρωση αζώτου αμμωνίας και η αναλογία οξικού προς προπιονικού οξέος επηρεάζονται δυσμενώς από τη συμπλήρωση των 100 και 200 mg/kg nZnO στην 6η και 12η ώρα της επώασης in vitro.

#### 5.2.4 Ανοσία

Στα ζώα, η ανεπάρκεια του Zn μειώνει την ανοσία και την αντίσταση σε ασθένειες. Αλλά ο ρόλος του Zn ως αντιοξειδωτικό στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα στον εγκέφαλο, κερδίζει την προσοχή τον τελευταίο καιρό. Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών που ταξινομούνται ως ρυθμιστικές, δομικές και ενζυμικές. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ο ψευδάργυρος έχει έναν επιπλέον ρόλο ως νευροεκκριτικό προϊόν ή συμπαράγοντας. Σε αυτό το ρόλο, ο ψευδάργυρος είναι έντονα συγκεντρωμένος στα κυστίδια ενός συγκεκριμένου τμήματος των νευρώνων, που ονομάζονται "νευρώνες που περιέχουν ψευδάργυρο" και είναι ένα υποσύνολο των γλουταμινεργικών νευρώνων που είναι αποκλειστικά παρόντες στον πρόσθιο εγκέφαλο. Σημαντικές βελτιώσεις παρατηρήθηκαν στην κατάσταση υγείας (χαμηλό επίπεδο χοληστερόλης στο αίμα και υψηλή ALT) και ανοσία των πτηνών με συμπλήρωση του nZn σε ζωοτροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής σε 0,06 mg/kg σε σύγκριση με τη συμβατική δόση των 15 mg/kg οργανικών και ανόργανων Zn σε βασική διαίτα (Sahoo, Swain, Mishra, & Jena, 2014).

#### 5.2.5 Αναπαραγωγή

Ο ψευδάργυρος έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου. Η απουσία του Zn μπορεί να προκαλέσει αυξημένη οξειδωτική βλάβη που μπορεί να συμβάλει στην κακή ποιότητα του σπέρματος (Colagar, Marzony, & Chaichi, 2009). Ο Zn ελέγχει τη χρήση ενέργειας μέσω του συστήματος ATP που συσχετίζεται με τη συστολή και τη ρύθμιση των αποθεμάτων ενέργειας φωσφολιπιδίων, επηρεάζοντας έτσι την κινητικότητα των. Ο Zn ελέγχει την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων επηρεάζοντας την ανάπτυξη της ουράς σπέρματος. Οι Roy, Baghel, Mohanty, & Mondal (2013) επανεξέτασαν ότι ο Zn είναι σημαντικός για την κινητικότητα και τη βιωσιμότητα του σπέρματος. Στο μεσαίο κομμάτι του σπέρματος, ο Zn εμπλέκεται στον καταβολισμό του λιπιδίου και έτσι αποτελεί την πηγή ενέργειας για την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Έχει αναφερθεί ότι σε βουβάλια, η υψηλή συγκέντρωση Zn στα σπερματοζωάρια είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα και τη γονιμότητά τους. Η κακή διατροφή σε Zn μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα κινδύνου για χαμηλή ποιότητα

σπέρματος και ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα (Colagar et al., 2009). Νέα εφαρμογή στο σύστημα ζωικής παραγωγής είναι οι νανοσωλήνες που εμφυτεύονται κάτω από το δέρμα για να παρέχουν σε πραγματικό χρόνο μέτρηση του επιπέδου οιστραδιόλης στο αίμα. Οι ανεπαρκείς διατροφικές συνήθειες είναι αιτία υψηλής εμφάνισης αποβολών και θνησιγενών. Η συμπλήρωση των ζωοτροφών με τη μορφή nZn μπορεί να εξαλείψει αυτές τις αναπαραγωγικές διαταραχές και έτσι μπορεί να βελτιώσει την οικονομία της γεωργίας. Συνεπώς, οι μελέτες πρέπει να διερευνήσουν τις δυνατότητες του nZn στην αύξηση της αναπαραγωγής των ζώων.

#### 5.2.6 Αντιβακτηριακή δραστικότητα του nZn

Πολλοί ερευνητές επεσήμαναν την αντιμικροβιακή δράση του nZn. Αντιβακτηριακή δραστηριότητα σημαίνει ότι το αντιδραστήριο τοπικά σκοτώνει τα βακτήρια ή επιβραδύνει την ανάπτυξή τους, χωρίς να είναι τοξικό στους ιστούς. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου έχουν βακτηριοκτόνα αποτελέσματα τόσο στα θετικά κατά Gram όσο και στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Arabi et al., 2012) και είναι επίσης αποτελεσματικά έναντι των σπορίων που είναι ανθεκτικά σε υψηλή θερμοκρασία και υψηλή. Όταν τα βακτήρια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με nZn παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της διαπερατότητάς τους, επηρεάζοντας τη σωστή μεταφορά μέσω της μεμβράνης του πλάσματος (με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η αντιβακτηριακή δράση του nZnO εξαρτάται από την επιφάνεια και τη συγκέντρωση ενώ η κρυσταλλική δομή και το σχήμα των σωματιδίων έχουν μικρή επίδραση (Arabi et al., 2012). Αλλά κάποιοι άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι το μέγεθος είναι αντιστρόφως ανάλογο με την αντιβακτηριακή ιδιότητα που σημαίνει ότι μικρότερο μέγεθος ZnO, καλύτερη είναι η αντιβακτηριακή δραστηριότητα.

