

Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine
Katedra za ishranu i botaniku

Marija S. Pavlović

**Uticaj dodavanja neorganskog fosfora
različitog porekla u ishrani brojlera na
proizvodne rezultate i stepen
mineralizacije koštanog sistema**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.godina

University of Belgrade
Faculty of Veterinary medicine
Department of Nutrition and Botany

Marija S. Pavlović

**Impact of different inorganic
phosphorus sources in broilers feed on
production performances and bone
mineralization**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

MENTOR:

Dr Radmila Marković, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarske medicine

Katedra za ishranu i botaniku

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Dragan Šefer, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarske medicine

Katedra za ishranu i botaniku

Dr Nikola Krstić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarske medicine

Katedra za radiologiju i radijacionu higijenu

Dr Milan Ž. Baltić, redovni profesor u penziji

Univerzitet u Beogradu, Fakultet Veterinarske medicine

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

Dr Ksenija Nešić, viši naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Datum odbrane doktorske disertacije

Mojoj majci Mileni (1952 – 2012)
Gde god da si, zauvek smo zajedno...

Mome ocu Slobodanu i sestri Ivani
hvala na bezuslovnoj ljubavi i podršci.

Uticaj dodavanja neorganskog fosfora različitog porekla u ishrani brojlera na proizvodne rezultate i stepen mineralizacije koštanog sistema

Rezime

Fosfor je mineral od esencijalnog značaja, budući da je uključen u većinu metaboličkih funkcija u organizmu. Biološka iskoristivost ovog minerala iz biljnih hraniva je ograničena, usled toga što je u njima fosfor prisutan u formi fitinske kiseline i njenih soli - fitata. Stoga je neophodno uključivanje neorganskih izvora fosfora u obrok za živinu, u cilju obezbeđivanja optimalnih količina fosfora dostupnog organizmu za apsorpciju. Brojni su faktori koji utiču na stepen apsorpcije fosfora iz kompletne smeše (koncentracija ukupnog fosfora u hrani, odnos fitinske i nefitinske komponente, koncentracija kalcijuma u smeši, odnos kalcijuma i fosfora, prisustvo vitamina D, uzrast i genotip jedinki...).

Cilj ovde izvedenog ogleda je da se ispita uticaj ishrane brojlera obrocima sa i bez dodatog monokalcijum fosfata, kao izvora neorganskog fosfora u hrani, na proizvodne rezultate, iskoristivost fosfora i zdravstveno stanje brojlera, sa posebnim osvrtom na stepen mineralizacije koštanog sistema.

U ogled je uključeno 300 jednodevne piladi i, to tri grupe po 100 jedinki ujednačnih po polu i telesnoj masi. Ogledni period podeljen je u tri faze (1 -21. dan, 22 - 35. dan i 36 - 42. dan), tokom kojih se ishrana piladi razlikovala samo u pogledu sadržaja i porekla mineralnih hraniva. Kontrolna grupa piladi hranjena je hranom bez dodatog mineralnog hraniva, dok je u hranu ogledne grupe O - I uključen monokalcijum fosfat proizvođača „Elixir Feed“ DOO iz Šapca, a u hranu ogledne grupe O - II uvozni monokalcijum fosfat.

Tokom ogleda praćeni su proizvodni rezultati (telesna masa, ukupni i dnevni prirast, konzumacija hrane, konverzija hrane). Po 10 jedinki iz svake ogledne grupe prebačeno je 11. i 25. dana u metaboličke kaveze, da bi se obezbedilo uzimanje uzoraka fecesa u cilju ispitivanja prividne i prave

svarljivosti fosfora. Od po šest jedinki iz svake grupe 42. dana ogleda uzeti su uzorci krvnog seruma, kao i kosti tibija i tarzus, obe noge.

Značaj fosfora u ispoljavanju maksimalnih proizvodnih performansi ustanovljen je u ogledu, najpre kroz zaostajanje u telesnom rastu kontrolne grupe piladi, koja je pokazala statistički značajno manje sve praćene proizvodne parametre, u odnosu na preostale dve ogledne grupe. Dalje, ogledna grupa O - I ispoljila je bolje proizvodne rezultate, zbirno posmatrano, u poređenju sa oglednom grupom O - II, što ukazuje na veći stepen iskoristivosti ovde korišćenog monokalcijum fosfata. Kod iste ogledne grupe (O - I), izračunat je i veći stepen ukupne prividne, kao i prave svarljivosti fosfora. Ostali ispitivani parametri kompatibilni su utvrđenim procentima svarljivosti fosfora, pa je kontrolna grupa imala najniže koncentracije fosfora i kalcijuma u krvnom serumu, dok je ogledna grupa O - I imala najviše izmerene koncentracije ovih minerala. S' druge strane, aktivnost alkalne fosfataze pokazala je samo numeričke razlike, budući da je uslovljena drugim faktorima (hormonalnim statusom i sl.). Ispitivane karakteristike koštanog tkiva (radiološka, fizička, morfometrijska i hemijska ispitivanja) takođe ukazuju na potencijalne benefite upotrebe monokalcijum fosfata koji je kroz hranu dobijala ogledna grupa O - I, proizvođača „Elixir Feed“ DOO iz Šapca.

Poređenjem metodologija u ispitivanju svarljivosti fosfora, dolazi se do zaključka da su kvantitativne metode (prava i prividna svarljivost) najpodesnije u ispitivanjima ovog tipa, najpre zbog visoke senzitivnosti, ali i zbog toga što pružaju informacije od praktičnog i upotrebnog značaja za potencijalnu korekciju obroka. Kvalitativne metode, s druge strane, pružaju značajne podatke o biološkoj dostupnosti fosfora, koji se odnose na stepen osifikacije koštanog tkiva kao depoa fosfora, a nemaju značaj za direktnu evaluaciju mineralnog hraniva.

Zaključno, može se podvući da je ogledna grupa O - I, posmatrajući sve ispitivane parametre sumarno, pokazala najveći stepen iskoristivosti fosfora iz kompletne smeše, pa posledično i ovde korišćenog mineralnog hraniva. Stoga,

monokalcijum fosfat koji je u ovoj grupi predstavljao neorganski izvor fosfora kvalitativno je vredniji izvor fosfora dostupnog organizmu.

Ključne reči: živina, brojleri, fosfor, monokalcijum fosfat, svarljivost, kost, mineralizacija

Naučna oblast: Ishrana

Uža naučna oblast: Ishrana

UDK broj: 614.95 : 636.5 : 661'2'

Impact of different inorganic phosphorus sources in broilers feed on production performances and bone mineralization

Summary

Phosphorus (P) is an essential mineral for animals, due to its role in majority of metabolic functions. Bioavailability of P from plant feed is limited, because P in plants is present in the form of phytic acid or its salts - phytates. Thus, the inclusion of inorganic phosphorus sources in poultry feed is necessary in order to ensure optimum amounts of available phosphorus. Numerous factors affect the level of absorption of the phosphorus from the complete mixture (concentration of total phosphorus in the diet, ratio of phytin and non-phytin component, concentration of calcium in the mixture, calcium and phosphorus ratio, vitamin D, age and genotype...). The aim of this trial was to examine the impact of feeding broilers with and without addition of monocalcium phosphate in complete feed mixture, on production performances, phosphorus digestibility and health condition of broilers, with a special focus on bone mineralization. The trial included 300 one-day-old broilers, both sexes, which were randomly divided into three groups - by one hundred birds each. The experiment lasted 42 days, and was divided into three periods (days 1 - 21 for starter, days 22 - 35 for grower, and days 36 - 42 for finisher). One group of broilers (control group) was fed diet without the addition of MCP (basal diet). The other two groups of broilers received diets with the addition of two different kinds of MCP (the one was originating from "Balakovo Mineral Fertilizers", Balakovo, Russia (O - II experimental group), and the other one was produced by "Elixir Feed" DOO, Šabac, Serbia (O - I experimental group)). The production results (average body weight, average daily gain, feed intake and feed to gain ratio) were monitored during the trial. At day 11 and day 25, by 10 birds from each group were placed into the

individual balance cages, in order to provide the collection of feces during five consecutive days. The apparent and true total tract digestibility of P, as well as the apparent total tract digestibility of Ca was determined. At day 42nd, by six birds from each group were slaughtered and samples of blood serum, and bones (tibia and tarsus from both legs) were taken.

The importance of phosphorus in expressing maximum production performances was observed in the experiment, first of all in lag of the body growth of the control group, which showed significantly lower all the production parameters monitored, compared to the other two experimental groups. Furthermore, the experimental group O - I exhibited better production results, overall, compared to the experimental group O - II, which points to a higher degree of utilization of the P form monocalcium used here. In the same experimental group (O - I), a higher degree of total apparent as well as true digestibility of phosphorus was observed. Other examined parameters were compatible with phosphorus digestibility percentages, control group had the lowest concentrations of phosphorus and calcium in the blood serum, while the O - I experimental group had the highest measured concentrations of these minerals in the serum. On the other hand, alkaline phosphatase activity showed only numerical differences between experimental groups, since it is determined by other factors (hormonal status, etc.). The examined bone tissue characteristics (radiological, physical, morphometric and chemical tests) also point to the potential benefits of using the monocalcium phosphate produced by "Elixir Feed" DOO from Šabac, which was added in the feed for the experimental group O - I.

By comparing the methodologies used in the phosphorus digestibility studies, it may be concluded that quantitative methods (true and apparent digestibility) are the most appropriate in this type of studies, firstly because of high sensitivity, but also because they provide information of practical significance in the potential correction of the meal. Qualitative methods, on the other hand, provide significant data on the bioavailability of phosphorus, which

relate to the degree of bone tissue ossification, as phosphorus depo, but have no relevance for the direct evaluation of mineral nutrients. In conclusion, it can be highlighted that the experimental group O - I, in all observed parameters, have shown the highest degree of phosphorus digestibility from complete feed mixture, but also mineral nutrient used here. Thus, monocalcium phosphate, which in this group was an inorganic phosphorus source, is qualitatively more valuable source of available phosphorus.

Key words: poultry, broilers, phosphorus, monocalcium phosphate, digestibility, bone, mineralization

Scientific field: Nutrition

Specific scientific field: Nutrition

UDC number: 614.95 : 636.5 : 661'2'

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1. Uloga i značaj fosfora	4
2.1.1. Apsorpcija fosfora.....	5
2.1.2. Koštano tkivo kao depo fosfora.....	8
2.1.3. Metabolizam i homeostaza fosfora	11
2.2. Faktori koji utiču na iskoristivost fosfora.....	15
2.2.1. Hemijska forma fosfora u hrani.....	15
2.2.2. Koncentracija kalcijuma u hrani	17
2.2.3. Uzrast i genotip.....	18
2.2.4. Vitamin D ₃ i njegovi metaboliti	19
2.2.5. Fitaza	20
2.3. Potrebe u fosforu	23
2.4. Izvori fosfora	26
2.4.1. Biljna hraniva	26
2.4.2. Hraniva animalnog porekla	28
2.4.3. Mineralna hraniva	29
2.5. Metode ispitivanja iskoristivosti fosfora	30
2.5.1. Kvalitativne metode	31
2.5.1.1. Sadržaj pepela i fosfora u kostima	32
2.5.1.2. Sila loma.....	33
2.5.1.3. Gustina kostiju	33
2.5.1.4. Parametri krvi	34
2.5.1.5. Proizvodne performanse	35
2.5.2. Kvantitativne metode.....	35
2.5.2.1. Ukupna prividna svarljivost	36
2.5.2.2. Endogeni gubici fosfora.....	37
2.5.2.4. Ilealna svarljivost fosfora.....	40
2.5.2.5. Sadržaj fosfora u celom telu	41
2.5.3. In vitro testovi	41
3. Cilj i zadatak rada	43
4. Materijal i metode rada.....	45
4.1. Izbor materijala	45
4.2. Držanje i ishrana piladi.....	45

4.3. Formiranje ogleda.....	46
4.4. Ishrana piladi.....	46
4.5. Hemijski sastav hrane	48
4.6. Zdravstveno stanje	50
4.7. Proizvodni rezultati.....	51
4.8. Uzorkovanje materijala za analize	51
4.9. Iskoristivost fosfora i kalcijuma.....	52
4.10. Metode hemijske analize	54
4.11. Metode fizičke analize kostiju.....	56
4.12. Statistička obrada podataka	59
5. Rezultati ispitivanja.....	60
5.1. Zdravstveno stanje	60
5.2. Proizvodni rezultati.....	60
5.3. Iskoristivost mineralnih materija	64
5.4. Koncentracija Ca i P i aktivnost ALP u krvnom serumu.....	70
5.5. Fizičko-hemijske karakteristike kostiju	71
5.5.1. Čvrstina kostiju	71
5.5.2. Morfometrijske analize kostiju	72
5.5.3. Radiološka analiza kostiju	73
5.5.3.1. Rentgenografska ispitivanja kostiju	73
5.5.3.2. Ispitivanje gustine kostiju.....	75
5.5.4. Hemijska analiza kostiju.....	79
5.6. Međusobna zavisnost iskoristivosti fosfora, proizvodnih rezultata i parametara ispitivanja na kostima	80
6. Diskusija.....	85
6.1. Hemijski sastav smeša	85
6.2. Zdravstveno stanje	88

6.3. Proizvodni rezultati.....	88
6.4. Iskoristivost mineralnih materija	94
6.5. Koncentracije kalcijuma i fosfora i aktivnost alkalne fosfataze u krvnom serumu.....	98
6.6. Fizičko – hemijske karakteristike kostiju	101
6.6.1. Čvrstina kostiju	101
6.6.2. Morfometrijske analize kostiju	103
6.6.3. Radiološka analiza kostiju	105
6.6.3.1. Rentgenografska ispitivanja.....	105
6.6.3.2. Gustina kostiju	107
6.6.4. Hemijska analiza kostiju.....	111
6.7. Međusobna zavisnost iskoristivosti fosfora, proizvodnih rezultata i parametara ispitivanja na kostima	114
7. Zaključci	118
8. Spisak literature	121
9. Prilog	144

1. UVOD

Savremena živinarska proizvodnja je poslednjih decenija u konstantnoj ekspanziji. Na globalnom nivou u periodu od 2000. do 2014. godine, došlo je do porasta obima proizvodnje sa 9,3 na 16,7 miliona tona živinskog mesa u Evropi, a na svetskom nivou sa 58,5 na 100,6 miliona tona, prema podacima FAO. Taj trend progresivnog porasta se nastavlja, pa je u poslednje dve godine po dostupnim podacima svetska proizvodnja mesa živine iznosila 103,8 miliona tona u 2015. godini i 107,1 milion tona u 2016. godini. U Evropi zabeležena je proizvodnja od 17,4 miliona tona u 2015. godini i 18 miliona tona u 2016. godini. Proizvodnja brojlera obuhvata više od 85% ukupne proizvodnje živinskog mesa (91 milion tona – FAO).

U Srbiji je, nasuprot ovome, zabeležen pad u živinarskoj proizvodnji, pa je za poslednje tri godine ukupan broj živine 2014 – 17,2 miliona jedinki, 2015 – 17,4 miliona jedinki i 2016 – 16,2 miliona jedinki. Ovaj pad ukupnog broja živine na teritoriji naše zemlje prati i pad broja brojlerske piladi (2014 – 5,9 miliona jedinki, 2015 – 5,4 miliona jedinki i 2016 – 4,5 miliona jedinki) (RZS).

Bez obzira na fluktuacije na svetskom ili domaćem tržištu u obimu proizvodnje, savremeni odgoj brojlera prati povećanje stope prirasta piladi tokom tova. 1980-ih godina prosečna telesna masa u uzrastu od 50 dana iznosila je 1,78 kg, dok se danas postavlja cilj od 2,5 kg završne mase u toku 42 dana tova, što doprinosi postavljanju visokih zahteva za hranu za životinje u intenzivnom odgoju.

Intenzivna proizvodnja podrazumeva stalne potrebe za nivelisanjem sastojaka hrane kako u kvantitavnom, tako i kvalitativnom pogledu, kao i njihovih uticaja na proizvodne performanse, radi postizanja što boljih rezultata u kratkom vremenskom periodu tova brojlera.

Osnovni zahtev u odgoju i tovu brojlera jeste optimalno izbalansirana ishrana, tako da se postigne zadovoljavanje svih nutritivnih potreba životinje, ali i da se postigne što manji utrošak hrane po jedinici prirasta, u što kraćem

vremenskom periodu. U tom smislu, neophodno je adekvatno uskladiti kako organske, tako i neorganske sastojke hrane, pa i obezbediti optimalne količine mineralnih materija, među kojima i fosfora.