Τα νανοσωματίδια έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με την βακτηριακή επιφάνεια για την ενίσχυση της βακτηριοκτόνου επίδρασης από τα σωματίδια μεγάλου μεγέθους λόγω της κυτταροτοξικότητάς της στους μικροοργανισμούς. Η αντιβακτηριακή επίδραση του nZnO εξαρτάται από τη συγκέντρωση (Arabi et al., 2012). Όμως, ο πραγματικός μηχανισμός με τον οποίο το nZnO διεισδύει στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ένας αριθμός συγγραφέων έχει αναφέρει αρκετούς μηχανισμούς με τους οποίους το nZnO δρα έναντι των παθογόνων βακτηρίων. Οι Raad et al. (2005) ανέφεραν ότι τα νανοσωματίδια αυτά απελευθερώνουν ιόντα, τα οποία αντιδρούν με τις ομάδες θειόλης (-SH) πρωτεϊνών που υπάρχουν στην κυτταρική επιφάνεια. Αυτές οι πρωτεΐνες προεξέχουν μέσω του κυτταρικού τοιχώματος για να επιτρέψουν τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου αδρανοποιούν τις



πρωτεΐνες, μειώνοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τελικά προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο. Οι Padmanathy & Vijayaraghavan (2008) ανέφεραν ότι τα ιχνοστοιχεία (Zn) σε νανο-μορφή επίσης καθυστερούν τη συγκόλληση βακτηρίων και το σχηματισμό βιοφίλμ. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου μπορούν επίσης να διεισδύσουν μέσα στο βακτηριακό κύτταρο και να προκαλέσουν βλάβη των κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με ενώσεις που περιέχουν φωσφόρο και θείο όπως το DNA (Arabi et al., 2012). Ένας ακόμα πιθανός μηχανισμός για την αντιβιοτική ιδιότητα του nZnO δείχνει ότι οι μικροοργανισμοί φέρουν αρνητικό φορτίο ενώ τα οξείδια των μετάλλων φέρουν ένα θετικό φορτίο δημιουργώντας μια "ηλεκτρομαγνητική" έλξη μεταξύ του μικροβίου και της επεξεργασμένης επιφάνειας (Arabi et al., 2012). Μόλις γίνει η επαφή, το μικρόβιο οξειδώνεται και αμέσως πεθαίνει. Ο μη ειδικός τρόπος δράσης των νανοσωματιδίων έναντι των βακτηρίων τα καθιστά ιδανικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες χωρίς κίνδυνο ανάπτυξης βακτηριακής αντοχής (Arabi et al., 2012). Η πλήρης αναστολή της βακτηριακής δράσης εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του nZnO και από τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων. Έτσι, είναι προφανές από τη βιβλιογραφία ότι το nZnO έχει εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες και μπορεί να ενσωματωθεί σε ζωοτροφές ως παράγοντας προαγωγής της ανάπτυξης ή για την πρόληψη της εμφάνισης ασθενειών. Στο μέλλον, η έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί στη χρήση του nZnO ως εναλλακτική λύση στις συμβατικές μορφές Zn που χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό των ζωοτροφών.

#### 5.2.7 Τοξικότητα του nZn

Ο δυνητικός κίνδυνος από υψηλές συγκεντρώσεις του nZn είναι ακόμα άγνωστος και τα τοξικολογικά τους δεδομένα είναι μάλλον ασυνήθιστα. Ωστόσο, η τοξικότητα του Zn στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές έχει αναφερθεί. Οι περισσότερες τοξικολογικές μελέτες έχουν γίνει σε τρωκτικά όπως σε *in vivo* μοντέλα λόγω της ομοιότητας στις βιοχημικές και φυσιολογικές οδούς με τον ανθρώπινο μεταβολισμό (Swain et al., 2016). Παρατηρήθηκαν στα πρόβατα παθολογικές μεταβολές εξαιτίας της τοξικότητας του Zn στο πάγκρεας, το νεφρό, το ήπαρ, το λεπτό έντερο και τα επινεφρίδια. Το ήπαρ, η σπλήνα, η καρδιά, το πάγκρεας και τα οστά είναι τα όργανα στόχοι του nZnO στην έκθεση από το στόμα. Στην ιστοπαθολογική εξέταση, το nZnO έχει κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από τη δόση και το χρόνο και ο μηχανισμός του μεταφέρεται με οξειδωτικό στρες, υπεροξειδωση λιπιδίων, βλάβη κυτταρικής μεμβράνης και οξειδωτική βλάβη του DNA (Najafzadeh et al., 2013). Τα νανοσωματίδια οξειδίου ψευδαργύρου προκάλεσαν τοξικότητα στα κύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών προκαλώντας οξειδωτική βλάβη, διέγερση φλεγμονής και κυτταρικό θάνατο.

Οι τοξικές επιδράσεις των νανοσωματιδίων εξαρτώνται από το μέγεθος και το nZn έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο τοξικό από το μικρό μέγεθος Zn στην ίδια δόση. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου τείνουν να συσσωρεύονται στους ιστούς του ήπατος προκαλώντας έτσι τοξικότητα. Οι Najafzadeh et al. (2013) ανέφεραν ήπια ηπατική τοξικότητα (οίδημα και εκφυλισμό στα ηπατοκύτταρα) και σοβαρή νεφρική βλάβη σε αρνιά λόγω χορήγησης nZn σε δόση 20 mg / kg σωματικού βάρους από το στόμα για περίοδο 25 ημέρες. Σε ποντίκια, η θνησιμότητα δεν παρατηρήθηκε ακόμη και με χορήγηση 20 ή 120 nm ZnO σε 1 g / kg σωματικού βάρους από το στόμα. Τα ένζυμα του ήπατος όπως η ALT και AST και η περιεκτικότητα σε ALP στον ορό αυξήθηκαν σε ποντίκια με ομάδα επεξεργασμένη με nZnO σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (Sharma et al., 2012). Με τη χορήγηση nZnO σε δόση 300 mg / kg από το στόμα σε ποντικούς για 14 συνεχείς ημέρες, αναφέρθηκαν αυξημένα επίπεδα ορού ALT και ALP και παθολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ (Sharma et al., 2012).

Οι κυτταροτοξικές επιδράσεις της χορήγησης ζωοτροφών με nZnO περιλαμβάνουν επαγόμενο οξειδωτικό στρες και αύξηση της υπεροξειδωσης λιπιδίων τελικά προκαλώντας απόπτωση (Sharma et al., 2012) και συσσώρευση του nZnO στο ήπαρ. Η τοξικότητα του Zn αναφέρεται ότι συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του ελεύθερου ιόντος. Το nZnO είναι λιγότερο τοξικό από τα αντίστοιχα ανόργανα άλατα όπως το ZnCl<sub>2</sub> (Kool, Ortiz, & van Gestel, 2011).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ιχνοστοιχεία, όπως ο ψευδάργυρος, είναι απαραίτητα για την υγεία, την ανάπτυξη, την παραγωγή και την αναπαραγωγή των ζώων. Ο ψευδάργυρος είναι σημαντικός για τη λειτουργία πολλών ενζύμων και πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες στο οργανισμό των ζώων.

Οι σύγχρονες δίαιτες για το ζωικό κεφάλαιο περιέχουν συνήθως περισσότερο Zn από ό, τι θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει ο οργανισμός. Αυτό το πλεόνασμα μπορεί να συσσωρευτεί εντός του ίδιου του οργανισμού καθώς και του περιβάλλοντος και εκφράζει ένα ισχυρό τοξικό δυναμικό. Δεδομένου ότι το νόμιμο εύρος δόσης για τα περιθώρια ασφαλείας μειώνεται λόγω των αυστηρότερων νομικών ρυθμίσεων εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, οι ζωοτροφές πρέπει να παρέχουν στα ζώα τις πραγματικές απαιτήσεις σε Zn. Αυτό είναι εφικτό μόνο εάν εφαρμοστούν όλα τα μέτρα που αυξάνουν και σταθεροποιούν τη βιοδιαθεσιμότητα της τροφής σε Zn. Τέλος, πρέπει να παρέχονται αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την απαίτηση για μικρές ποσότητες Zn υπό ποικίλες πρακτικές συνθήκες, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές στη διαθεσιμότητα Zn φυσικής προέλευσης και εμπλουτισμένου μέσω κατάλληλων ζωοτροφών, τον ανταγωνισμό μεταξύ Zn και άλλων διαιτητικών παραγόντων, και την κατάσταση του ζώου.

Ο ζωικός οργανισμός καταπολεμά ενεργά την υπερβολική διατροφική συμπλήρωση των ιχνοστοιχείων, οδηγώντας σε εμπλουτισμό της κόπρου με βαρέα μέταλλα. Αυτό μπορεί να προωθήσει τη συσσώρευση στο περιβάλλον με διάφορες αρνητικές συνέπειες που προκύπτουν από αυτό. Προκειμένου να μειωθούν οι εκπομπές βαρέων μετάλλων από τη ζωική παραγωγή, πρέπει να αποφευχθεί η χρήση φαρμακολογικών δόσεων και να αυξηθεί σημαντικά η ακριβής χορήγηση ιχνοστοιχείων μέσω της τροφής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την παροχή κατάλληλων πληροφοριών για το ιχνοστοιχείο υπό διαφορετικές συνθήκες χορήγησης.