Između ostalih, izazov u ishrani brojlera je i u tome da se fosfor prisutan u hrani učini što dostupnijim životinjama. Fosfor je u biljnim hranivima, koji su osnovni sastojci hrane za živinu, prisutan u različitim formama. U manjoj meri je vezan za organske molekule (lipide, proteine), a u većoj meri je u formi fitinske kiseline ili njenih soli. Fosfor iz fitinske kiseline je samo delimično raspoloživ za životinje (0-50%). Usled ograničene iskoristivosti fosfora iz biljnih hraniva, a da bi se podmirile potrebe brojlera, neophodno je dodati u hranu fosfor iz različitih mineralnih izvora. Monokalcijum fosfat (uz dikalcijum fosfat, dinatrijum fosfat, defluorinisani fosfat...) je najrasprotranjeniji komercijalno dostupan suplement, koji se upotrebljava kao izvor fosfora u ishrani brojlera.

Kako se fosfor prisutan u hrani samo delimično resorbuje i zadržava u organizmu, veći njegov deo izlučuje se fecesom u spoljašnju sredinu, pa predstavlja jedan od osnovnih polutanata okoline. Stoga koncentrisanje i izlučivanje fosfora fecesom predstavlja značajan ekološki aspekt ovog problema.

Fosfor je relativno skup mineral, ograničenih izvora, koji kada je poreklom iz mineralnih hraniva pokriva oko 60% potreba brojlera za nefitinskim fosforom, tokom tova.

Takođe, podaci o iskoristivosti fosfora iz različitih izvora, kao i njegovom uticaju na proizvodne rezultate su nepotpuni i često vrlo kontradiktorni. Ne postoje standardizovane metode u EU za evaluaciju svarljivosti fosfora iz različitih neorganskih izvora. Istraživači su koristili različite metode i kriterijume za utvrđivanje iskoristivosti fosfora iz različitih hraniva, pa su podaci najčešće nepogodni za poređenje.

Zbog svega navedenog, postoji potreba za određivanjem i definisanjem iskoristivosti neorganskog fosfora različitog porekla, u poređenju sa nutritivnim zahtevima brojlera u tovu. Takođe, predmet ovog ispitivanja je i

uticaj fosfora različitog mineralnog porekla na proizvodne performanse, zdravstveni status, ali i stepen mineralizacije kostiju ispitivanih jedinki, kako bi se utvrdio optimalan nivo učešća u smeši za postizanje najboljih proizvodnih rezultata, bez štetnih efekata na zdravstveni status životinja i namirnice animalnog porekla kao krajnji proizvod, ali i sa ciljem da se izbegne dodavanje fosfora u višku, a sa tim i njegovi efekti kao zagađivača.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Uloga i značaj fosfora

Fosfor je visoko reaktivan nemetal, koji se u prirodi ne nalazi slobodan, već u formi fosfata. Široko je rasprostranjen (12-i po rasprostranjenosti u litosferi), dok je u biljkama prisutan, u količini od 0,1 - 1,2%, zavisno od vrste i dela biljke. U telu životinja je drugi po zastupljenosti mineral (posle kalcijuma), a prosečan njegov sadržaj je oko 0,7% telesne mase (tj. 10g/kg TM ptica) (tabela 1) (Mc Dowell, 2003; NRC, 2005; Šefer i Sinovec, 2008).

Tabela 1 – Zastupljenost makrominerala u telu domaćih životinja

Element	% TM	%Ukupnih telesnih minerala
Kalcijum	1,33	46
Fosfor	0,74	29
Kalijum	0,19	} 25
Natrijum	0,16	
Sumpor	0,15	
Hlor	0,11	
Magnezijum	0,04	

(preuzeto iz: Mc Dowell, 2003)

Najveći deo (oko 80 - 85%) fosfora u organizmu smešten je u kostima i zubima i to u formi kalcijum fosfata $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ i hidroksiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH}_2)]$. Dakle, 99% ukupnog kalcijuma organizma, 80 - 85% fosfora i 70% magnezijuma deponovano je u kostima. Osim gradivne uloge, fosfor u koštanom sistemu služi i kao depo i rezerva ovog elementa u stanjima deficita (laktacija, stres, kvalitativno ili kvantitativno gladovanje). Preostalih oko 20% ukupnog fosfora izvan koštanog sistema, prisutno je pretežno u organskoj formi (fosfoproteini, nukleoproteini, fosfolipidi, heksozo-fosfati), a

najzastupljeniji je u crvenim krvnim zrnima, mišićnom i nervnom tkivu (Mc Dowell, 2003; Šefer i Sinovec, 2008; Proszkowiec-Weglarz i Angel, 2013).

Na nivou ćelije, fosfor je od značaja kao gradivni element, ali je i uključen u brojne procese ćelijskog metabolizma, kako regulatorne, tako i za zadovoljavanje energetske potrebe ćelije. Tako, kao aktivator ili kofaktor brojnih enzimskih sistema, učestvuje u mnogim reakcijama (aktivnost Na^+ -K⁺ pumpe, oslobađanje O_2 iz hemoglobina, esencijalan je u sintezi mišićnih proteina...). U ćelijskoj membrani, fosfor je prisutan u formi fosfolipida, što ga čini značajnim za održavanje fluidnosti i integriteta ćelijske membrane (Mc Dowell, 2003; NRC, 2005).

Fosfor je uključen u metabolizam masti, ugljenih hidrata, proteina i drugih hranljivih materija. Konstitutivni je element jedinjenja bogatih energijom (ATP, GTP, CTP) koja obezbeđuju neophodnu energiju za odvijanje metaboličkih procesa. Učestvuje u održavanju osmotske i acido-bazne ravnoteže, kao esencijalni sastojak sistema pufera krvi i drugih telesnih tečnosti. Takođe, procesima fosforilacije i defosforilacije regulisna je aktivnost nekih hormona. Gradivni je element nukleinskih kiselina, pa je uključen i u procese transkripcije i translacije (Mc Dowell, 2003; NRC, 2005).

2.1.1. Apsorpcija fosfora

Neorganski fosfor je u intestinalnom lumenu prisutan kao dvovalentni i monovalentni fosfat tj., HPO_4^{2-} i HPO_4^- , što su osnovne forme u kojima se apsorbuje. U manjoj meri fosfati mogu biti apsorbovani i kao strukturne komponente nekih organskih jedinjenja, kao što su fosfolipidi.

Za razliku od drugih vrsta (konji, svinje) kod kojih se u određenom procentu resorpcija fosfora odvija i u debelom crevu, kod živine fosfor se resorbuje u tankom crevu (kod brojlera u najvećoj meri u duodenumu i jejunumu) procesima aktivnog transporta i pasivne difuzije.

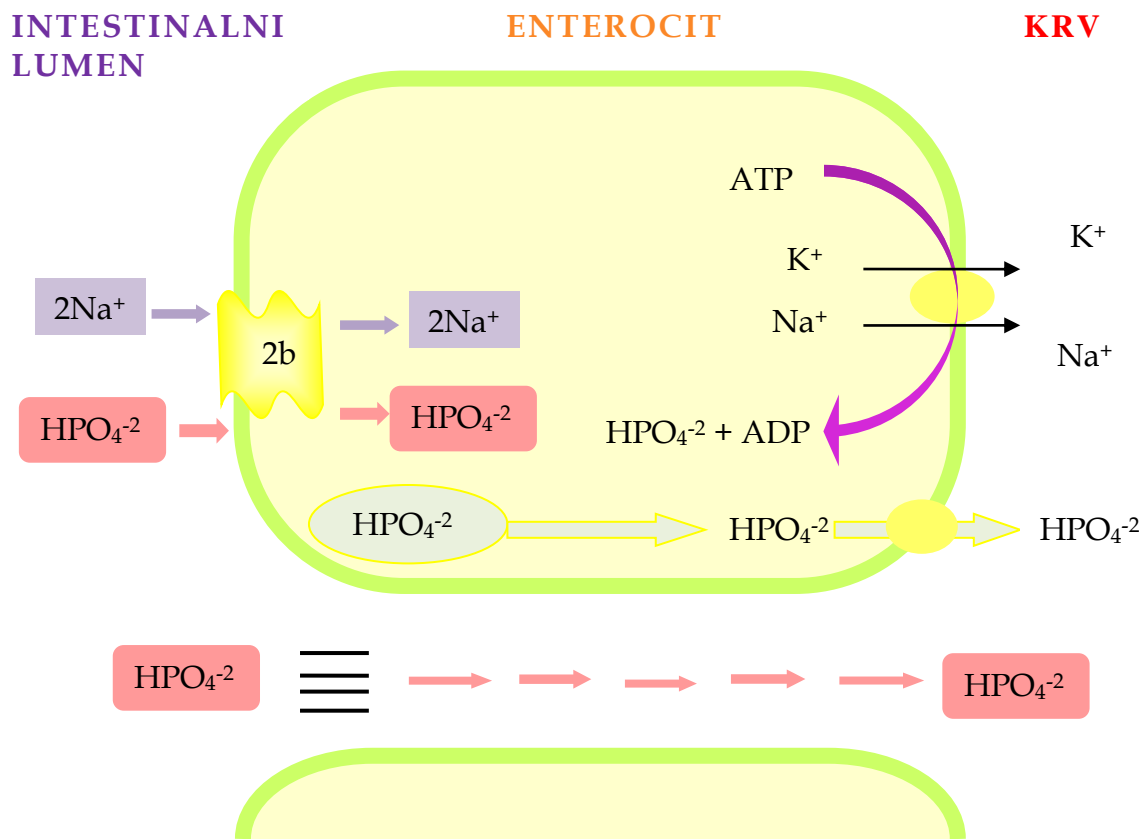
Aktivni transport se pretežno odigrava u duodenumu, kao Na-zavisni kotransport, pa je linearno vezan za koncentraciju Na^+ jona u intestinalnom lumenu, a promovisan je kalcitrolom. Pasivna difuzija je pre svega prisutna u jejunumu i ileumu, a uslovljena je razlikom u koncentraciji fosfatnih jona sa obe strane membrane enterocita, tj. fosfatni joni će difundovati niz koncentracioni gradijent iz sredine sa višom u sredinu sa nižom koncentracijom (Danisi i Straub, 1980; Sutton i sar., 2004; Leytem i sar., 2007). Stoga se očekuje da će pasivni transport biti dominantan pri visokom unosu fosfora hranom, dok će aktivni transport biti dominantan pri niskom dijetarnom unosu fosfora (Danisi i Straub, 1980; Sutton i sar., 2004).

Transport fosfora kroz enterocit odigrava se u tri koraka: 1. ulazak fosfora kroz membranu četkastog pokrova u enterocit, 2. transport fosfora kroz epitelnu ćeliju, 3. izlazak fosfora iz epitelne ćelije u ekstracelularni matriks kroz bazolateralnu membranu (Matsumoto i sar., 1980; Yan i sar., 2007) (slika 1).

Ulazak fosfora kroz membranu četkastog pokrova odigrava se na apikalnom delu enterocita kao Na^+ /fosfatni simport, zavistan od luminalne koncentracije Na^+ jona. Na nivou bazo-lateralne membrane fosfor difunduje u krv, u organskoj i neorganskoj formi. U organskoj formi, fosfor difunduje u krv pretežno kao strukturna komponenta fosfolipida (hilomikrona i lipoproteina (VLDL, LDL, HDL), dok je neorganski fosfor transportovan vezan za proteine seruma ili u jonizovanom obliku (Pond i sar., 2005). Dakle, u krvi fosfor je prisutan u tri oblika: slobodni - jonizovani oblik, vezan za proteine i vezan u formi fosfolipida.

Kalcijum iz hrane, se u želucu pod dejstvom hlorovodonične kiseline iz nerastvorljivih soli prevodi u rastvorljive oblike, kao što su kalcijum fosfat i kalcijum hlorid. U formi ovih soli kalcijum se resorbuje u tankom crevu aktivnim transportom, s' tim što kroz apikalni deo membrane enterocita prolazi olakšanom difuzijom pomoću proteina nosača - kalbidina. Sintezu ovog nosača indukuje aktivni oblik vitamina D (1,25 dihidroksi holekalciferol), koji nastaje u bubrezima pod dejstvom parathormona (Stojić, 2010). Kalcijum u krvi podeljen

je u tri frakcije: jonizovani (46 - 50% ukupnog Ca krvi), vezan za proteine (50% ukupnog Ca krvi) i kompleksni kalcijum (vezan u formi organskih (citrati) i neorganskih soli (fosfati, sulafiti); 10% - ukupnog Ca krvi) (Mc Dowell, 2003).



Slika 1 – Apsorpcija i transport fosfora na nivou enterocita

Stepen resorpcije fosfora iz hrane zavisi od mnogo faktora. Pre svega, zavisi od izvora i sadržaja fosfora u obroku, kao i od rastvorljivosti jedinjenja u kome je fosfor vezan, pa su tako fosfati relativno dobro rastvorljivi, dok su soli fitinske kiseline nerastvorljive. Na resorpciju fosfora utiče i dob života i potrebe životinja - mlade životinje, čije su potrebe znatno veće, iskorišćavaju fosfor efikasnije nego odrasle životinje čije su potrebe niže, odnosno svarljivost fosfora opada sa dobom života. Jedan od faktora koji određuje stepen resorpcije fosfora je i elektrohemijska reakcija himusa, kao i odnos fosfora sa drugim hranljivim,

posebno mineralnim materijama. Kisela elektrohemijaska reakcija sredine u kojoj se vrši resorpcija pospešuje iskoristivost, dok je alkalna smanjuje. Svarljivost fosfora smanjuje prisustvo fitata, prisustvo mineralnih materija (Ca, Fe, Al, Mn, K, Mg) sa kojima fosfor gradi nerastvorljiva jedinjenja, kao i deficit vitamina D u obroku (Mc Dowell, 2003; Šefer i Sinovec, 2008).

Dodatno, na stepen resorpcije kako fosfora, tako i kalcijuma utiču i uslovi okruženja, uključujući i stres izazvan prenaseljenošću objekta, neadekvatnom ventilacijom ili kontrolom temperature, kao i prisustvo oboljenja, pre svega parazitskih infekcija gastrointestinalnog trakta (Mc Dowell, 2003).

2.1.2. Koštano tkivo kao depo fosfora

Koštano tkivo je potpuno vezivno tkivo sa mineralizovanim međućelijskim matriksom. U hemijskom sastavu koštanog tkiva razlikuju se organske i neorganske supstance. Od organskih jedinjenja najzastupljeniji je *ossein* - proteinske prirode, a prisutni su i elastin, nuklein i albumin. Na neorganske materije otpada 2/3 ukupne mase kosti, kod tzv. zrele, formirane kosti tj. kod odraslih životinja. Kosti mlađih životinja sadrže više organskih materija, dok se kod starijih jedinki povećava procenat neorganskih soli, pa one postaju krte i lakše lomljive (Janković i Palić, 1972).

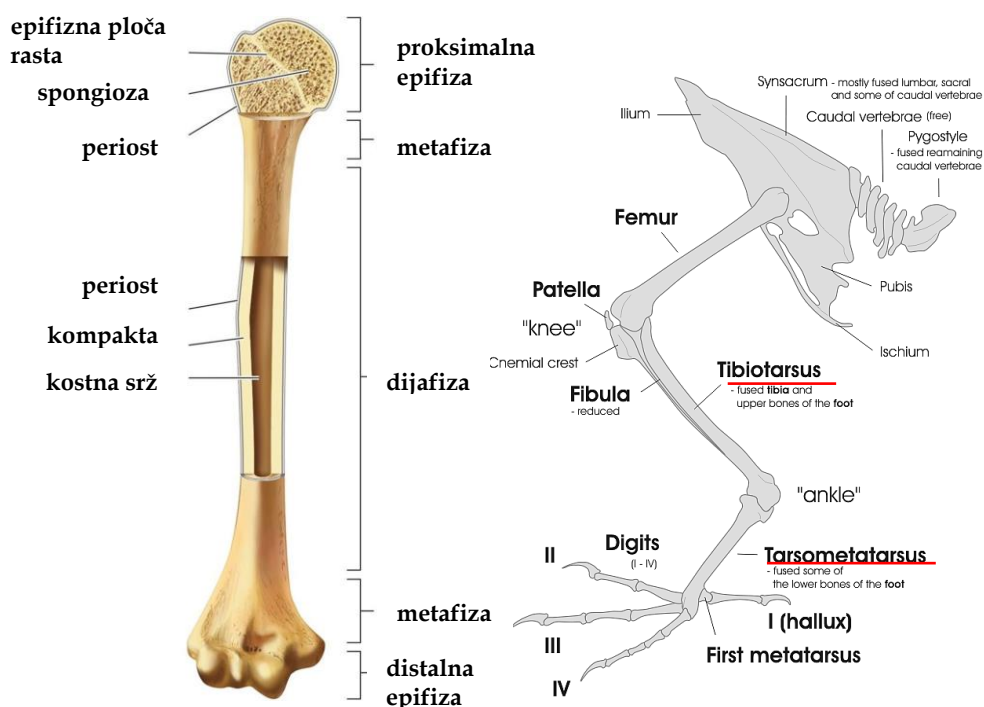
Neorganska jedinjenja prisutna u koštanom tkivu su: kalcijum fosfat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - 85%], kalcijum karbonat [CaCO_3 - 10%], kalcijum fluorid [CaF_2 - 0,3%], kalcijum i natrijum hlorid [CaCl_2 , NaCl_2 - 2%], magnezijum fosfat [$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ - 1,5%]. Kalcijum fosfat najzastupljeniji u kostima, prisutan je u formi kristala hidroksiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH}_2)$], što ovom tkivu daju tvrdoću. Ovi kristali inkorporisani su u kolagena vlakna, što mu daje čvrstinu (Janković i Palić, 1972).