Ο ρόλος του Zn στο ζωικό σύστημα είναι καλά κατανοητός και τεκμηριωμένος. Αλλά ο Zn από συμβατικές πηγές είναι λιγότερο διαθέσιμος στο σώμα και ως εκ τούτου αποβάλλεται ως επί το πλείστον στο περιβάλλον προκαλώντας ρύπανση του περιβάλλοντος. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου ( $nZn$ ), ως υποκατάστατο των συμβατικών πηγών Zn, μπορεί να είναι μια καλή εναλλακτική λύση στη διατροφή των ζώων. Εκτός από την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, οι εκθέσεις έχουν επισημάνει την ανάπτυξη που προάγει, τα αντιβακτηριακά, ανοσορυθμιστικά και πολλά άλλα ευεργετικά αποτελέσματά του. Αυτό

εξυπηρετεί επίσης όλους τους σκοπούς των συμβατικών πηγών Zn και βοηθά σε όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες. Έτσι, το nZn μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλότερες δόσεις σε ζωοτροφές για να παρέχει καλύτερα αποτελέσματα από τις συμβατικές πηγές Zn και επίσης να αποτρέπει έμμεσα την περιβαλλοντική μόλυνση. Οι τοξικολογικές μελέτες παρέχουν μικτά αποτελέσματα σε ζωικά μοντέλα. Συνεπώς, συνιστώνται διεξοδικές και συστηματικές μελέτες για την αποσαφήνιση των τοξικών επιδράσεων, σε οποιαδήποτε σταθεροποίηση της δόσης, καθώς και για τις διαδικασίες οικονομικής παραγωγής, ώστε να ξεκινήσει το ταξίδι του nZn σε λογικά συμπεράσματα.

Η νανοεπιστήμη βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο στον τομέα της ενσωμάτωσης ιχνοστοιχείων στη διατροφή των ζώων και απαιτούνται περαιτέρω εργασίες στο μέλλον για την κατανόηση της επίδρασης των νανο-ιχνοστοιχείων, της θέσης απορρόφησής τους, του μηχανισμού απορρόφησης, της μοριακής κατανομής και του τρόπου δράσης τους. Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης μπορούν επίσης να σχεδιαστούν σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαφορετικών μελετών και μπορούν να συγκριθούν με το επίπεδο έκφρασης των συμβατικών πηγών Zn για να καθοριστεί η αποτελεσματικότητά τους. Παράλληλα, πρέπει να μελετηθεί η πιθανή τοξικολογική επίδραση τόσο στα μηρυκαστικά όσο και στα μη μηρυκαστικά ζώα μαζί με τις τοξικές δόσεις πριν να χρησιμοποιηθούν στις ζωοτροφές. Περαιτέρω, η έρευνα θα πρέπει να κατευθύνεται για να βρεθούν τα βέλτιστα επίπεδα nZn σε αναλογία που μπορεί να προσφέρει καλύτερες επιδόσεις και οικονομικά οφέλη.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarestrup, F., Cavaco, L., & Hasman, H. (2010). Decreased susceptibility to zinc chloride is associated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in Danish swine. *Veterinary Microbiology*, *142*, 455–457.
- Aarestrup, F., & Hasman, H. (2004). Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology*, *100*, 83–89.
- Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., Arif, M., Chaudhry, M. T., Emam, M., & Patra, A. (2017). Organic or inorganic zinc in poultry nutrition: A review. *World's Poultry Science Journal*, *73*(4), 904–915. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000769>
- Adam, V., Blaštík, O., Křížková, S., Lubal, P., Kukačka, J., Průša, R., & Kizek, R. (2008). Application of the Brdicka reaction in determination of metallothionein in patients with tumours. *Chemické Listy*, *102*, 51–58.
- Arabi, F., Imandar, M., Negahdary, M., Imandar, M., Noughabi, M., & Akbari-dastjerdi, H. (2012). Investigation anti-bacterial effect of zinc oxide nanoparticles upon life of *Listeria monocytogenes*. *Annals of Biological Research*, *3*, 3679–3685.
- Asada, K., Toyota, K., Nishimura, T., Jun-Ichi, I., & Hori, K. (2010). Accumulation and mobility of zinc in soil amended with different levels of pig-manure compost. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *45*(4), 285–292. <https://doi.org/10.1080/03601231003704580>
- Baker-Austin, C., Wright, M., Stepanauskas, R., & McArthur, J. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, *14*, 176–182.
- Bednorz, C., Oelgeschla, K., Kinnemann, B., Hartmann, S., & Neumann, K. (2013). The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*, 396–403.
- Bettger, W., Savage, J., & O'Dell, B. (1981). Extracellular Zn concentration and watermetabolism in chicks. *Journal of Nutrition*, *111*, 1013–1019.
- Blair, J., Richmond, G., & Piddock, L. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, *9*(10), 1165–1177.

<https://doi.org/10.2217/FMB.14.66>

- Brugger, D., Buffler, M., & Windisch, W. (2014). Development of an experimental model to assess the bioavailability of zinc in practical piglet diets. *Archives of Animal Nutrition*, 68(2), 73–92. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.898392>
- Brugger, D., & Windisch, W. (2015). Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements. *Animal Nutrition*, 1(3), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.005>
- Brugger, D., & Windisch, W. (2017). Strategies and challenges to increase the precision in feeding zinc to monogastric livestock. *Animal Nutrition*, 3(2), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.03.002>
- Byrne, J. (2019). Zero use in zinc oxide in EU pig production: Danish researchers are on the case. Retrieved from <https://www.feednavigator.com/Article/2019/01/25/Team-aiming-for-zero-use-of-zinc-oxide-in-EU-pig-production>
- Byun, Y., Lee, C., Kim, M., Jung, D., Han, Jang, I., ... Park, B. (2018). Effects of dietary supplementation of a lipid-coated zinc oxide product on the fecal consistency, growth, and morphology of the intestinal mucosa of weanling pigs. *Journal of Animal Science and Technology*, 60(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0161-0>
- Cavaco, L., Hasman, H., & Aarestrup, F. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Veterinary Microbiology*, 150, 344–348.
- Cavaco, L., Hasman, H., Stegger, M., Andersen, P., Skov, R., & Fluit, A. (2010). Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3605–3608.
- Chen, J., Wang, W., & Wang, Z. (2011). Effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation in vitro. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 8, 23.
- Chibuike, G. U., & Obiora, S. C. (2014). Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods. *Applied and Environmental Soil Science*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/752708>
- Colagar, A., Marzony, E., & Chaichi, M. (2009). Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research*, 29(2), 82–88.

- Cousins, R., Liuzzi, J., & Lichten, L. (2006). Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(34), 24085–24089. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600011200>
- Cowieson, A. J. (2005). Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Animal Feed Science and Technology*, *119*(3-4), 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.017>
- Cui, H., Peng, X., Junliang, D., & Guang, Y. (2004). Pathology of lymphoid organs in chickens fed a diet deficient in Zn. *Avian Pathology*, *32*, 2509–2264.
- Droke, E., & Spears, J. (1993). In vitro and in vivo immunological measurements in growing lambs fed diets deficient, marginal or adequate in Zn. *Journal of Nutrition and Immunology*, *2*, 71–90.
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on safety and efficacy of zinc compounds (E6) as feed additive for all species: zinc sulphate monohydrate, based on a dossier submitted by Grillo-Werke AG/EMFEMA. *EFSA Journal*, *10*(6), 2734–2757.
- EFSA. (2016). Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. *EFSA Journal*, *12*(5), 1–77. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3668>
- Ettle, W., Windisch, F. X., & Strain, J. J. (2005). TEMA 12: 12th international symposium on trace elements in man and animals. In *University of Ulster, Coleraine, Northern Ireland, United Kingdom* (p. 55).
- European Medicine Agency (EMA). (2017). *No 394961/2017: Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to foodproducing species.*
- European Union. (2005). *Regulation (EC) No. 1495/2005 of the European Parliament and of the Council of 8. Sept. 2005 amending the conditions for authorisation of a number of feed additives belonging to the group of trace elements.*
- Feldpausch, J., Weber, P., Hill, G., Link, J., & Mahan, D. (2013). Effect of organic Zn supplementation on metallothionein and Zn transporter-1mRNA expression in duodenum of grow-finish pigs. *Journal of Animal Science*, *91*, 4.
- Feng, M., Wang, Z., Zhou, A., & Ai, D. (2009a). The effects of different sizes of nanometer zinc oxide on the proliferation and cell integrity of mice duodenum-epithelial cells in primary

- culture. *Pakistan Journal of Nutrition*, *8*, 1164–1166.
- Feng, M., Wang, Z., Zhou, A., & Ai, D. (2009b). The effects of different sizes of nanometer zinc oxide on the proliferation and cell integrity of mice duodenum-epithelial cells in primary culture. *Pakistan Journal of Nutrition*, *8*(8), 1164–1166.
- Forsberg, C., Meidinger, R., Liu, M., Cottrill, M., Golovan, S., & Phillips, J. (2013). Integration, stability and expression of the *E. coli* phytase transgene in the Cassie line of Yorkshire Enviropig™. *Transgenic Research*, *22*(2), 379–389. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9646-7>
- Fry, R. S., Ashwell, M. S., Lloyd, K. E., O’Nan, A. T., Flowers, W. L., Stewart, K. R., & Spears, J. W. (2012). Amount and source of dietary copper affects small intestine morphology, duodenal lipid peroxidation, hepatic oxidative stress, and mRNA expression of hepatic copper regulatory proteins in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, *90*(9), 3112–3119. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4403>
- Gielda, L., & DiRita, V. (2012). Zinc competition among the intestinal microbiota. *MBio*, *3*, e00171–12.
- Goldhaber, S. (2003). Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *38*(2), 232–242. [https://doi.org/10.1016/S0273-2300\(02\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0273-2300(02)00020-X)
- Golovan, S., Meidinger, R., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M., Barney, D., ... Forsberg, C. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, *19*(8), 741–745. <https://doi.org/10.1038/90788>
- Goselink, R. M. A., & Jongbloed, A. W. (2012). Zinc and copper in dairy cattle feeding. *Wageningen UR Livestock Research*, 1–32.
- Gowanlock, D., Mahan, D., Jolliff, J., & Hill, G. (2015). Evaluating the influence of the National Research Council levels of Cu, Fe, Mn, and Zn using organic (Bioplex) minerals on resulting tissue mineral concentrations, metallothionein, and liver antioxidant enzymes in grower-finisher swine diets. *Journal of Animal Science*, *93*, 1149–1156.
- Graham, T., Feldman, B., Farver, T., Labacitch, F., O’Neill, S., Thurmond, M., ... Holmberg, C. (1991). Zn toxicosis of Holstein veal calves and its relationship to haematological change and associated thrombotic state. *Comparative Haematology International*, *1*, 121–128.
- Guan, T. X., He, H. B., Zhang, X. D., & Bai, Z. (2011). Cu fractions, mobility and bioavailability in