Kalcijum i fosfor u kostima prisutni su u relativno konstantnom odnosu od 2:1. Sastav koštanog tkiva donekle varira u zavisnosti od vrste, starosti,

ishrane, ali u načelu, odrasla zrela kost se sastoji od: 45% vode, 25% pepela, 20% proteina i 10% masti (Mc Dowell, 2003).

Kosti jednog skeleta mogu se podeliti na duge kosti (*ossa longa*), kratke kosti (*ossa brevia*) i pljosnate ili pločaste kosti (*ossa plana*).

Na dugoj cevastoj kosti razlikuju se proksimalna i distalna epifiza (*epiphysis*) – glava kosti, proksimalna i distalna metafiza (*metaphysis*) – vrat kosti i dijafiza (*diaphysis*) tzv. telo kosti (slika 2).



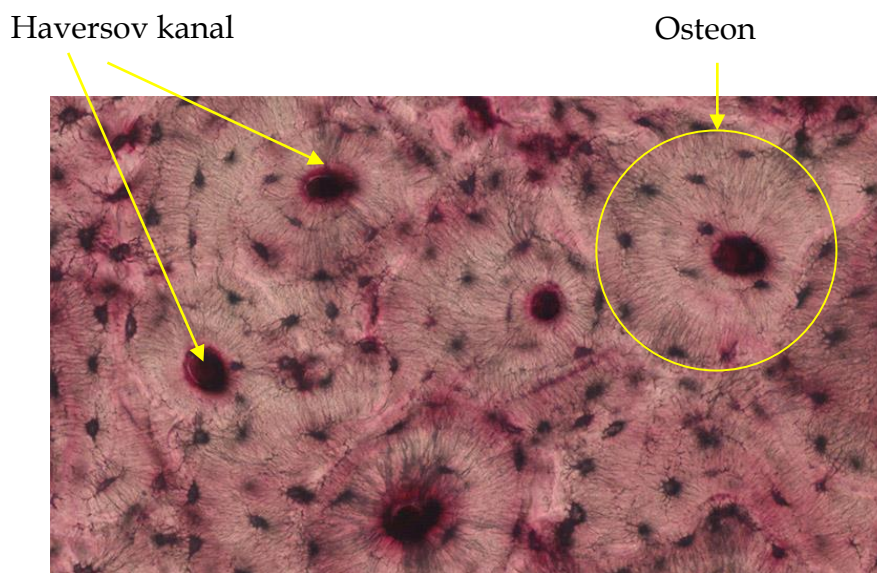
Slika 2 – Struktura duge cevaste kosti (desno) i kosti nogu živine (levo)

Zona porasta i elongacije duge cevaste kosti je metafiza, tj. granica između epifize i dijafize, koja je označena i kao epifizna ploča rasta. U ovom području dolazi do zamene hrskavice osteoidom, koji zatim biva kalcifikovan, tokom celog perioda rasta organizma. Kao potpuno formirana kost je i dalje metabolički aktivno tkivo, koje podleže stalnim procesima remodeliranja tj. formiranja i resorpcije koštanog tkiva. Tako, postoji neprekidna razmena kalcijuma i fosfora između kosti, krvi i posredno, drugih tkiva u organizmu, zahvaljujući aktivnosti osteoblasta i osteoklasta. Osteoblasti imaju funkciju u

formiranju nove kosti (sintezom komponenti matriksa (pre svega kolagena) i olakšavajući razmenu jona između ekstracelularnog matriksa i kosti). Osteoklasti imaju ulogu u resorpciji koštanog tkiva (Mc Dowell, 2003).

Na makroskopskoj građi kosti razlikuju se dve vrste koštane mase: kompaktna i spongiozna. Kompaktna (*substantia compacta*) nalazi se na periferiji duge cevaste kosti, dok je ka unutrašnjosti prisutna spongioza (*substantia spongiosa*) (Janković i Palić, 1972).

Kompaktna kost je homogena, bez vidljivih šupljina. Izgrađena je od četiri vrste lamela sagrađenih od kolagenih vlakana utopljenih u mineralizovanu međućelijsku supstancu. Osnovna morfo-funkcionalna jedinica kompaktne kosti je osteon (Haversov sistem), u čijem centru je vaskularni Haversov kanal, a oko njega koncentrične (Haversove) lamele. Lamele su poređane u vidu koncentričnih cilindara, oko centralno postavljenog Haversovog kanala. Između lamela smeštene su zrele koštane ćelije (Anđelković i sar., 2002) (slika 3).



Slika 3 – Osteon (Haversov sistem)

Spongiozna kost je suđerastog izgleda. Izgrađena je od gredica i pločica, koje ograničavaju sitne šupljine (*cellulae medullares*) ispunjene kostnom srži. Ka sredini tela duge kosti ove sitne šupljine se spajaju u jedinstvenu medularnu

šupljinu (*cavum medullare*). Dakle, središte epifiza dugih kostiju u potpunosti gradi spongioza, a kompakta je prisutna u tankom spoljašnjem sloju, dok dijafizu u celosti čini kompakta, a spongioza je prisutna u vidu tankog sloja koji oblaže medularnu šupljinu (slika 2) (Janković i Palić, 1972; Anđelković i sar., 2002).

2.1.3. Metabolizam i homeostaza fosfora

Koncentracija fosfora u krvi nalazi se u uskim granicama (1 – 2 mmol/l) i pod stalnom je kontrolom homeostatskih mehanizama. Homeostatski mehanizmi obuhvataju delovanje na nivou intestinalne apsorpcije fosfora iz hrane, renalne reapsorpcije i ekskrecije fosfora, kao i njegove izmene između ekstracelularnog matriksa i depoa u kostima (Favus i sar., 2006; Marks i sar., 2010).

U homeostatske mehanizme uključeni su hormoni: kalcitonin i parathormon i vitamin D.

Kalcitonin, hormon štitne žlezde, deluje na nivou kostiju, bubrega i creva. Kalcitonin smanjuje koncentraciju fosfora u krvi smanjivanjem resorpcije u digestivnom traktu, snižavanjem mobilizacije iz kostiju i resorpcije iz bubrega, ali i direktno utiče na brži transport fosfora iz krvi u kosti i meka tkiva (Stojić, 2010; Šefer i Sinovec, 2008).

Parathormon, hormon paraštitne žlezde, takođe ispoljava biološke efekte na nivou kostiju, bubrega i creva. Ovaj hormon smanjuje koncentraciju fosfora u krvi, povećavajući izlučivanje fosfora mokraćom (fosfaturija), ali izaziva i pojačano izlučivanje kalijuma, natrijuma, bikarbonata, amino-kiselina i cAMP. S druge strane, na nivou kostiju, parathormon povećava osteolizu i brzinu remodeliranja kosti, dovodeći do oslobađanja fosfora u vanćelijsku tečnost. Takođe, parathormon u bubrežnim kanalićima stimuliše formiranje aktivnog metabolita vitamina D (1,25 dihidroksiholekalciferol; kalcitrol). U epitelnim ćelijama bubrežnih kanalića, parathormon stimuliše aktivnost enzima 1- α

hidroksilaze, koja katalizuje sekundarnu hidroksilaciju vitamina D i formiranje aktivnog obilka – kalcitrola. Kalcitrol zatim povećava resorpciju kako kalcijuma, tako i fosfora u digestivnom traktu. Dakle, parathormon svoje dejstvo na nivou creva ispoljava indirektno, stimulišući sintezu kalcitrola (Proszkowiec-Weglarz i Angel, 2013).

Kalcitrol, hormonalna forma vitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃) povećava nivo apsorpcije fosfora u intestinumu, kao i sintezu proteina uključenih u transport fosfatnih jona. Odnosno, kalcitrol deluje kao steroidni hormon i u crevnoj mukozi indukuje sintezu proteinskog nosača za fosfor i kalcijum. Takođe, kalcitrol menja sadržaj i strukturu fosfatidilholina ćelijske membrane enterocita, na taj način povećavajući njenu fluidnost, pa posledično i nivo transporta jona kroz membranu (Mc Dowell, 2003). U bubrezima stimuliše reapsorpciju fosfata, a na nivou kostiju pospešuje mineralizaciju neokoštalih područja kosti (premeštanjem kalcijumovih i fosfatnih jona iz okoštalih u nekalcifikovane zone) (Stojić, 2010; Šefer i Sinovec, 2008).

Metabolizmi fosfora i kalcijuma su paralelni i simultani, pa su i regulisani istim homeostaskim mehanizmima. Tako, kalcitonin smanjuje koncentraciju kalcijuma u krvi, smanjivanjem resorpcije u digestivnom traktu, mobilizacije iz kostiju i reapsorpcije u bubrezima. Parathormon povećava koncentraciju kalcijuma u plazmi, direktno osteolizom kosti i indirektno stimulisanjem kalcitrola, koji zatim povećava resorpciju kalcijuma u crevima i bubrežnim tubulima.

Živina poseduje slične regulatorne mehanizme kao i sisari. Ptice poseduju četiri paratiroidne žlezde, analogne paratireoidnim žlezdama sisara, koje su odgovorne za produkciju parathormona. Takođe, poseduju ultimobrahialne žlezde koje su analogne C-ćelijama štitne žlezde sisara, a u kojima se sintetiše kalcitonin (Norris, 2007).

Kontrola lučenja parathormona i kalcitonina regulisana je mehanizmom negativne povratne sprege, u kojoj je glavni stimulus koji pokreće ovaj mehanizam koncentracija kalcijuma u krvi. Pa tako, povišena koncentracija

kalcijuma suprimira lučenje parathormona, usled čega se kalcijum deponuje u kosti. Istovremeno, stimuliše lučenje kalcitonina, koji dovodi do snižavanja koncentracije kalcijuma u krvi. Osim toga što utiče na brzinu i sintezu lučenja parathormona, kalcijum deluje i na druge procese u glavnim ćelijama štitine žlezde. Tako, visok nivo kalcijuma u vanćelijskoj tečnosti inhibira unošenje amino-kiselina u ćelije, time i sintezu prekursorskog oblika parathormona (pro-parathormona), a može uticati i na razgradnju PTH od strane lizozoma (Stojić, 2010).

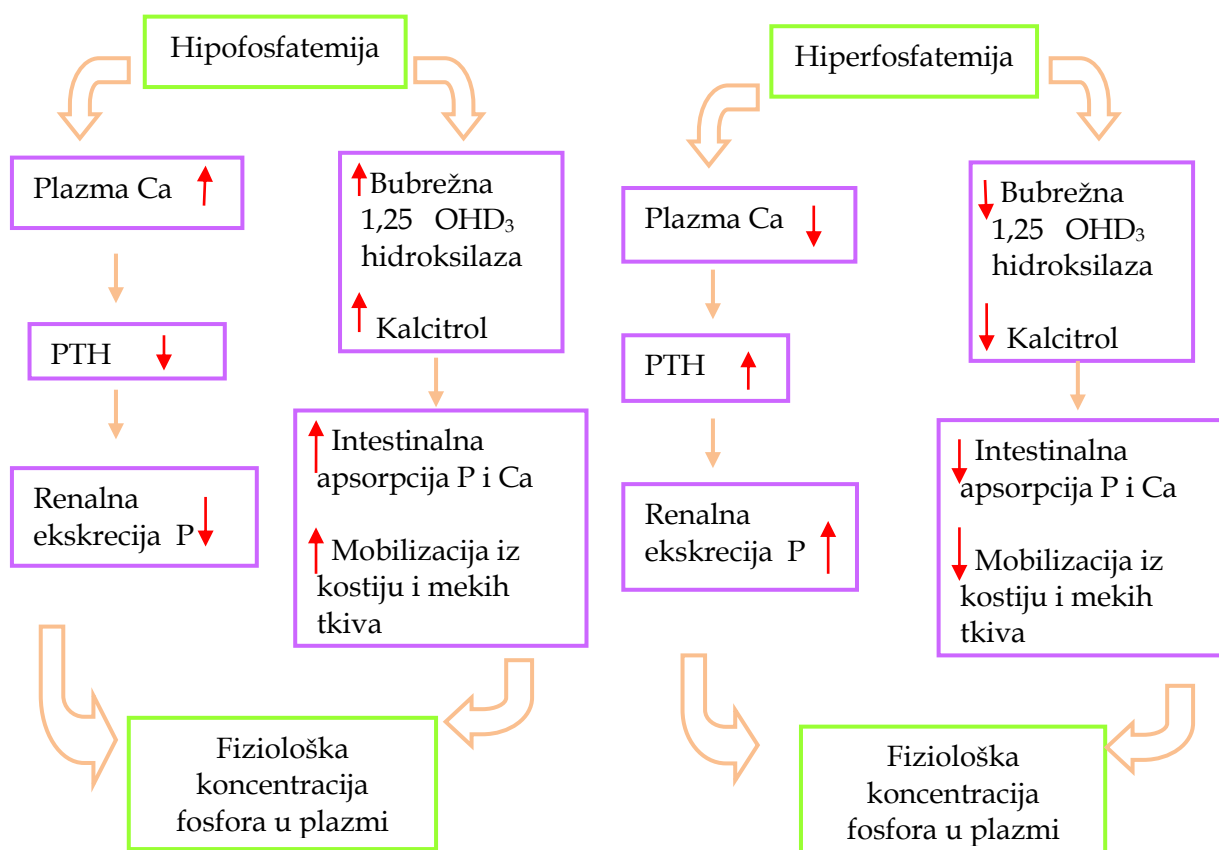
Kalcijum na aktivnost kalcitrola deluje direktnom stimulacijom, ili indirektno, preko parathormona, koji će ispoljiti stimulatívno dejstvo na renalni enzim 25-hidroksiholekalciferol-1-hidroksilazu (Breves i Schröder, 1991).

Sa druge strane, direktno dejstvo koncentracije fosfora u krvi na sintezu i lučenje parathormona, nije zabeleženo. Smatra se da povišeni nivo fosfora snižava nivo kalcijuma u krvi, tako koči formiranje kalcitrola i indirektno utiče na pojačano lučenje parathormona (Stojić, 2010). Direktna stimulacija enzima 25-hidroksiholekalciferol-1-hidroksilaze, niskom serumskom koncentracijom fosfora prisutna je kod monogastričnih životinja i ne zavisi od prisustva parathormona (Breves i Schröder, 1991; Berndt i Kumar, 2009).

U stanju hiperfosfatemije, paraštitna žlezda stimulisana je na sintezu parathormona. Parathormon snižava koncentraciju fosfora u krvi, u najvećoj meri stimulacijom renalne ekskrecije fosfora. S druge strane, hiperfosfatemija direktno inhibira bubrežnu 1- α -hidroksilaciju, čime snižava produkciju kalcitrola u bubrezima (Breves i Schröder, 1991; Bergwitz i Jüppner, 2010). Nizak nivo kalcitrola smanjuje intestinalnu apsorpciju kalcijuma i fosfora, kao i repoziciju kosti, dok se ne normalizuje koncentracija fosfora u krvi (Breves i Schröder, 1991) (slika 4).

U stanju hipofosfatemije, sinteza kalcitrola u bubrezima je stimulisana, kalcitrol se izlučuje u cirkulaciju, što rezultuje povećanom apsorpcijom fosfora u tankom crevu. Kalcitrol je uključen u simultanu mobilizaciju fosfora i kalcijuma iz mekih tkiva i kostiju, što dovodi do hiperkalcemije. Zajedno

hipofosfatemija i hiperkalcemija inhibiraju izlučivanje parathormona iz paraštitne žlezde, da se minimalizuje urinarna ekskrecija fosfora i normalizuje koncentracija fosfora u krvi (Schröder i sar., 1996; Berndt i Kumar, 2009) (slika 4).



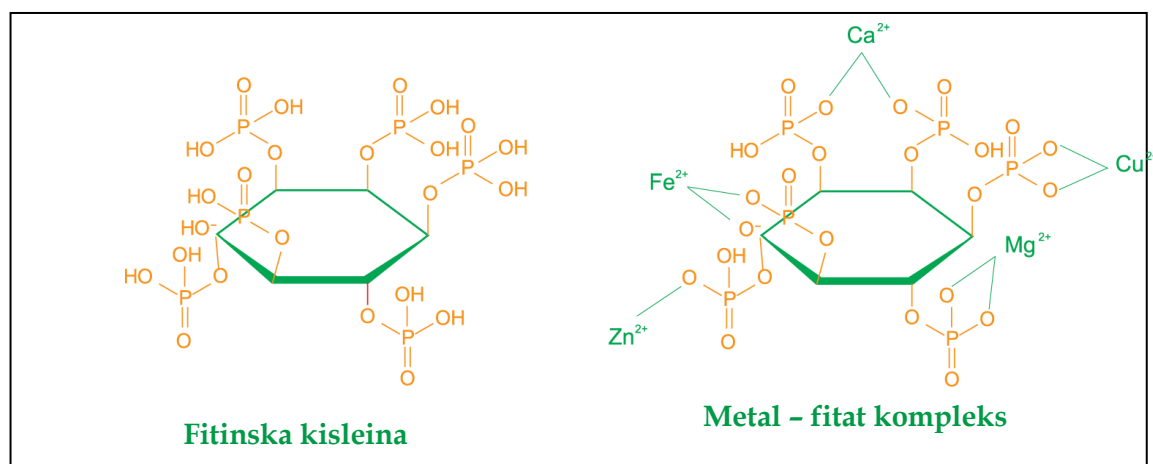
Slika 4 – Adaptivni odgovor organizma na hipo i hiperfosfatemiju (preuzeto iz: Breves i Shroder, 1991)

Primarni put izlučivanja fosfora iz organizma herbivora je feces, za razliku od mesojeda i čoveka, kod kojih je urin osnovni put ekskrecije ovog minerala. Tako se i endogeni fosfor primarno izlučuje fecesom, što je jedan od načina održavanja koncentracije fosfora u krvi u fiziološkim granicama. Nasuprot ovome, endogeni gubici kalcijuma smatraju se relativno stalnim, pa je procenat apsorpcije kalcijuma primarno uslovljen unosom kalcijuma hranom (Mc Dowell, 2003).

2.2. Faktori koji utiču na iskoristivost fosfora

2.2.1. Hemijska forma fosfora u hrani

Fosfor je u hranivima prisutan u formi fitinske kiseline i njenih soli i kao nefitinski tj. neorganski fosfor, u formi fosfata. Fitinska kiselina (mioinozitol heksafosfat, $C_6H_{18}P_6O_{24}$, IP6) je organsko jedinjenje u kome je šest fosfatnih grupa estarskim vezama vezano za ciklični alkohol mioinozitol. Ova kiselina je nestabilna u slobodnoj formi i uglavnom je prisutna u formi svojih soli, kada vezuje metalne katjone (Ca, Fe, Mg, Zn, K, Mn) (Cheryan, 1980; Morris, 1986; (Schlemmer i sar.,2009) (Slika 5). Navodi se afinitet fitinske kiseline ka katjonima po opadajućem redosledu: bakar (Cu) > cink (Zn) > nikl (Ni) > kobalt (Co) > mangan (Mn) > gvožđe (Fe) > kalcijum (Ca).



Slika 5 – Hemijska struktura fitinske kiseline, slobodne (levo) i vezane u katjonskim solima (desno)

Količina fosfora koji je u hranivu vezan u formi fitinske kiseline je glavni faktor koji određuje stepen iskoristivosti fosfora iz tog hraniva. Degradacija fitinske kiseline i njenih soli odvija se pomoću enzima fitaze. Usled niske

aktivnosti ovog enzima, koji hidrolizuje fitinsku kiselinu i njene soli u digestivnom traktu živine, fosfor iz fitinske kiseline je slabo dostupan za živinu (Godoy i sar., 2005; Marounek i sar., 2010). Fitinski fosfor bi trebalo da bude hidrolizovan do neorganskog fosfora i inozitola, da bi bio dostupan organizmu za resorpciju. Stoga, iskoristivost fitinskog fosfora tj. hidroliza fitinskog fosfora zavisi od dostupne fitaze u GIT-u monogastričnih životinja, dok kod preživara, mikroflora buraga i mrežavca igra glavnu ulogu u hidrolizi fitinskog fosfora.

Hidroliza fitinskog fosfora i apsorpcija fosfora kod živine i svinja zavisi od mnogo činioca, uključujući koncentracije fosfora i kalcijuma u hrani, vitamin D₃ i njegove metabolite, uzrast, genotip, enzime, vrstu hraniva, izvor fitinskog fosfora, način obrade hraniva i veličinu čestica hrane (Mohammed i sar., 1991; Ravindran i sar., 1995b; Angel i sar., 2002; Nahm, 2007).

Neorganski fosfor - Visoke koncentracije fosfatnih jona u hrani proporcionalno smanjuju hidrolizu fitinskog fosfora i smanjuju svarljivost fitinskog fosfora kod živine (Ballam i sar., 1984; Ravindran i sar., 2000). Ovi efekti se pripisuju inhibiciji aktivnosti fitaze fosfatnim jonima, kao krajnjim produktima hidrolize fitata (Selle i sar., 2009). Inhibitorni efekat fosfatnih jona ($\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$) na aktivnost fitaze uljane repice dokazan je od strane Mahajan i Dua (1997). Utvrđen je porast aktivnosti crevne alkalne fosfataze (Davies i sar., 1970; McCuaig i Motzok, 1972) i fitaze (Davies i sar., 1970) kod piladi hranjenih hranom sa niskim sadržajem fosfora. Negativni efekti na stepen apsorpcije fosfora su izraženiji kada su koncentracije kalcijuma i fosfora u hrani veće, usled veće precipitacije IP₆- mineralnog kompleksa, pa je i manje ovih minerala i fitinskog fosfora dostupno za apsorpciju (Angel i sar., 2002). Slično ovome, reakcija fosfatnih jona i kalcijuma vodi ka flokulentnoj precipitaciji $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, što takođe čini fosfor manje dostupnim za apsorpciju (Hurwitz i Bar, 1971; Selle i sar., 2009).

2.2.2. *Koncentracija kalcijuma u hrani*

Kritični faktor koji određuje dostupnost fosfora iz hrane je koncentracija kalcijumovih jona u tankim crevima. Kalcijum ograničava apsorpciju fitinskog fosfora, najpre tako što formira nerastvorljive komplekse sa fitatima. Jedan molekul fitinske kiseline može vezati tri do šest mola kalcijuma na pH vrednosti intestinalne sredine (Mc Dowell, 2003). Iako kalcijum nema najjači afinitet ka formiranju helata sa fitatima, u odnosu na druge minerale, on usled visoke koncentracije u hrani za živinu, jako brzo gradi nerastvorljive komplekse sa fitatima (Angel i sar., 2002). Osim toga, visoke koncentracije kalcijuma u hrani (pre svega ako je zastupljen u formi krede u obroku), povećavaju pH crevnog himusa, što negativno utiče na hidrolizu fitinskog fosfora (Shafey i sar., 1991; Angel i sar., 2002). Dodatno, visoke koncentracije kalcijuma, povećavaju veličinu mineralnih kompleksa IP₆-mineral, smanjujući površinu za potencijalno dejstvo fitaze (Angel i sar., 2002). Stoga, koncentracija kalcijuma u hrani, kao i odnos Ca:P su ključne determinante iskoristivosti fosfora.

Brojne studije su potvrdile negativnu korelaciju između koncentracije kalcijuma u hrani i stepena hidrolize fitinskog fosfora. Mohammed i sar. (1991) su dokazali da iskoristivost fitinskog fosfora može biti povećana za 15%, kada je nivo kalcijuma u hrani smanjen sa 10 g/kg na 5 g/kg hrane. Nelson i Kirby (1987) utvrdili su povećanje iskoristivosti fosfora sa 5,6% na 55%, pri smanjenju koncentracije kalcijuma sa 5,2 g/kg na 1,2 g/kg. Ipak, pri ovako niskim koncentracijama nisu zadovoljene potrebe živine u kalcijumu za porast i mineralizaciju kosti.

Visok nivo dijetarnog kalcijuma smanjuje dostupnost fosfora i redukujući aktivnost mukozne fitaze. Mc Caugi i sar. (1972) ustanovili su pad aktivnosti intestinalne fitaze sa 2,56 na 0,64 μ mola fosfora oslobođenih u minuti po gramu mukoze tri nedelje starih brojlera, pri povećanju nivoa kalcijuma u hrani sa 6 g/kg na 15 g/kg. Slične rezultate zabeležili su i Applegate i sar. (2003), u komparaciji hrane sa standardnim sadržajem kalcijuma (9 g/kg) i hrane sa

niskim sadržajem kalcijuma (4 g/kg). Nasuprot ovome, u istraživanju na 18 dana starim patkama, hranjenih hranom sa 7,4 i 11,1 g/kg Ca, utvrđene su slične aktivnosti duodenalne i jejunalne fitaze među oglednim grupama (Rush i sar., 2005).

Odnos kalcijuma i fosfora u hrani utiče na efikasnost egzogene mikrobijalne fitaze. Povećanje odnosa Ca:P sa 1,4:1 na 2:1 u obroku brojlera, smanjuje aktivnost fitaze za 13,4% i 14,9%, navedenim redom, a taj negativan efekat je više izražen na nižim koncentracijama fitaze i dostupnog fosfora (Qian i sar., 1997). Slični rezultati su zabeleženi i u ogledima na svinjama, ćurkama, brojlerima i nosiljama (van der Klis i sar., 1997; Liu i sar., 2000; Zyla i sar., 2000; Askakal i Bilal, 2002; Selle i sar., 2009). Efekti šireg odnosa Ca:P mogu biti posledica uticaja na iskoristivost fitinskog fosfora, manje pristupačnosti fitaze na Ca-fitat nerastvorljivi kompleks i/ili sposobnosti kalcijuma da suprimira aktivnost fitaze kompeticijom za aktivna mesta na enzimu (Quian i sar., 1997). S' druge strane, snižavanje odnosa Ca:P sa 1,5:1 na 1,1:1 dovelo je do povećanja iskoristivosti fosfora kod ogledne prasadi (Mc Dowell, 2003).

Kalcijum takođe deluje negativno na apsorpciju fosfatnih jona ako je prisutan u visokim koncentracijama. Reakcija između kalcijuma i fosfatnih jona vodi ka masivnoj precipitaciji kalcijum ortofosfata $[Ca_3(PO_4)_2]$ što dovodi do manje apsorpcije i kalcijuma i fosfora (Hurwitz i Bar, 1971; Plumstead i sar., 2008; Selle i sar., 2009).

2.2.3. Uzrast i genotip

Smatra se da mlade životinje, čije su potrebe znatno veće, iskorišćavaju fosfor efikasnije nego odrasle životinje čije su potrebe niže, tj. svarljivost fosfora opada sa dobom života. Međutim, ima tvrdnji da starije ptice efikasnije iskorišćavaju fitinski fosfor, usled toga što je prisutna veća aktivnost fitaze u njihovom digestivnom traktu. Tako je, kod brojlera u uzrastu od 16. do 21. dana, retencija fitinskog fosfora bila 6,8%, a od 42. do 46. dana 17,3% (Matyka i

sar., 1990). Ipak, nisu zabeležene značajne razlike u retenciji fitinskog fosfora između brojlera starih četiri i devet nedelja (Nelson, 1976).

Razlike u aktivnosti fitaze između nosilja i tovne piladi su ispitivane u nizu studija, sa vrlo nekonzistentnim rezultatima. Tako, Edwards (1983) je došao do zaključka da nosilje efikasnije iskorišćavaju fitinski fosfor, za razliku od Maddiah i sar. (1964) koji tvrde da je aktivnost fitaze niža kod nosilja u odnosu na pilad i pacove. Maenz i Classen (1998) nisu ustanovili značajne razlike između aktivnosti fitaze četkastog pokrova nosilja i brojlera. U ogledu na 37 nedelja starim ISA Brown nosiljama i 31 nedelju starim Ross 308 brojlerskom matičnom jatu, ilealna svarljivost fitinskog fosfora je bila 18% i 20%, istim redom i nije bila signifikantno različita (Marounek i sar., 2010).

Takođe, ispitivane su razlike u svarljivosti fosfora između različitih provenijencija brojlera (Edwards, 1983). Značajne razlike u hidrolizi fitinskog fosfora između Ross 308 i Hubard X Peterson hibridnih linija nisu zapažene. Zabeležena prividna ilealna iskoristivost kod brojlera starih 22 dana, sojeva Ross X Ross i Hubard X Peterson, bila je 22% i 24,1% ukupnog fosfora, pri koncentraciji kalcijuma u hrani od 9 g/kg (Applegate i sar., 2003).

2.2.4. Vitamin D₃ i njegovi metaboliti

Brojni ogledi su pokazali da vitamin D₃ i njegovi metaboliti (1,25-dihidroksiholekalciferol i 1 α -hidroksiholekalciferol) povećavaju iskorišćavanje fosfora iz hrane brojlera (Mohammed i sar., 1991; Edwards, 1993; Biehl i sar., 1995; Mitchell i Edwards, 1996; Biehl i Baker, 1997; Qian i sar., 1997; Applegate i sar., 2003; Snow i sar., 2004; Rama Rao i sar., 2007) i nosilja (Carlos i Edwards, 1998). Zapaženo povećanje pripisuje se: povećanoj aktivnosti ili sintezi intestinalne fitaze i/ili alkalne fosfataze (Davies i sar., 1970; Biehl i sar., 1995; Mitchell i Edwards, 1996), povećanoj apsorpciji fosfora (Wasserman i Taylor, 1973), povećanoj hidrolizi fitinskog fosfora (Mohammed i sar., 1991), povećanoj resorpciji fosfora u bubrezima i akumulaciji u kostima (Veum, 2010). Vitamin

D₃ modifikuje apsorpciju fosfora u jejunumu piladi uz istovremeno i nezavisno od ovoga povećanje apsorpcije kalcijuma u duodenumu (Hurwitz i Bar, 1972). Ishrana deficitarna u fosforu i kalcijumu ima stimulatívno dejstvo na 25-hidroksi vitamin D₃-1 α -hidroksilazu piladi, što vodi ka produkciji renalnog kalcitrola (Venum, 2010), koji će ispoljiti svoja dejstva na metabolizam fosfora.

2.2.5. *Fitaza*

Fitaze (mio-inozitol heksafosfat hidroksilaze) su široko rapsrostranjena grupa enzima, prisutna u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, koje katalizuju hidrolizu jedne ili više fosfatnih grupa iz fitinske kiseline (mioinozitol heksafosfata, IP₆), a kao proizvod ove reakcije nastaje fosfatni jon i niz nižih fosforičnih estara (Angel i sar., 2002).

Klasifikacija fitaza izvršena je po dva kriterijuma. Najpre, po položaju na kome ispoljavaju dejstvo fitaze se dele na 3-fitaze i 6-fitaze, koje iniciraju defosforilaciju IP₆ na 3. i 6. poziciji (Selle i Ravindran, 2007). Druga podela fitaza je po opsegu pH vrednosti sredine na kojoj ispoljavaju dejstvo, pa se mogu podeliti na kisele fitaze (pH 3,0 – 5,5) i alkalne fitaze (pH 7,0 – 8,0) (Yin i sar., 2007; Vijayaraghavan i sar., 2013). Kisele fitaze, nezavisno od porekla (bakterijska, gljivična ili biljna), oslobađaju 5 od 6 fosfatnih grupa iz fitata, pa je krajnji proizvod reakcije InsP₁ ili mio-inozitol (Hayakawa i sar., 1990; Greiner i sar., 2000). Alkalne fitaze (koje su izolovne iz *Bacillus* vrsta, polena *Lilium longiflorum* i *Typha latifolia*) ne deluju na mio-inozitol fosfate sa tri ili manje fosfatnih grupa, stoga krajnji proizvod ove degradacije je InsP₃ (Hara i sar., 1985; Scott i Loewus, 1986; Greiner i sar., 2002).

U ishrani svinja i živine, prisutna su četiri moguća izvora fitazne aktivnosti u GIT-u. To su: fitaza poreklom iz biljnih hraniva, endogena fitaza sintetisana od strane mukoznih ćelija tankog creva, fitaza generisana od strane mikroflora digestivnog trakta i egzogeni enzim uključen u ishranu ovih životinja (Selle i Ravindran, 2007; Selle i Ravindran, 2008).

Biljne fitaze - Prisustvo ovog enzima prvi put je detektovano u pirinčanim mekinjama (Suzuki i sar., 1907). U većini biljnih hraniva aktivnost fitaze je minimalna. Značajnija njena aktivnost utvrđena je u nekim žitaricama i njihovim proizvodima (po opadajućem redosledu: pšenica, tritikal, raž, ječam) (Weremko i sar., 1997; Selle i Ravindran, 2007). Aktivnost fitaza zavisi od vlažnosti, temperature i pH vrednosti sredine. Optimalna pH vrednost na kojoj deluju je 5 (Eeckhout i De Paepe, 1991; Wodzinski i Ullah, 1996), a temperatura 50°C (Chang, 1967; Gibson i Ullah, 1988; Greiner i sar., 1998). Stoga su biljne fitaze podložne inaktivisanju u procesima obrade hraniva npr. peletiranja (Jongbloed i Kemme, 1990; Wodzinski i Ullah, 1996), pod dejstvom kisele želudačne sredine, ali i pod dejstvom pepsina u duodenumu (Phillippy, 1999). Ipak, postoje podaci da su biljne fitaze povećale svarljivost fosfora kod brojlera, nosilja i svinja (Pointillart i sar., 1987; Oloffs i sar., 2000).