- soil-wheat system after Cu-enriched livestock manure applications. *Chemosphere*, *82*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.018>
- Hill, G., Cromwell, G., Crenshaw, T., Dove, C., Ewan, R., Knabe, D., ... Veum, T. (2000). Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of Zn and Cu to weanling pigs (regional study). *Journal of Animal Science*, *78*, 1010–1016.
- Hill, G., Miller, E., Whetter, P., & Ullrey, D. (1983). Concentrations of minerals in tissues of pigs from dams fed different levels of dietary Zn. *Journal of Animal Science*, *57*, 130–138.
- Hill, G., & Shannon, M. (2019). Copper and Zinc Nutritional Issues for Agricultural Animal Production. *Biological Trace Element Research*, *188*(1), 148–159. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1578-5>
- Hoekstra, W., Falti, E., Lin, C., Robers, H., & Grummer, R. (1967). Zn deficiency in reproducing gilts fed a diet high in Ca and its effect on tissue Zn and blood serum alkaline phosphatase. *Journal of Animal Science*, *26*(6), 1348–1357.
- Højberg, O., Canibe, N., Poulsen, H., Hedemann, M., & Jensen, B. (2005). Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(5), 2267–2277. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2267-2277.2005>
- Hölzel, C., Müller, C., Harms, K., Mikolajewski, S., Schäfer, S., & Schwaiger, K. (2012). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, *113*, 21–27.
- Hölzel, C., Müller, C., Harms, K., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Schwaiger, K., & Bauer, J. (2012a). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, *113*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.01.002>
- Hölzel, C., Müller, C., Harms, K., Mikolajewski, S., Schäfer, S., Schwaiger, K., & Bauer, J. (2012b). Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, *113*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2012.01.002>
- Hongfu, Y. (2008). Effects of Nano-ZnO on growth performance and diarrhea rate in weaning piglets. *China Feed*, *1*, 008.
- Humer, E., Schwarz, C., & Schedle, K. (2015). Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *99*(4), 605–625.

- Jahanian, R., Nassirimoghaddam, H., Rezaei, A., & Haghparast, A. R. (2008). The influence of dietary zinc-methionine substitution for zinc sulphate on broiler chick performance. *Journal of Biological Sciences*, *8*, 321–328.
- Jahanian, R., & Rasouli, E. (2015). Effects of dietary substitution of zinc-methionine for inorganic zinc sources on growth performance, tissue zinc accumulation and some blood parameters in broiler chicks. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *99*, 50–58.
- Kickinger, T., Würzner, H., & Windisch, W. (2009). Zinc and copper in feeds, slurry and soils from Austrian pig fattening farms feeding commercial complete feed or feed mixtures produced on-farm. *Bodenkultur*, *60*(4), 47–56.
- Kool, P., Ortiz, M., & van Gestel, C. (2011). Chronic toxicity of ZnO nanoparticles, non-nano ZnO and ZnCl<sub>2</sub> to *Folsomia candida* (Collembola) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Pollution*, *159*, 2713–2719.
- Krebs, N. (2000). Zinc and Health : Current Status and Future Directions Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract 1 , 2. *Society*, *130*(February), 1374–1377.
- Kumar, R., Park, B., & Cho, J. (2013). Application and environmental risks of livestock manure. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *56*(5), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3184-8>
- Lichten, L., & Cousins, R. (2009). Mammalian Zinc Transporters: Nutritional and Physiologic Regulation. *Annual Review of Nutrition*, *29*(1), 153–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-033009-083312>
- Lina, T., Fenghua, Z., Huiying, R., Jianyang, J., & Wenli, L. (2009). Effects of nano-zinc oxide on antioxidant function in broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, *04*.
- Liu, Y., Espinosa, C., Abelilla, J., Casas, G., Lagos, L. V, Lee, S., ... Stein, H. (2018). Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. *Animal Nutrition*, *4*(2), 113–125. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2018.01.007>
- Martin, L., Lodemann, U., Bondzio, A., Gefeller, E., Vahjen, W., Aschenbach, J., ... Pieper, R. (2013). A High Amount of Dietary Zinc Changes the Expression of Zinc Transporters and Metallothionein in Jejunal Epithelial Cells in Vitro and in Vivo but Does Not Prevent Zinc Accumulation in Jejunal Tissue of Piglets. *The Journal of Nutrition*, *143*(8), 1205–1210.