Mukozna fitaza - Mukozna fitaza u gastrointestinalnom traktu živine je od manjeg značaja. Prisustvo fitaze, kao endogenog enzima prvi put je dokazano u GIT-u pacova (Patwardhan, 1937). Nakon toga, u brojnim ogledima dokazana je aktivnost mukozne fitaze u digestivnom traktu živine (Maddaiah i sar., 1964; Maenz i Classen, 1998; Tamim i Angel, 2003; Tamim i sar., 2004; Marounek i sar., 2010) i svinja (Hu i sar., 1996). Dejstvo ovog enzima ustanovljeno je u voljci i svim segmentima tankih creva živine (Maenz i Classen, 1998; Marounek i sar., 2010), sa najvišom aktivnošću u duodenumu (Maenz i Classen, 1998). Negativan efekat na aktivnost mukozne fitaze ispoljava visoka koncentracija kalcijuma u hrani, pre svega usled toga što dovodi do formiranja nerastvorljivih Ca-fitat kompleksa. Smatra se da je aktivnost mukozne fitaze uslovljena i uzrastom i genetikom (Maddaiah i sar., 1964; Matyka i sar., 1990; Maenz i Classen, 1998; Zhang i sar., 2003). Osim toga, zapažen je adaptivni odgovor organizma, koji podrazumeva povećanje aktivnosti mukozne fitaze i fosfataze kod brojlera hranjenih hranom deficitnom u fosforu (McCuaig i sar., 1972; McCuaig i Motzok, 1972).

Fitaza mikroflora GIT-a - Kod preživara, mikroflora predželudaca sintetizira fitazu, koja hidrolizuje fitinski fosfor (Godoy i Mechy, 2001). Literaturni podaci o fitazi mikroflora digestivnog trakta svinja i živine su ograničeni (Sandberg i sar., 1993; Kerr i sar., 2000; Marounek i sar., 2010). Marounek i sar. (2010) su dokazali značajnu aktivnost fitaze u cekumu nosilja hranjenih hranom na bazi pšenice, kukuruza i soje, a bez dodavanja egzogene fitaze. U ovom ogledu ustanovljena je viša ukupna prividna svarljivost fosfora u odnosu na ilelanu kod nosilja (33% i 35%, istim redom), kao i kod brojlera (20% i 18%, istim redom). Međutim, kako se kod živine, kao i svinja apsorpcija fosfora primarno odigrava u gornjim parijama tankih creva, degradacija fitata u debelom crevu fiziološki je od malog značaja (Schlemmer i sar., 2001). Kerr i sar. (2000) tvrde da su mikroorganizmi voljke takođe uključeni u hidrolizu fitata.

Egzogena fitaza - Dodavanje egzogene fitaze u svrhu povećavanja iskoristivosti fosfora inicirano je još 1962. godine, ali ovakvi suplementi nisu bili komercijalno dostupni sve do 1991. godine (Wodzinski i Ullah, 1996; Selle i Ravindran, 2008). Danas su u upotrebi komercijalni preparati fitaze dobijeni iz mikroorganizama - bakterija, kvasaca i gljiva. Najrasprostranjeniju upotrebu u ishrani živine imaju fitaze dobijene iz *Aspergillus niger*, koja je 3-fitaza i iz *Peniophora lycii* i *Escherichia coli*, koje su 6-fitaze (Selle i Ravindran, 2007).

Uključivanje fitaze u obrok brojlera povećava svarljivost fosfora razgradnjom fitinske veze, pospešuje osifikaciju kostiju, kao i proizvodne performanse (Selle i Ravindran, 2007). Kod nosilja, dodavanje fitaze u obrok utiče na mineralni sastav tibije, poboljšava konverziju, ali su efekti na performanse nosivosti manje izraženi ili nedostaju (van der Klis i sar., 1997; Liebert i sar., 2005).

Poslednjih godina u središtu naučnih ispitivanja je tzv. super doziranje fitaze (2500 FTU/kg hrane, dobijene iz *A. niger* ili *E. coli*). Tačan mehanizam nije u potpunosti rasvetljen, ali su zabeleženi pozitivni efekti upotrebe ovako neobičajeno visokih doza kod svinja i živine (Cowieson i sar., 2011; Walk i sar., 2012). Takođe, pokušava se sa razvojem genetski modifikovanih sojeva

bakterija i gljiva, koje će sintetisati fitaze veće aktivnosti (Selle i Ravindran, 2007; Selle i Ravindran 2008).

2.3. Potrebe u fosforu

Fosfor je neophodan za rast i razvoj organizma, ispoljavanje optimalnih proizvodnih rezultata i adekvatno iskorišćavanje hrane. Uzima značajan udeo u sintezi mleka i mišićnog tkiva. Potrebe u fosforu zavise od vrste i rase životinje, uzrasta, zdravstvenog statusa, proizvodnog statusa i nivoa proizvodnje. Monogastrične životinje ispoljavaju veće potrebe za fosforom u odnosu na preživare, zatim, mlade i bremenite jedinke, usled deponovanja fosfora u koštanom tkivu, imaju veće potrebe u fosforu u odnosu na odrasle, kao i jedinke u proizvodnji naspram potreba za održavanje života (Šefer, 2002).

Osim količine fosfora u hrani, za zadovoljavanje potreba, od značaja je i njegov odnos sa drugim hranljivim materijama, pre svega kalcijumom i vitaminom D, sa kojima ima simultano iskorišćavanje i promet.

Različite preporuke se sreću u literaturi, kako za količine fosfora i kalcijuma, tako i za njihov međusoban odnos. NRC (1994) preporučuje 1%, 0,9% i 0,8% kalcijuma i 0,45%, 0,35% i 0,30% nefitinskog fosfora u ishrani brojlera uzrasta 0. do 3., 3. do 6. i 6. do 8. nedelje života, navedenim redom. Prema AEC (1993) u prve četiri nedelje života, potrebe za brojlere su, u zavisnosti od energetske vrednosti obroka, 0,9 - 1% kalcijuma, 0,65 - 0,70% ukupnog fosfora, tj. 0,40 - 0,45% usvojivog fosfora. Preporuke za brojlere uzrasta od 29. do 49. dana su 0,8 - 0,9% kalcijuma i 0,6 - 0,65% ukupnog fosfora, tj. 0,35 - 0,40% usvojivog fosfora. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje („Sl. Gl. RS“ 4/2010) propisuje upotrebu potpune smeše za tov piladi I koja sadrži: kalcijuma od 0,9 do 1,1%, ukupnog fosfora 0,65 - 0,85% i iskoristivog fosfora najmanje 0,40%, zatim, potpune smeše za ishranu piladi II sa 0,8 do 1% kalcijuma, 0,6 - 0,8% ukupnog fosfora i najmanje 0,35% iskoristivog fosfora i potpune smeše za

ishranu piladi III sa 0,7 do 0,9% kalcijuma, 0,5 - 0,7% ukupnog fosfora i najmanje 0,3% iskoristivog fosfora.

Za optimalan odnos Ca:P u ishrani brojlera uzima se odnos od 2:1, dok je u praksi ishrane ovaj odnos varijabilan od 1:1 do 2:1.

Kada potrebe u fosforu nisu zadovoljene, dolazi do razvoja kliničkih simptoma koji prate ovakav nutritivni disbalans. Najpre se pri marginalnom deficitu ili kratkotrajnom većem deficitu, javlja smanjen apetit, koji prati niža konzumacija hrane, slabije iskorišćavanje hranljivih materija i poremećaj energetskeg metabolizma, ali i pad telesne mase, prirasta i gubitak proizvodnih svojstava. Deficit fosfora potencira smanjenu efikasnost iskorišćavanja hranljivih materija, više nego smanjenje konzumacije hrane zbog njegove uloge u energetskeg metabolizmu. Kako je fosfor konstituent jedinjenja nosioca energije (ATP, ADP), njegov deficit izaziva redukciju intermedijarnog metabolizma i sinteze nukleinskih kiselina, tj. redukovana je metabolička aktivnost ćelija (Mc Dowell, 2003; Šefer i Sinovec, 2008).

Dugotrajni izraženi deficit fosfora dovodi do poremećaja na koštanom sistemu, u vidu poremećaja okoštavanja, strukturnih deformiteta kostiju i pojavu mekih i krtih kostiju kod mladih jedinki u porastu (rahitis) i kod odraslih jedinki (osteomalacija), posebno u intenzivnoj proizvodnji, pri čemu procesi demineralizacije (osteoporoza) mogu biti udruženi sa procesima zamene koštanog tkiva fibroznim tkivom (fibrozna osteodistrofija) (Mc Dowell, 2003; Šefer i Sinovec, 2008). Promene na koštanom sistemu neće se uniformno manifestovati na svim delovima skeleta. Najpre će deficit fosfora biti vidljiv na kostima rebara, pršljenovima, sternumu, koje sadrže niži procenat pepela, kao i na epifizama dugih cevastih kostiju. Kompaktna koštana masa dijafize dugih cevastih kostiju, kao što su humerus, femur, tibija, su poslednje „utrošene“ rezerve mineralnih materija. Smanjenje ukupnog sadržaja mineralnih materija u koštanom tkivu praćeno je i poremećajima njegove strukture, usled čega može doći do pojave savijanja, krivljenja i nepravilnih oblika kostiju (Mc Dowell, 2003).

Deficit fosfora može dovesti i do reproduktivnih poremećaja, u vidu poremećaja pojave estrusa, smanjenja koncepcije, povećanog broja abortusa i rađanja slabih, avitalnih plodova ili mrtvorodenost – kod svinja, preživara i konja. Kod živine ovaj deficit se ogleda u kasnom polnom sazrevanju, poremećaju parenja, smanjenom procentu izleženja i izleženju slabe ili deformisane piladi (Mc Dowell, 2003; Šefer i Sinovec, 2008).

Kod kokošaka nosilja kalcijum i fosfor su ključni minerali za održavanje čvrstoće ljuske, ali i pravilan razvoj embriona (u jajima matičnih jata). Deficit ovih minerala praćen je sledećim kliničkim simptomima: smanjena nosivost ili prekid nosivosti, smanjena konzumacija i povećana konverzija hrane, pad kvaliteta ljuske (smanjenje sile loma ljuske, smanjenje mase i debljine ljuske jaja), promene na unutrašnjim delovima jaja (krvave mrlje, zamućenje žumanca i slično), smanjena masa i veličina jaja, poremećaji reprodukcije (smanjen procenat izleženja, izleženje slabe, deformisane ili mrtve piladi, kasno polno sazrevanje...) (Mc Dowell, 2003).

U uslovima suficita, mogu se razviti opšti klinički simptomi (gubitak apetita, retardiran rast, smanjena konzumacija, povećana konverzija hrane). Osim toga, dolazi do odlaganja polnog sazrevanja i pada nosivosti. Kod preživara, pre svega ovaca, a posebno jedinki muškog pola, suficit fosfora potencira razvoj urolitijaze. Fosfor u hrani interferira iskorišćavanjem drugih mineralnih materija, pre svega kalcijumom i magnezijumom, formirajući nerastvorljive komplekse sa njima, pa se javljaju simptomi sekundarnog deficita ovih materija (tetanije i pareze) (Mc Dowell, 2003; NRC, 2005; Šefer i Sinovec, 2008). Dakle, razvija se hipokalcemija izazvana hiperfosfatemijom, koja može da dovede do nutritivnog sekundarnog hiperparatireoidizma. Ovakvo oboljenje je opisano kod konja, kod kojih dolazi do patognomonične fibrozne osteodistrofije kostiju glave, pa je i bolest nazvana bolest velike glave (Mc Dowell, 2003; NRC, 2005). Kod brojlera visoke doze fosfora u hrani čine ove jedinke prijemčivim za razvoj tibijalne dishondroplazije (multifaktorijalno

uslovljenog oboljenja, u čijem razvoju se veliki značaj pridaje metabolizmu kalcijuma i fosfora) (NRC, 2005).

Ingestija pojedinačnih visokih doza fosfora nije toksična, ali dugotrajni unos visokih doza može dovesti do ispoljavanja posledica toksičnosti ovog minerala. Dodatno, ovakva stanja su često vezana za poremećaje metabolizma kalcijuma, pa se toksični efekti fosfora vezuju za stanja u kojima je kalcijum deficitaran. Smatra se da naspram potreba fosfor ima najnižu podnošljivost od svih mineralnih materija. Maksimalno dozvoljene količine fosfora u hrani za živinu su 1%, odnosno 0,8% za nosilje, dok su za kalcijum ove doze 1,2% za živinu tj. 4% za nosilje (NRC, 2005).

Konstantno selekcioniranje i produkcija novih hibridnih sojeva, poboljšanih proizvodnih performansi, dovodi do potrebe za stalnim preispitivanjem postojećih preporuka za količine fosfora i kalcijuma u hrani. Takođe, različite preporuke proizvođača, kao i evaluacionih sistema (NRC, AEC) upućuju na potrebu za utvrđivanjem optimalnog sadržaja ovih minerala, kao i njihovog međusobnog odnosa za zadovoljenje potreba organizma.

2.4. Izvori fosfora

Različita hraniva sadrže različite količine fosfora, u zavisnosti od vrste hraniva, faze vegetacije, dela biljke, načina pripreme, uslova skladištenja. Fosfor u hrani za živinu potiče iz tri osnovna izvora: biljnih hraniva, animalnih hraniva i mineralnih neorganskih izvora fosfora.

2.4.1. Biljna hraniva

Zrnasta hraniva, sporedni proizvodi dobijeni preradom zrna i uljarice su osnovna biljna hraniva u hrani za živinu. Koncentracija fosfora i kalcijuma u biljnim hranivima uslovljena je karakteristikama tla i područja, klimatskim

uslovima, pH vrednošću zemljišta, visinom prinosa, vrstom biljke i fazom njene zrelosti (sa porastom zrelosti sadržaj fosfora opada).

Fosfor je u biljnim hranivima vezan u formi fitinske kiseline ili njenih soli (Ca, Mg soli). Smatra se da je u zrnastim hranivima i sporednim proizvodima dobijenim preradom zrna 60 – 80% fosfora vezano u formi fitinske kiseline (O' Dell i sar., 1972). Viši kičmenjaci sadrže enzim fitazu, neophodnu za oslobađanje fosfora iz fitinske kiseline, u malim količinama, pa je takav fosfor praktično neiskoristiv.

Generalno se smatra da biljna hraniva sadrže oko 2/3 od ukupne količine fosfora u fitinskoj formi (Ravindran i sar., 1995a; Viveros i sar., 2002). Ipak, sadržaj fosfora kao i odnos ukupnog i fitinskog fosfora varira značajno među vrstama biljnih hraniva (tabela 2). Takođe, varira raspored fitata unutar zrna različitih žitarica. Oko 90% fitata u pšenici i ječmu se nalazi uklopljen u vidu finih granula u protoplazmi aleurona, dok se preostalih 10% nalazi u klici (O' Dell i sar., 1972; Steiner i sar., 2007), dok je u kukuruzu oko 90% fitinskog fosfora smešteno u klici, a 10% u aleuronu (O' Dell i sar., 1972). U zrnu leptirnjača fitat se nagomilava u kotiledonu (Kornegay, 2001). U semenu soje, fitinska kiselina je prisutna u formi subcelularnih inkluzija ili proteinskih tela tzv. globoida (Prattley i Stanley, 1982).

Osim od količine fitata u hranivima, biološka iskoristivost fosfora varira i u zavisnosti od aktivnosti endogene fitaze u ovim hranivima. Aktivnost fitaze u pšenici (1200 U/kg) i pšeničnim mekinjama (2957 U/kg) značajno je veća nego u kukuruzu (12 U/kg) i šećernoj trsci (24 U/kg) (Eeckhout i De Paepe, 1994; Godoy i sar., 2005). Uljarice kao što su soja (8 U/kg), kikiriki (3 U/kg) i uljana repica (16 U/kg) sadrže zanemarljivo male količine endogene fitaze (Eeckhout i De Paepe, 1994).

Tabela 2 – Sadržaj i iskoristivost fosfora u pojedinim biljnim hranivima

Biljno hranivo	Sadržaj u hranivu			
	Ukupni P (g/kg SM)	Fitinski P (g/kg SM)	Odnos (%)	% svarljivosti
Kukuruz, zrno	3,2	2,1	65,6	17,0
Ječam, zrno	4,4	2,8	63,6	39,0
Pšenica, zrno	4,1	2,9	70,7	47,0
Grašak, zrno	4,8	2,4	50,0	45,0
Pšenica, mekinje	12,0	9,6	80,0	28,0
Sojina sačma	7,3	4,2	57,5	38,0
Suncokretova sačma	11,6	8,9	76,7	16,0

(preuzeto iz: Šefer, 2002)

S druge strane, fitinska kiselina je sposobna da formira nerastvorljive komplekse sa drugim mineralnim i hranljivim materijama, čime umanjuje njihovu iskoristivost. Fitati pokazuju najveći afinitet prema molekulima cinka i bakra (Davis i Olpin, 1979). Zahvaljujući prisustvu fosfornih grupa anjonskog porekla fitinska kiselina poseduje i mogućnost vezivanja za katjonske grupe proteina, čime umanjuje njihovu iskoristivost.

2.4.2. Hraniva animalnog porekla

Animalna hraniva su bogat izvor fosfora, posebno ako su dobijena preradom zajedno sa kostima (mesno-koštano brašno, riblje brašno) (Šefer, 2002), a smatra se da je dostupnost fosfora iz ovih hraniva 100% (NRC,1994). Ipak, količina dostupnog fosfora varira u zavisnosti od izvora, tehnike proizvodnje, sezonskih promena i veličine partikula izvora fosfora (Orban i Roland, 1992) i za većinu animalnih hraniva kreće se u granicama od 59% do

74% ukupnog fosfora (van der Klis i Versteegh, 1996). U različitim hranivima animalnog porekla različita je i količina ukupnog fosfora. U koštanom brašnu količina ukupnog fosfora je 125 g/kg, mesno-koštanom brašnu 51 g/kg, mesnom brašnu 41 g/kg (NRC, 1994).

2.4.3. Mineralna hraniva

Mineralna hraniva kao izvori neorganskog fosfora, su najbolji izvori ovog minerala zbog visokog sadržaja i visoke biološke dostupnosti fosfora. U prirodi su prisutni kao rudini fosfati, široko rasprostranjeni u Severnoj Evropi, Africi, Aziji, SAD, Kini i Bliskom Istoku (Mehmood i sar., 2009; Van Kauwenbergh, 2010). Tip neorganskog fosfata zavisi najpre od procesa njegovog dobijanja. U ishrani živine najčešće su u upotrebi različite forme kalcijumovih fosfata (mono i dikalcijum fosfat) i defluorinisani fosfat. Odabir neorganskog fosfata u formulisanju obroka za živinu, zavisi od brojnih faktora, kao što su: hemijski sastav mineralnog hraniva, dostupnost fosfora, cena, čistoća, fizička svojstva, pogodnost za rukovanje (tabela 3). Potencijalni rizik u upotrebi ovih fosfata je u sadržaju kontaminenata, što se najpre odnosi na fluor, koji može biti prisutan u visokim koncentracijama (1,5 - 3%), ali i prisustvo teških metala (arsen, kadmijum, vanadijum, živa, olovo...).

Tabela 3 – Sadržaj fosfora u pojedinim mineralnim hranivima

Mineralno hranivo	Ukupni fosfor (g/kg)
Defluorinisani fosfat	180
Monokalcijum fosfat	210
Dikalcijum fosfat	187
Monanatrijum fosfat	218
Dinatrijum fosfat	208

(preuzeto iz: NRC, 1994)

2.5. Metode ispitivanja iskoristivosti fosfora

Različita terminologija, kao i različiti pristupi ispitivanja iskoristivosti fosfora su u upotrebi među različitim istraživačima, ali i među različitim evaluacionim sistemima (NRC, 1994; INRA, 2004). Sledeće definicije biće korišćene u disertaciji.

Ukupni fosfor – podrazumeva celokupnu količinu fosfora u hrani, bez obzira na formu u kojoj je prisutan. Određuje se atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom, kolorimetrijski ili plazma spektrometrijom, nakon digestije datog uzorka.

Fitinski fosfor – je sav fosfor prisutan u formi fitinske kiseline (inozitol heksafosfat, IP6) ili njenih soli.

Nefitinski fosfor – je fosfor koji nije vezan u fitinski molekul. Izračunava se kao razlika između analitički dobijenog ukupnog i fitinskog fosfora. Ovaj termin ima široko raspostranjenu upotrebu u izražavanju potreba u fosforu za živinu (NRC, 1994).

Dostupni fosfor – podrazumeva onu količinu fosfora u hrani koja je biološki dostupna organizmu za apsorpciju i metabolizam, a često je označena i kao relativna biodostupnost fosfora. Dostupnost opisuje potencijal hrane za zadovoljavanje potreba životinje.

Dostupni fosfor se često meša sa nefitinskim fosforom. Osnovna razlika između ova dva termina je u tome što dostupni fosfor podrazumeva sve forme potencijalno apsorbovanog fosfora, neorganske i organske (uključujući i fitinski fosfor). Nefitinski fosfor, s druge strane, isključuje sav fitinski fosfor dostupan organizmu životinje.

Da se utvrdi količina dostupnog fosfora u hranivima koriste se metode u kojima se porede podaci dobijeni na nivou kostiju (količina pepela, količina fosfora, sila loma...) ili drugi izmereni rezultati (koncentracija neorganskog fosfora u krvi, prirast...) i, to između ispitujućeg izvora fosfora i određenog standarda (hrana sa niskim sadržajem fosfora).

Apsorbovani fosfor – je ona količina fosfora koja je zadržana u organizmu, a predstavlja razliku između količine fosfora unetog hranom i one količine fosfora koja je izlučena fecesom. Ovaj termin su opisali van der Klis i Versteegh (1996), a u upotrebi je u Holandiji, gde je ova metodologija označena kao „apsorptivni fosfor sistem“. Ipak, ove vrednosti smatraju se validnim samo pri niskim koncentracijama fosfora u hrani, što je za brojere 2–3 g/kg nefitinskog fosfora (Manangi i Coon, 2006).

Precekalni apsorbovani fosfor – se definiše kao ona količina fosfora iz hrane koja je apsorbirana na nivou terminalnog ileuma. Određuje se metodom sa inertnom materijom, a najčešće se koriguje za endogene gubitke fosfora, u cilju dobijanja što preciznijih rezultata.

Različite tehnike i kriterijumi u evaluaciji iskoristivosti fosfora su u upotrebi, pa se radi opisa i poređenja, metodologije mogu podeliti u tri osnovne grupe:

- ✓ Kvantitativna merenja dostupnosti fosfora;
- ✓ Kvalitativna merenja dostupnosti fosfora i
- ✓ *In vitro* testovi (testovi rastvorljivosti).

2.5.1. Kvalitativne metode

Kvalitativna merenja dostupnosti fosfora zasnovana su na merenju iskoristivosti fosfora iz ispitujućeg izvora, u ogledu u kome je pilad hranjena bazalnom hranom sa niskim sadržajem fosfora, ali i hranom sa različitim koncentracijama ispitujućeg fosfata, tokom 2 – 3 nedelje oglednog perioda. Prate se određeni parametri (prirast, konverzija, % pepela u kostima, sadržaj fosfora u kostima, sila loma, gustina kosti, koncentracija fosfora u krvi ili serumu, koncentracije ALP...) i porede se sa rezultatima dobijenim iz hrane sa standardnim fosfatom, kome se pripisuje dostupnost od 100% (Coon i sar., 2002).

Nelson i Peeler (1961) su postavili osnovne postulate za validnu komparaciju fosfata: 1. Koristi se osetljivi kriterijum merenja; 2. Koristi se hrana sa niskim sadržajem fosfora; 3. Koncentracije dodatog fosfora nisu iznad potreba životinja; 4. Koristi se adekvatan standardni izvor fosfora sa kojim se poredi ispitivani izvor fosfora.

Dobijeni rezultati se odnose primarno na neorganski fosfor i ne odražavaju apsolutnu dostupnost fosfora za životinje. Takođe, rezultati variraju u zavisnosti od primenjenog protokola, kao i vrste i porekla ispitivanih fosfata (IFP, 2006).

2.5.1.1. Sadržaj pepela i fosfora u kostima

Procenat pepela u kostima je najčešće korišćen kriterijum u proceni iskoristivosti, pri čemu je tibija kost izbora, a ovaj metod postavljen je od strane Gillis i sar. (1954). Osim tibije, u ovoj metodologiji korišćen je i femur (Gardiner, 1962; Orban i Roland, 1992; Moran i Todd, 1994; Chen i Moran, 1995; Hemme i sar., 2005; Angel i sar., 2006), ali i tarsus i prsti nogu (Yoshida i Hoshii, 1983; Mendez i Dale, 1998; Garcia i Dale, 2006). Hurwitz (1964) je postavio metodu baziranu na utvrđivanju količine fosfora u kostima, dok su Field i sar. (1974) ustanovili da je procenat kalcijuma u kostima takođe validan za ispitivanje iskoristivosti fosfora, zbog odnosa Ca i P kao komponenti hidroksiapatita (Ca:P = 2:1). Dokazani su visoki stepeni korelacije između utvrđenog hemijskog sastava koštanog tkiva i stepena iskoristivosti fosfora, pa se ova metoda smatra pouzdanom i senzitivnom. Kao osnovni nedostaci navode se dugotrajna priprema uzorka, tj. odstranjivanje mekih tkiva i čišćenje kosti, kao i dugotrajni period laboratorijskih analiza. Osim toga smatra se da dužina oglednog perioda utiče na dobijene rezultate (Ammerman i sar., 1961).

2.5.1.2. Sila loma

Rowland i sar. (1967) su prvi koristili silu loma kao indikator svarljivosti fosfora i kalcijuma, nakon čega je ovaj metod postao široko zastupljen u oglecima ovog tipa (Hayes i sar., 1979; Huyghebaert i sar., 1980; Ketels i De Groote, 1988; Burnell i sar., 1990; Chung i Baker, 1990; Orban i Roland, 1992; Coffey i sar., 1994; Ravindran i sar., 1995a; Lima i sar., 1997; Fernandes i sar., 1999; Leske i Coon, 2002; Hemme i sar., 2005; Coon i sar., 2007). Smatra se da rezultati ovih fizičkih ispitivanja mogu biti pod uticajem tipa instrumenta, primenjenih procedura za pripremanje kosti za analizu, kao i fizičkih i mehaničkih svojstava kosti (Orban i sar., 1993). Takođe, uzrast piladi, kao i unos fosfora hranom u preeksperimentalnom periodu mogu uticati na rezultate. Smatra se da je sila loma senzitivniji metod, kada se primenjuje kod mladih, brzorastućih životinja, pa tada varira linearno u zavisnosti od kvaliteta i dostupnosti suplementarnog fosfora (IFP, 2006).

2.5.1.3. Gustina kostiju

Merenje gustine kostiju u cilju utvrđivanja stepena iskoristivosti fosfora iz hrane, uveli su Meyer i sar. (1968), koji su adaptirali tzv. *Cameron-Sorenson* tehniku za merenje mineralnog sadržaja kostiju u humanoj medicini i primenili je na živini. Ova se metodologija razvijala, do primene rentgenskih zraka u merenji gustine kostiju tj. tzv. DEXA metode (*Dual-energy X-ray absorptiometry*). Ova se metoda može primeniti kao invazivna i neinvazivna, pa su u ogledu na nosiljama hranjenim različitim dijetarnim koncentracijama kalcijuma, ova merenja vršena *in vivo* (Hester i sar., 2004). Utvrđen je visok stepen korelacije ove metode sa sadržajem pepela u kostima, kao i silom loma, pa se ona smatra visoko senzitivnom (Onyango i sar., 2003). S' druge strane, DEXA omogućava samo površinsko merenje gustine kostiju (g/cm^2). Kompjuterizovana tomografija omogućava zapreminsko merenje gustine kosti (g/cm^3). Na taj

način, kortikalne i trabekularne vrednosti za gustinu mogu biti izražene. Ova metoda je pogodna za točne hibridne linije živine, zbog intenzivnijeg rasta i uvećanja telesne mase, a sa tim i intenzivnijeg remodeliranja skeleta koji će služiti kao potpora povećanoj telesnoj masi (Korver i sar., 2004).

Novije tehnike u merenjima gustine koštanog tkiva - digitalizovana fluoroskopija i amplituda-zavisna brzina protoka (Fleming i sar., 2000; Fleming i sar., 2004), su sa velikom preciznošću primenjivane kod nosilja.

2.5.1.4. Parametri krvi

Fosfor u krvi smatra se responzivnim na promene djetarne koncentracije fosfora, pa i ako čini samo 0,3% ukupne količine fosfora u organizmu, čest je parametar ispitivanja biološke dostupnosti fosfora. Koncentracije fosfora u krvi pokazuju lineranu zavisnost u odnosu na koncentraciju fosfora u hrani (Gardiner, 1962; Lima et al., 1997; Fernandes et al., 1999), ali je ovakva povezanost ustanovljena i za serumske koncentracije fosfora (Rama Rao i sar., 1999; Hemme i sar., 2005), pa se ova metodologija smatra validnom u utvrđivanju dostupnosti fosfora iz hrane. S' druge strane, aktivnost alkalne fosfataze u krvi ne smatra se zadovoljavajućim kriterijumom u ogledima ovog tipa, zbog kontradiktornih literaturnih podataka (Summers i sar., 1959; Lima i sar., 1997; Viveros i sar., 2002). Takođe, pojedini autori su stanovišta da ni koncentracije fosfora i kalcijuma u plazmi, kao ni aktivnost ALP, nisu pouzdani kriterijumi za utvrđivanje dostupnosti fosfora iz hrane kod živine, ako se uzme u obzir da su pod kontrolom endokrinog sistema (parathormon, kalcitonin i kalcitrol) i da mogu varirati sa hormonskim promenama (Gueguen, 1999; De Groote i Lippens, 2002; Auman, 2003). Odnosno, kako homeostatski mehanizmi drže koncentracije fosfora i kalcijuma u krvi u uskim granicama, odstupanje od ovih granica je pokazatelj visokih deficijencija ovih minerala. Pri manjim razlikama u dostupnosti fosfora iz hrane, razlike u serumskim koncentracijama fosfora ostaju maskirane povlačenjem fosfora iz telesnih depoa u krv.

2.5.1.5. *Proizvodne performanse*

Proizvodne performanse su korišćene kao kriterijum za ispitivanje biološke dostupnosti različitih makro i mikroelemenata iz hrane piladi. U evaluaciji izvora fosfora, najčešće zajedno sa sadržajem pepela u kostima, proizvodni rezultati se koriste od 40-ih godina prošlog veka. Tako je praćena telesna masa (Gillis i sar., 1948), konverzija (Mozok i sar., 1956), prirast (Vandepopuliere i sar., 1961). Brojleri su osetljiviji i pokazuju vidljivije razilke u proizvodnim performansama, prema razlikama u snabdevenosti mineralima hranom, u odnosu na druge životinjske vrste, zbog niskih telesnih rezervi minerala, kao i brze stope rasta (Jongbloed i Kemme, 2002). Ipak, postoje stanovišta da ovakvi rezultati nisu dovoljno precizni, najpre usled toga što su pod uticajem brojnih drugih i nutritivnih i nenutritivnih faktora (Nelson i Walker, 1964).

2.5.2. *Kvantitativne metode*

Biološki ogledi zasnovani na utvrđivanju performansi rasta, parametara krvi i kosti, obezbeđuju relativne vrednosti za dostupnost fosfora, pa su dobijeni podaci kvalitativne prirode. Stoga, ovakvi podaci imaju ograničen značaj za formulisanje obroka (Coon i sar., 2002). Za nivelisanje potreba u obroku neophodni su kvantitativni podaci o svarljivosti ključnih mineralnih materija (Coon i sar., 2002). Svarljivost fosfora može biti merena u ogledima svarljivosti koji obuhvataju dva osnovna tipa ogleda 1. ukupna svarljivost fosfora (tzv. *balance studies*) ili 2. ilealna svarljivost fosfora (tzv. *digestibility studies*). Osim ova dva tipa ogleda, određivanje sadržaja fosfora u celom telu takođe spada u kvantitativne metode.

2.5.2.1. Ukupna prividna svarljivost

Ukupna svarljivost se može definisati kao frakcija nekog nutritijenta koja nije izlučena fecesom (Lemme i sar., 2004). Ova metodologija je najčešće korišćena u ogledima na svinjama i živini. Utvrđivanje ukupne svarljivosti zasniva se na direktnoj kvantifikaciji dostupnog fosfora i to, kao odnos unetog fosfora hranom i one količine fosfora izlučene fecesom. Uopšteno, ovo izračunavanje može se predstaviti jednačinom:

$$\text{Ukupna svarljivost (\%)} = \frac{(\text{ukupni P unet hranom} - \text{ukupni P izlučen fecesom})}{\text{ukupni P unet hranom}} \times 100$$

Ovaj pristup izračunavanju svarljivosti je zastupljen kod svinja, kod kojih je moguće sakupljanje uzoraka fecesa bez mešanja sa urinom (Petersen i Stein, 2006; Fang i sar., 2007; Pedersen i sar., 2007; Yang i sar., 2007; Stein i sar., 2008; Akinmsuire i Adeola, 2009). Kod živine, postoje dva osnovna ograničenja ove metode. Najpre, usled mešanja fecesa i urina, ovi uzorci sadrže fosfor iz oba izvora. Urinarni put ekskrecije je jedan od glavnih puteva izlučivanja fosfora, pa su i dobijeni rezultati svarljivosti značajno pod uticajem ove frakcije fosfora. Povećanjem koncentracije fosfora u hrani, raste koncentracija fosfatnih jona u plazmi, do postizanja fiziološkog praga, nakon čega se oni izlučuju urinom iz organizma. Za brojlere, ovaj prag se postiže kada su koncentracije nefitinskog fosfora u hrani iznad 2 – 3 g/kg hrane, pa se ova metodologija smatra validnom kada su vrednosti nefitinskog fosfora u hrani ispod ovih graničnih koncentracija (Manangi i Coon, 2006). Drugi potencijalni razlog maskiranja pravih rezultata, jeste to što je utvrđivanjem svarljivosti fosfora na nivou celog GIT-a, uključeno moguće iskorišćavanje fosfora od strane mikroba debelog creva (Marounek i sar., 2010). S' druge strane, Vasan i sar. (2008) su u ogledu sa

brojlerima kojima je odstranjen cekum ustanovili da cekum nema značajan uticaj na iskorišćavanje fosfora.