<https://doi.org/10.3945/jn.113.177881>

- Martin, L., Pieper, W., & Zentek, J. (2013). Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of dietary zinc. *Archives of Animal Nutrition*, *67*(3), 248–261. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2013.801138>
- Martínez-Montemayor, M., Hill, G., Raney, N., Rilington, V., Tempelman, R., Link, J., ... Ernst, C. (2008). Gene expression profiling in hepatic tissue of newly weaned pigs fed pharmacological zinc and phytase supplemented diets. *BMC Genomics*, *9*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-421>
- Mishra, A., Swain, R., Mishra, S., Panda, N., & Sethy, K. (2014). Growth performance and serum biochemical parameters as affected by nano zinc supplementation in layer chicks. *Indian Journal of Animal Nutrition*, *31*, 384–388.
- Mohammadi, V., Ghazanfari, S., Mohammadi-Sangcheshmeh, S., & Nazaran, M. H. (2015). (2015) Comparative effects of zinc-nano complexes, zinc-sulphate and zinc methionine on performance in broiler chickens. *British Poultry Science*, *56*, 486–493.
- Mussill, J. (1941). Zinkmangel als ursache des nichtrinderns. *Wien Tierärztl Monatsschr*, *28*, 136.
- Najafzadeh, H., Ghoreishi, S., Mohammadian, B., Rahimi, E., Afzalzadeh, M., & Kazemivarnamkhasti, M. (2013). Serum biochemical and histopathological changes in liver and kidney in lambs after zinc oxide nanoparticles administration. *Veterinary World*, *6*, 534–537.
- Nicholson, F. A., Chambers, B. J., Williams, J. R., & Unwin, R. J. (1999). Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technology*, *70*(1), 23–31. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00017-6)
- NRC. (2006). *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids*. Washington, D.C., USA: Nat. Acad. Press.
- NRC. (2012). *Nutrient requirements of swine*. Washington, D.C., USA: Nat. Acad. Press.
- Ott, E., & Asquith, R. (1989). The influence of mineral supplementation on growth and skeletal development of yearling horses. *Journal of Animal Science*, *67*, 2831–2840.
- Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles- an

antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9, 1–7.

Parashuramulu, S., Nagalakshmi, D., Rao, D. S., Kumar, M. K., & Swain, P. S. (2015). Effect of zinc supplementation on antioxidant status and immune response in buffalo calves. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 15(2), 179–188. <https://doi.org/10.5958/0974-181X.2015.00020.7>

Pieper, R., Martin, L., Schunter, N., Villodre Tudela, C., Weise, C., Klopffleisch, R., ... Bondzio, A. (2015). Impact of high dietary zinc on zinc accumulation, enzyme activity and proteomic profiles in the pancreas of piglets. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.01.008>

Raad, I., Hanna, H., Boktour, M., Chaiban, G., Hachem, R., & Dvorak, T. (2005). Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, esp gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 5046–5050.

Rahman, M. M., Wahed, M. A., Fchs, G. J., Bayui, A. H., & Alvarez, J. I. (2002). Synergetic effect of zinc and vitamin A on the biochemical indexes of vitamin A nutrition in children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1, 92–98.

Rajendran, D., Kumar, G., Ramakrishnan, S., & Shibi, T. K. (2013). Enhancing the milk production and immunity in Holstein Friesian crossbred cow by supplementing novel nano zinc oxide. *Research Journal of Biotechnology*, 8(5), 11–17.

Rincker, M., Hill, G., Link, J., Meyer, A., & Rowntree, J. (2005). Effects of dietary Zn and Fe supplementation on mineral excretion, body composition, and mineral status of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 83, 2762–2774.

Robbins, K. R., Saxton, A. M., & Southern, L. L. (2006). Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *Journal of Animal Science*, 84, 155–165. [https://doi.org/10.2527/2006.8413\\_supplE155x](https://doi.org/10.2527/2006.8413_supplE155x)

Rout, G., & Das, P. (2003a). Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23, 3–11. <https://doi.org/10.1051/agro>

Rout, G., & Das, P. (2003b). Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23, 3–11. <https://doi.org/10.1051/agro>

Roy, B., Baghel, R., Mohanty, T., & Mondal, G. (2013). Zinc and male reproduction in domestic animals: a review. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 30(4), 339–350.

- Sahoo, A., Swain, R., Mishra, S., & Jena, B. (2014). Serum biochemical indices of broiler birds fed on inorganic, organic and nano zinc supplemented diets. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5, 2078–2081.
- Sauvé, S., Cook, N., Hendershot, W., & McBride, M. (1996). Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environmental Pollution*, 94(2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00081-4)
- SCF. (2003). *Opinion of the scientific committee on food on the tolerable upper intake level of zinc*.
- Seiler, C., & Berendonk, T. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3, 399.
- Sharma, V., Singh, P., Pandey, A., & Dhawan, A. (2012). Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse after liver sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745, 84–91.
- Shi, J., Yu, X., Zhang, M., Lu, S., Wu, W., Wu, J., & Xu, J. (2011). Potential risks of copper, zinc, and cadmium pollution due to pig manure application in a soil-rice system under intensive farming: A case study of Nanhu, China. *Journal of Environmental Quality*, 40(6), 1695–1704. <https://doi.org/10.2134/jeq2010.0316>
- Shi, T., Ma, J., Wu, F., Ju, T., Gong, Y., Zhang, Y., ... Shi, H. (2019). Mass balance-based inventory of heavy metals inputs to and outputs from agricultural soils in Zhejiang Province, China. *Science of The Total Environment*, 649, 1269–1280. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.414>
- Sloup, V., Jankovská, I., Nechybová, S., Peřínková, P., & Langrová, I. (2017). Zinc in the Animal Organism: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 48(1), 13–21. <https://doi.org/10.1515/sab-2017-0003>
- Smith, D. R., Owens, P. R., Leytem, A. B., & Warnemuende, E. A. (2007). Nutrient losses from manure and fertilizer applications as impacted by time to first runoff event. *Environmental Pollution*, 147(1), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.021>
- Smith, J. I., Tokach, M., Goodband, R., Nelssen, J., & Richert, B. (1997). Effects of the