Mnogi autori su poređenjem ukupne i ilealne svarljivosti dokazali slične rezultate, pa favorizuju utvrđivanje ukupne svarljivosti fosfora, na nivou celog digestivnog trakta. Ovakva metodologija je jednostavnija, jeftinija i ne zahteva žrtvovanje oglednih jedinki. Ipak, dobijeni rezultati su rezultati za prividnu svarljivost fosfora i moraju biti korigovani za endogene gubitke fosfora, da bi se utvrdile vrednosti prave svarljivosti fosfora.

2.5.2.2. Endogeni gubici fosfora

Endogeni gubici fosfora podrazumevaju onaj fosfor koji je prisutan u fecesu, a nije poreklom iz hrane. Endogeno poreklo fosfora obuhvata sekreciju pljuvačnih žlezda, želudačni i pankreasni sok, žuč i odlupljene epitelne ćelije GIT-a (Fan i sar., 2001).

Žuč je primarni izvor endogenog fosfora kod živine. Kod sisara, oko 90% žuči sastavljeno je od fosfolipida, a oko 80 - 95 % ovih žučnih fosfolipida čini fosfatidilholin (Cross i sar., 1987). Kod piladi, smatra se da na fosfatidilholin otpada oko 70,5% fosfolipida žuči, dok preostalih 29,5% otpada na fosfatidiletanolamin (Alvaro i sar., 1986). Fosfatidilholin se hidrolizuje na lizofosfatidilholin u duodenumu, dok se ostatak apsorbuje u jejunumu (Sklan i Budowski, 1978). Sadržaj fosfora u žuči raste pod uticajem kalcitonina (Yamaguchi i Katayama, 1982), a opada sa rastućim koncentracijama kalcijuma u hrani (Diaz-Castro i sar., 2013).

Fosfor poreklom iz digestivnih enzima značajno doprinosi endogenim gubicima fosfora. Kod ljudi se putem digestivnih enzima izluči oko 210 mg fosfora dnevno (Levi i Popovtzer, 1999). Podaci o sastavu pankresnog soka piladi su siromašni. Smatra se da je oko 40% endogenih minerala u duodenalnom sadržaju sekretovano od strane pankrasa (Zebrowska i sar., 1983). Pankreasna sekrecija svinja, sadrži Na i K, kao glavne katjone, sa niskom

koncentracijom P, Ca i Mg (Patridge i sar., 1982; Zebrowska i sar., 1983). Sastav obroka, pre svega proteini i vlakna, imaju značajan uticaj na sekreciju pankreasnog soka, tj. volumen i koncentraciju enzima (Patridge i sar., 1982; Valette i sar., 1992).

Odlupljene epitelne ćelije mukoze digestivnog trakta učestvuju u endogenim gubicima fosfora. Ovaj fosfor je pre svega poreklom iz fosfolipida ćelijske membrane, tj. sastavni je deo fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i sfingomijelina i u manjoj meri zastupljenog fosfatidilinozitola (Cooper, 2000).

Endogeni kalcijum takođe potiče iz sekrecije žuči, digestivnih enzima i odlupljenih mukoznih ćelija (Davis i sar., 2004; Namgung i Tsang, 2011). Kalcijum takođe može biti sekretovan paracelularnim putem, kada je intraluminalna koncentracija kalcijuma značajno niža od serumskih koncentracija Ca jona (Ghishan i sar., 1980).

Kalcijum u žuči je, u najvećoj meri, konjugovan u formi žučnih kiselina. Kod ljudi je samo oko 20 – 30% Ca u žuči jetre i 10 – 15% Ca žuči iz žučne kese u slobodnoj, jonizovanoj formi. Preostalih 70 – 90% od ukupnog Ca je konjugovano (Gleeson i sar., 1990). Slobodni Ca joni žuči mogu reagovati sa anjonima (karbonati, bilirubinati, fosfati i palmitati) i formirati nerastvorljive soli (Moore, 1984; Gleeson i sar., 1990). Sekrecija kalcijuma putem žuči primarno zavisi od koncentracije kalcijuma u plazmi. Zatim, kalcijum u hrani je jedan od faktora koji određuje koncentraciju kalcijuma u žuči (Jacyna, 1990). Kod ljudi, ekskrecija kalcijuma putem žuči je pod uticajem telesne mase i unosa fosfora hranom (Davies i sar., 2004).

Koncentracija kalcijuma u pankreasnom soku je niska, značajno niža nego u serumu. Ovaj put ekskrecije kalcijuma je od manjeg značaja u odnosu na žuč, pa tako značajno povećanje koncentracije kalcijuma u serumu rezultuje neznatim povećanjem koncentracije kalcijuma u pankreasnom soku.

Endogeni gubici fosfora se u ogledima svarljivosti mogu izračunavati na više načina.

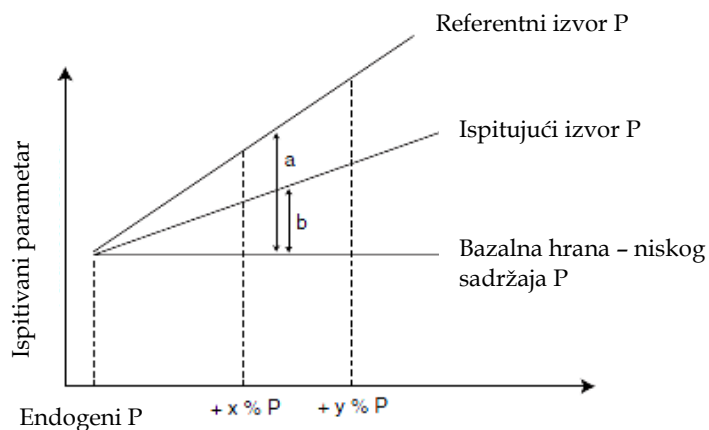
U novijim istraživanjima uvodi se u ogled grupa piladi hranjena sintetskom hranom, u kojoj je sadržaj fosfora podešen na 0% (tzv. *P free diet*). Ovakav obrok je najčešće formulisan od: kukuruznog skroba, želatina, saharoze, ulja soje, krede, VMD-a, so i smeša amino kiselina. Sav fosfor izdvojen iz fecesa ovako hranjene piladi je endogeni fosfor. Polazeći od pretpostavke da ukupni endogeni gubici fosfora nisu pod uticajem nivoa fosfora u hrani, oni se mogu iskoristiti za izračunavanje prave svarljivosti fosfora iz hrane formulisane za ostale ogledne grupe. Ovako dobijena vrednost iskoristivosti fosfora označena je i kao standardizovana svarljivost fosfora.

Najzastupljenije izračunavanje endogenih gubitaka je metodom linerane regresije, u kojoj vrednost odsečka regresione linije predstavlja procenjenu vrednost endogenih gubitaka. Iz jednačine linearne regresije preuzimaju se vrednosti za količinu endogenog fosfora, kao i za pravu svarljivost fosfora.

2.5.2.3. Ukupna prava svarljivost

Prava svarljivost fosfora podrazumeva korigovane vrednosti prividne svarljivosti za endogene gubitke fosfora, u cilju dobijanja što preciznijih rezultata. Izračunavanje prave svarljivosti linearnom regresijom pretpostavlja da je bazalna hrana ista za sve ogledne grupe, tj. da se korekcija oglednih obroka odnosi samo na mineralno hranivo u obroku, što ne utiče na ostali deo obroka.

Prava svarljivost se izračunava po jednačini linerane regresije $y = mx - a$, u kojoj je izvršena regresija između unosa fosfora hranom (x) i apsorbovanog fosfora (y). Izračunati ugao regresione prave, pomnožen sa 100 (m) predstavlja procenat prave svarljivosti (Zhang i Adeola, 2017).



Slika 6 – Linearna regresija u ispitivanju iskoristivosti fosfora
(Preuzeto iz: INRA, 2004)

Dodatno, prava svarljivost može se računski odrediti prema jednačini koju je preporučio Mc Dowell (2003).

$$\text{Prava svarljivost P (\%)} = 100 \times \frac{(\text{P unet hranom} - \text{P izlučen fecesom} - \text{endogeni gubici P})}{\text{P unet hranom}}$$

Na ovaj način izračunata prava svarljivost ukazuje na stepen potencijalne „greške“ u utvrđivanju ukupne iskoristivosti tj. maskiranja dobijenih rezultata endogenim fosforom.

2.5.2.4. Ilealna svarljivost fosfora

Izračunavanje iskoristivosti fosfora na nivou ileuma je metoda koja isključuje mogućnost uticaja urinarnog fosfora i mikroflore debelog creva, pa samim tim pruža preciznije rezultate (Shastak i Rodehutschord, 2013). Ipak, u komparativnim studijama je ustanovljeno da obe metode daju slične rezultate (Shastak i sar., 2012).

Za razliku od ukupne svarljivosti, gde se može koristiti metod totalne kolekcije fecesa i metod sa inertnom materijom, ovde se koristi samo metod sa inertnom materijom tzv. indikator metod. Inertna materija je ona koja se ne resorbuje iz GIT-a, ne deluje lokalno toksično u digestivnom traktu, ne utiče na iskoristivost nutritijenta, ima uniformnu stopu pasaže sa himusom kroz GIT i, ima visoku stopu detekcije i do 100%, kada se dodaje u oglednu hranu. Najčešće se u ove svrhe koriste titanijum dioksid ili hrom oksid, čija se količina, kao i količina fosfora utvrđuje u sadržaju ileuma. Jednačina po kojoj se računa svarljivost fosfora u ovom slučaju je:

$$\text{Ilealna svarljivost (\%)} = 100 - 100 \times \frac{(\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ hrana} \times \text{P}_{\text{ileum}})}{(\text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ ileum} \times \text{P}_{\text{hrana}})}$$

2.5.2.5. Sadržaj fosfora u celom telu

Analiza celog tela obezbeđuje kvantifikovanje fosfora koji je zadržan u organizmu životinje. Sadržaj fosfora u celom telu je određen na početku i na kraju ogleda, da bi se dobila informacija o količini zadržanog fosfora. Ovaj metod se smatra jednim od najpreciznijih za minerale koji imaju spor promet, kao što su kalcijum i fosfor. Ipak, negativne strane su obiman i naporan rad, teškoće u dobijanju homogenog reprezentativnog uzorka celog tela i na kraju, praktične teškoće u pripemanju i procesuiranju uzoraka, kao što su usitnjavanje i liofilizacija.

2.5.3. In vitro testovi

Pokušaj razvoja in vitro testova u određivanju bioiskoristivosti fosfora ima za svrhu izbegavanje ogleda na životinjama, koji su skupi, dugotrajni i teški za izvođenje. Ovakvi testovi odnose se na neorganske fosfate i nisu primenljivi

na organske, bez obzira da li su biljnog ili životinjskog porekla. Rezultati na ovaj način dobijeni su kontradiktorni, što dovodi u pitanje podobnost ove metode u oceni iskoristivosti fosfora. Testovi rastvorljivosti u hlorovodoničnoj kiselini, neutralnom amonijom citratu, limunskoj kiselini, sprovedeni u nizu ogleda, pokazali su da dobijeni rezultati ne korespondiraju biološkoj dostupnosti fosfora iz istih supstrata (Gillis i sar. ,1962; Day i sar., 1973). Takođe, rastvorljivosti u vodi je loš indikator iskoristivosti fosfora (Sullivan i sar., 1992; Gueguen, 1999). S' druge strane, Yoshida i sar. (1979) zapazili su visoko značajnu korelaciju između rastvorljivosti u limunskoj kiselini i biološke iskoristivosti fosfora kod piladi, ispitiujući više različitih neorganskih kalcijum fosfata, kao i izvora fosfora animalnog porekla. Ammerman (1995) ističe da je *in vitro* rastvorljivost generalno loš pokazatelj biološke dostupnosti fosfora. Ipak, testovi rastvorljivosti našli su primenu u proizvodnji mineralnih hraniva kao *screening* metoda, kojom se mogu isključiti nerastvorljivi izvori fosfora.

Kompjuterski kontrolisani sistemi *in vitro* simulacije digestivnog trakta našli su primenu u proceni energetske vrednosti hraniva za živinu. Ipak, u proceni iskoristivosti fosfora imaju limitarnu vrednost, s obzirom da na svarljivost fosfora mogu značajno uticati uslovi unutar GIT-a (veličina partikula hrane, precipitacija sa antinutritivnim faktorima, vreme pasaže do tankog creva...).

3. CILJ I ZADATAK RADA

U cilju ispitivanja stepena biološke iskoristivosti fosfora poreklom iz različitih neorganskih izvora u hrani, ispitivanja su bila usmerena na to da se omogući detaljniji uvid u proizvodne rezultate (telesnu masu, prirast, konzumaciju i konverziju hrane), pravu i prividnu svarljivost ukupnog fosfora iz kompletne smeše i stepen mineralizacije koštanog tkiva brojlera hranjenih obrocima sa i bez monokalcijum fosfata, kao izvora fosfora u hrani. Radni zadatak je zahtevao da se ispita:

- uticaj vrste neorganskog izvora fosfora na proizvodne rezultate;
- uticaj vrste neorganskog izvora fosfora na iskoristivost ukupnog fosfora iz hrane za brojlere;
- uticaj vrste neorganskog izvora fosfora na iskoristivost kalcijuma iz hrane za brojlere;
- uticaj vrste neorganskog izvora fosfora na stepen mineralizacije kostiju brojlera;
- kao i da se utvrde eventualne prednosti u korišćenju određene vrste mineralnog hraniva u ishrani brojlera.

Da bi se dobili naučno validni rezultati, primenljivi i u praksi, organizovan je ogled ishrane brojlera po grupno-kontrolnom sistemu u zavisnosti od količine ukupnog i iskoristivog fosfora i vrste neorganskog izvora fosfora u smešama. Pri tome su praćeni i obrađeni sledeći parametri:

1. Zdravstveno stanje i mortalitet;

2. Proizvodni rezultati:

a. telesna masa

b. prirast (ukupni i dnevni)

- c. konzumacija hrane (ukupna i dnevna)
- d. konverzija hrane;

3. Sadržaj mineralnih materija u biološkom materijalu:

- a. hrana
- b. feces
- c. krvni serum
- d. kosti;

4. Iskoristivost mineralnih materija:

- a. fosfor
- b. kalcijum;

5. Aktivnost alkalne fosfataze u krvnom serumu;

6. Stepen mineralizacije kostiju:

- a. sadržaj ukupnog pepela, kalcijuma, fosfora
- b. biomehanička ispitivanja – sila loma kostiju
- c. ispitivanja morfometrijskih osobina kostiju
- d. rentgenološka ispitivanja;

7. Međusobna zavisnost količine fosfora u hrani i stepena njegove dostupnosti organizmu, proizvodnih rezultata i stepena mineralizacije koštanog tkiva.

Svi dobijeni rezultati i podaci su obrađeni i statistički analizirani u cilju izvođenja relevantnih zaključaka, a prikazani su u vidu tabela, grafikona i slika.

4. MATERIJAL I METODE RADA

Ispitivanje uticaja različitih neorganskih izvora fosfora u ishrani brojlera na proizvodne rezultate, iskoristivost fosfora, kao i stepen mineralizacije koštanog tkiva izvršeno je ogledom ishrane. Prilikom postavljanja plana ogleda i izbora metoda uzeti su u obzir cilj i zadaci rada, kao i poznati podaci iz literature o mineralnim hranivima u ishrani brojlera.

4.1. Izbor materijala

U cilju ispitivanja uticaja različitih neorganskih izvora fosfora u ishrani brojlera na proizvodne rezultate, iskoristivost fosfora, kao i stepen mineralizacije koštanog tkiva organizovan je ogled ishrane, po grupno-kontrolnom sistemu, na privatnoj farmi u Novoj Pazovi, u trajanju od 42 dana. U ogled je uključeno 300 jednodnevne piladi, Cobb 500 provenijencije, oba pola, poreklom iz iste inkubatorske stanice, ujednačene telesne mase.