- interrelationship between Zn oxide and Cu sulfate on growth performance of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, *75*, 1861–1866.
- Smith, J. W., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelssen, J. L., & Richert, B. T. (1997). Effects of the Interrelationship between Zinc Oxide and Copper Sulfate on Growth Performance of Early-Weaned Pigs. *Journal of Animal Science*, *75*(7), 1861–1866. <https://doi.org/10.2527/1997.7571861x>
- Spears, J., & Kegley, E. (2002). Effect of Zn source (Zn oxide vs Zn proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *Journal of Animal Science*, *80*, 2747–2752.
- Starke, I., Zentek, J., & Vahjen, W. (2013). Ex Vivo - Growth Response of Porcine Small Intestinal Bacterial Communities to Pharmacological Doses of Dietary Zinc Oxide. *PLoS ONE*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056405>
- Swain, P., Rao, S., Rajendran, D., Dominic, G., & Selvaraju, S. (2016). Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. *Animal Nutrition*, *2*(3), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.06.003>
- Ullrey, D., Miller, E., Brent, B., Bradley, B., & Hoefler, J. (1967). Swine hematology from birth to maturity. IV. Serum Ca, Mg, Na, K, Cu, Zn and inorganic P. *Journal of Animal Science*, *26*, 1024–1029.
- Underwood, E. (1981). *The mineral nutrition of livestock*. Slough England: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Vahjen, W., Pietruszyńska, D., Starke, I., & Zentek, J. (2015). High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathogens*, *7*(1), 3–7. <https://doi.org/10.1186/s13099-015-0071-3>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Wang, X., Fosmire, G., Gay, C., & Leach, Rm. (2002). Short-term Zn deficient inhibits chondrocyte proliferation and induces cell apoptosis in the epiphyseal growth plate in young chickens. *Journal of Nutrition*, *132*, 665–673.
- Windisch, H. W., & Kirchgessner, M. (1999). Zinc absorption and excretions in adult rats at zinc deficiency induced by dietary phytate additions: I. Quantitative zinc metabolism of <sup>65</sup>Zn-

- labelled adult rats at zinc deficiency. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 82(2-3), 106–115. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1999.00219.x>
- Windisch, W., & Kirchgessner, M. (1995). The effects microbial phytase on the apparent digestibility and total utilization of iron, copper, zinc and manganese at varying Ca supply to piglets and broilers. *Agribiological Research*, 49, 23–29.
- Wong, J. W. C., Ma, K. K., Fang, K. M., & Cheung, C. (1999). Utilization of a manure compost for organic farming in Hong Kong. *Bioresource Technology*, 67(1), 43–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00066-8)
- Wright, C., & Spears, J. (2003). Effect of Zn source and dietary level on Zn metabolism in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 87, 1085–1091.
- Wuana, R., & Okieimen, F. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soil1. Wuana RA, Okieimen FE. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. ISRN Ecol [Internet]. 2011;2011:1–20. Available from: <http://www.hindawi.co>. *ISRN Ecology*, 2011, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- Xiong, X., Yanxia, L., Wei, L., Chunye, L., Wei, H., & Ming, Y. (2010). Copper content in animal manures and potential risk of soil copper pollution with animal manure use in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(11), 985–990. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2010.02.005>
- Yazdankhah, S., Rudi, K., & Bernhoft, A. (2014). Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 25(0), 1–7. <https://doi.org/10.3402/mehd.v25.25862>
- Zaboli, K., Aliarabi, H., Bahari, A., & Abbasalipourkabir, R. (2013). Role of dietary nano-zinc oxide on growth performance and blood levels of mineral: a study on in Iranian Angora (Markhoz) goat kids. *Journal of Pharmaceutical & Health Sciences*, 2, 19–26.
- Zalewski, P., Ai, Q., Dion, G., Lata, J., Chiara, M., & Richard, E. (2005). Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets: a review. 2005;105:127e49. *Pharmacology & Therapeutics*, 105, 127–149.
- Zhao, C., Tan, S., Xiao, X., Qiu, X., Pan, J., & Tang, Z. (2014). Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. *Biological*

*Trace Element Research*, 160(3), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0052-2>

Zhou, D., Hao, X., Wang, Y., Dong, Y., & Cang, L. (2005). Copper and Zn uptake by radish and pakchoi as affected by application of livestock and poultry manures. *Chemosphere*, 59(2), 167–175. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.11.008>