4.2. Držanje i ishrana piladi

Tokom ogleda tehnologija držanja i ishrane brojlera bila je prilagođena komercijalnim uslovima, po uobičajenoj, redovnoj proizvodnji na farmi, uz minimalne modifikacije koje je zahtevalo izvođenje ogleda. Postupak sa piladima tokom ogleda u smislu primene preventivnih mera, smeštaja, nege i načina hranjenja i pojenja, bio je prilagođen podnom načinu odgoja. Hrana i voda su bili obezbeđeni po volji (*ad libitum*). Zoohigijenski i mikroklimatski uslovi su u potpunosti odgovarali tehnološkim normativima za ovu provenijenciju, kao i uzrasnu kategoriju piladi.

4.3. Formiranje ogleda

Prilikom formiranja ogleda izvršen je pojedinačan klinički pregled piladi, tako da su sve odabrane jedinke bile zdrave, vitalne i u dobroj kondiciji. Prilikom formiranja grupa, pilad je bila ujednačena po roditeljskom poreklu, telesnoj masi i polu. Pre početka ogleda izvršene su uobičajene preventivne mere, a tokom ogleda svakodnevno je praćeno zdravstveno stanje oglednih jedinki.

Ogled je izveden na ukupno 300 piladi, podeljenih u tri jednake grupe (od po 100 jedinki), sa jednakim odnosom polova. Ogled je trajao 42 dana i bio je podeljen u tri faze (I faza - 1 - 21. dana za potpunu smešu za tov piladi I (starter), II faza - 22 - 35. dana za potpunu smešu za tov piladi II (grover) , III faza - 36 - 42. dana za potpunu smešu za tov piladi III (finišer)). Tokom ogleda praćeni su proizvodni rezultati i zdravstveno stanje piladi, sa posebnim osvrtom na stepen mineralizacije kostiju piladi. Po 10 jedinki iz svake grupe prebaćeno je 11. i 25. dana ogleda u individualne kaveze, sa ciljem da se obezbedi uzorkovanje fecesa za ispitivanje svarljivosti. Na kraju ogleda žrtvovano je po 12 jedinki iz svake grupe. Prilikom žrtvovanja uzeti su uzorci krvi i kostiju za predviđena ispitivanja.

4.4. Ishrana piladi

Sve ogledne grupe su hranjene smešama standardnog sirovinskog sastava, koje su zadovoljavale potrebe za starosnu dob i provenijenciju piladi u tovu, po preporukama NRC (1994), za sve nutritijente osim za kalcijum i fosfor (tabela 4).

Tabela 4 – Sirovinski sastav smeša za ishranu piladi, [%]

Hraniva	u % smeše		
	I - starter	II - grover	III - finišer
Kukuruz	54,12	60,45	62,55
Sojina sačma	23,00	16,00	10,00
Sojin griz	18,00	19,00	23,00
Monokalcijum fosfat (MCP)	1,43	1,30	1,30
So	0,35	0,35	0,35
Stočna kreda	1,60	1,40	1,30
Vitaminsko - mineralni dodatak*	1,50	1,50	1,50
Ukupno	100	100	100

* Vitaminsko - mineralni dodatak obezbedio je, na kg smeše: Vitamin A 12.999 I.J., Vitamin D3 4.950 I.J., Vitamin E 75 mg, Vitamin K3 3 mg, Vitamin B1 3 mg, Vitamin B2 7,95 mg, Vitamin B6 4,05 mg, Vitamin B12 0,0195 mg, Vitamin C 19,95 mg, Biotin 0,15 mg, Niacin 60 mg, Kalcijum pantotenat 15 mg, Folna kiselina 1,95 mg, Jod 1,0005 mg, Selen 0,3 mg, Holin hlorid 399,9 mg, Gvožđe 39,99 mg, Bakar 15 mg, Mangan 99,9 mg, Cink 99,9 mg, Metionin 2100 mg, Lizin 1200 mg

Osnovni zadatak bio je da se utvrdi uticaj ishrane piladi sa različitim izvorima fosfora na proizvodne rezultate, zdravstveno stanje i stepen mineralizacije kostiju. Zbog toga su smeše korigovane samo po pitanju sadržaja mineralnih hraniva, tako da su za dve ogledne grupe (O - I i O - II) u hranu dodata dva različita monokalcijum fosfata, kao neorganski izvor fosfora, delimičnom zamenom kukuruza u smeši. Ogledna grupa O - I hranjena je hranom sa monokalcijum fosfatom proizvođača „Elixir Feed“ DOO, Šabac, Srbija, dok je za oglednu grupu O - II u hranu dodat monokalcijum fosfat proizvođača „Balakovo Mineral Fertilizers“, Balakovo, Rusija. Treća ogledna grupa (kontrolna - K) dobijala je smešu u kojoj je ukupna količina fosfora poticala isključivo iz biljnih hraniva. Smešama za ishranu svih oglednih grupa dodat je hrom trioksid (Cr_2O_3) kao inertna materija, u količini od 0,5% vazdušno-suve materije (VSM).

Osim po poreklu i načinu proizvodnje ispitivani monokalcijum fosfati su se međusobno razlikovali i po hemijskom sastavu, tako da je u oglednoj grupi O - I monokalcijum sadržao 98% suve materije, 22,5% ukupnog fosfora i 15% ukupnog kalcijuma, dok je sastav monokalcijum fosfata za oglednu grupu O -II bio: 96% suve materije, 22% ukupnog fosfora i 15% ukupnog kalcijuma.

4.5. Hemijski sastav hrane

Hemijski sastav potpunih smeša korišćenih za ishranu ogledne piladi prikazan je u tabelama 5, 6 i 7. Iz tabela se uočava da je hemijski sastav takav da s' jedne strane, zadovoljava potrebe, a sa druge strane odgovara zahtevima koje smo postavili u ogledu.

Tabela 5 – Hemijski sastav smeša za ishranu piladi od 1 – 21. dana, [%]

Hemijski sastav	Grupa		
	K	O - I	O - II
Vlaga	13,92	13,28	13,53
Sirovi pepeo	4,94	6,90	6,55
Sirovi proteini	21,30	21,34	21,02
Mast	5,90	5,58	5,31
Sirova celuloza	3,13	3,71	3,40
BEM	50,81	49,19	50,19
Ca	0,70	1,13	1,10
P	0,43	0,79	0,80
Nefitinski P*	0,042	0,256	0,256
Lizin *		1,18	
Metionin i cistein *		0,602	
Triptofan *		0,312	
Na		1,529	
K		8,146	
Cl		2,434	
EB [mEq/kg] §		206,7	
Metabolička energija [MJ/kg]*		13,4	

* računato po preporukama INRA-AFZ (2004)

§ EB – elektrolitni broj, računat po preporukama Mongin (1981)

Tabela 6 – Hemijski sastav smeša za ishranu piladi od 22 – 35. dana, [%]

Hemijski sastav	Grupa		
	K	O - I	O - II
Vlaga	13,23	13,41	13,64
Sirovi pepeo	4,89	5,82	5,07
Sirovi proteini	19,76	19,35	18,49
Mast	6,54	7,04	6,81
Sirova celuloza	4,95	5,50	5,25
BEM	50,63	48,88	50,14
Ca	0,75	1,05	0,86
P	0,43	0,67	0,66
Nefitinski P*	0,044	0,239	0,239
Lizin *		1,01	
Metionin i cistein *		0,544	
Triptofan *		0,275	
Na		1,474	
K		7,174	
Cl		2,438	
EB [mEq/kg] §		179,06	
Metabolička energija [MJ/kg]*		13,5	

* računato po preporukama INRA-AFZ (2004)

§ EB – elektrolitni broj, računat po preporukama Mongin (1981)

Tabela 7 – Hemijski sastav smeša za ishranu piladi od 36 – 42. dana, [%]

Hemijski sastav	Grupa		
	K	O – I	O – II
Vlaga	13,68	13,73	13,60
Sirovi pepeo	4,33	5,60	4,84
Sirovi proteini	18,16	17,38	17,90
Mast	6,53	6,87	7,14
Sirova celuloza	2,94	3,65	2,83
BEM	54,36	53,53	52,93
Ca	0,69	0,99	0,77
P	0,35	0,65	0,58
Nefitinski P*	0,054	0,249	0,249
Lizin *		0,932	
Metionin i cistein *		0,517	
Triptofan *		0,256	
Na		1,431	
K		6,612	
Cl		2,412	
EB [mEq/kg] §		162,684	
Metabolička energija [MJ/kg]*		13,5	

* računato po preporukama INRA-AFZ (2004)

§ EB – elektrolitni broj, računat po preporukama Mongin (1981)

4.6. Zdravstveno stanje

Pored preventivnog programa zaštite, sve ogledne jedinice su bile pod stalnom veterinarsko – medicinskom kontrolom, a sve promene zdravstvenog stanja su praćene i beležene. Svakodnevna opservacija vršena je pojedinačnom i grupnom adspekcijom, a posebna pažnja bila je usmerena na aktivnost i stanje lokomotornog aparata piladi. Mortalitet je svakodnevno praćen i beležen.

4.7. Proizvodni rezultati

Kontrolna merenja telesne mase oglednih jedinki izvršena su prvog, sedmog, 21, 35. i 42. dana, na tehničkoj vagi sa tačnošću od 10^{-2} kg. Na osnovu rezultata merenja izračunavana je prosečna telesna masa, a iz razlika telesnih masa ukupni prirast, dok je dnevni prirast izračunavan na osnovu trajanja pojedinih faza, kao i ogleđa u celini.

Tokom ogleđa tačno je merena količina potpunih smeša datih oglednim grupama. Na kraju svake faze i ogleđa u celini, na osnovu sabiranja dnevnih količina, utvrđen je utrošak hrane. Iz dobijenih podataka o konzumaciji i prirastu izračunavana je konverzija hrane i to posebno za svaku fazu, kao i za ogleđ u celini.

4.8. Uzorkovanje materijala za analize

Tokom ogleđa, osim praćenja proizvodnih rezultata i zdravstvenog stanja piladi, uzeti su uzorci hrane, fecesa, krvi i kostiju za predviđena ispitivanja navedena u zadacima.

Uzorci hrane za hemijska ispitivanja uzeti su na propisan način (u skladu sa Pravilnikom, 1987). Uzorci su uzeti neposredno pre početka ogleđa.

Uzorci fecesa uzeti su u dva ogledna perioda i to tako što je 11. i 25. dana po 10 piladi iz svake grupe nasumično odabrano i premešteno u individualne metaboličke kaveze. Ovi kavezi, dimenzija 45 cm × 50 cm × 45 cm, opremljeni su pojilicom i hranilicom na frontalnoj strani kaveza, dok je ispod kaveza smeštena tacna, iz koje je omogućeno uzimanje uzoraka fecesa. Uzorkovanje je vršeno dva puta dnevno tokom pet uzastopnih dana. Uzorci fecesa su zamrzavani i čuvani pri -20 °C do momenta analize. Nakon odmrzavanja, od pojedinačnih uzoraka pravljene su zbirne, za svaku jedinku, tj. od pet

pojedinačnih uzoraka uzetih tokom pet dana od jedne jedinke, napravljen je jedan zbirni uzorak za tu oglednu jedinku.

Na kraju ogleda (42. dana) žrtvovano je po 12 jedinki iz svake grupe, sa jednakim odnosom polova, u cilju uzimanja uzoraka krvi i kostiju za predviđena ispitivanja, a od svake jedinke uzeti su golenjača - *tibiotarsus* (u daljem tekstu tibija) i pisak - *tarsometarsus* (u daljem tekstu tarzus) obe noge. Uzorci kostiju i krvnog seruma zamrzavani su pri -20 °C i držani do momenta ispitivanja.

4.9. Iskoristivost fosfora i kalcijuma

Određivanje iskoristivosti fosfora i kalcijuma izvršeno je indirektnom metodom, koja se zasniva na praćenju odnosa između inertne materije i mineralnih elemenata (fosfora i kalcijuma) u suvoj materiji hrane i fecesa. Pod inertnom materijom se podrazumeva supstanca koja se ne resorbuje i ne utiče na iskoristivost drugih hranljivih materija, proizvodne rezultate i zdravstveno stanje oglednih jedinki. Kao inertna materija korišćen je hrom trioksid (Cr_2O_3), koji je dodat smešama u količini od 0,5%.

Nakon uzorkovanja hrane i fecesa i izvršenih hemijskih analiza, izračunavana je prividna svarljivost fosfora i kalcijuma prema formuli (1). Količina apsorbovanog fosfora, količina dnevnog unosa fosfora hranom, kao i količina dnevno izlučenog fosfora fecesom, za svaku jedinku izračunvani su prema formulama (2, 3, 4).

$$\text{Prividna svarljivost (\%)} = 100 - \frac{100 \times (\text{Cr}_2\text{O}_3_{\text{ hrana}} \times \text{P}_{\text{ feces}})}{(\text{Cr}_2\text{O}_3_{\text{ feces}} \times \text{P}_{\text{ hrana}})} \quad (1)$$

Gde su $\text{Cr}_2\text{O}_3_{\text{ hrana}}$ i $\text{Cr}_2\text{O}_3_{\text{ feces}}$ koncentracije Cr_2O_3 u hrani i u fecesu (g/kg); $\text{P}_{\text{ hrana}}$ i $\text{P}_{\text{ feces}}$ koncentracije fosfora u hrani i u fecesu (g/kg).

$$P_a = P_{du} - P_{di} \quad (2)$$

$$P_{du} = K_h \times P_{hrana} \quad (3)$$

$$P_{di} = F_m \times P_{feces} \quad (4)$$

Gde je P_a količina apsorbiranog fosfora (mg/dan); P_{du} količina dnevnog unosa fosfora hranom (mg/dan); P_{di} količina dnevno izlučenog fosfora fecesom (mg/dan); K_h dnevna konzumacija hrane (mg/dan); P_{hrana} koncentracija fosfora u hrani; F_m masa fecesa po danu za svaku jedinku i P_{feces} koncentracija fosfora u fecesu.

Prava svarljivost fosfora izračunavana je pomoću linearne regresije, tj. regresijom dnevne količine apsorbiranog fosfora u odnosu na dnevni unos fosfora hranom prema jednačini (5).

$$P_a = (\text{prava svarljivost} \times P_{dh}) - \text{EGP} \quad (5)$$

Gde je prava svarljivost (%) ugao regresione jednačine izražen u procentima, a endogeni gubici fosfora (EGP) predstavljaju negativan odsečak regresione prave (mg/dan).

Izračunati endogeni gubici fosfora, upotrebljeni su za izračunavanje prave svarljivosti fosfora prema jednačini (6).

$$\text{Prava svarljivost (\%)} = \frac{P_{du} - P_{dh} - \text{EGP}}{P_{du}} \times 100 \quad (6)$$

Gde je P_{du} količina dnevnog unosa fosfora hranom (mg/dan); P_{di} količina dnevno izlučenog fosfora fecesom (mg/dan); EGP endogeni gubici fosfora (mg/dan).

4.10. Metode hemijske analize

U uzorcima hrane utvrđen je osnovni hemijski sastav, za šta su korišćene sledeće metode.

-Određivanje sadržaja sirovih proteina (metoda po Kjeldalu)

Princip metode: zagrevanjem uzorka sa koncentrovanom sumpornom kiselinom, uz prisustvo katalizatora (kalijum sulfat i bakar sulfat) razlaže se organska materija, a azot, koji se pri tome oslobađa u obliku amonijaka, gradi sa sumpornom kiselinom amonijum sulfat. Dejstvom koncentrovane baze na stvoreni amonijum sulfat, oslobađa se amonijak destilacijom, koji se prikuplja u kiselini i titruje bazom poznatog molariteta. Na osnovu određene količine amonijaka, odnosno azota, množenjem sa faktorom 6,25 izračunava se sadržaj proteina u ispitivanom delu uzorka (SRPS ISO 5983/2001).

-Određivanje sadržaja vlage i drugih isparljivih materija

Princip metode: gubitak mase dela uzorka za ispitivanje koji nastaje sušenjem pri 103 ± 2 °C (SRPS ISO 6496/2001).

-Određivanje sadržaja masti

Princip metode: hidroliza dela uzorka za ispitivanje sa hlorovodoničnom kiselinom uz zagrevanje. Nakon hlađenja i filtriranja rastvora, ostatak se ispere i osuši, a zatim se mast iz ostatka ekstrahuje petrol etrom korišćenjem aparature po Soxhlet-u. Rastvarač se ukloni destilacijom i sušenjem, a ostatak se izmeri (SRPS ISO 6492/2001).

-Određivanje sadržaja sirovog pepela

Princip metode: udaljavanje organske materije i vode iz dela uzorka za ispitivanje žarenjem pri 550 °C i merenje dobijenog ostatka – pepela (SRPS ISO 5984/2002).

-Određivanje sadržaja sirove celuloze (metoda sa međufiltracijom)

Princip metode: deo uzorka za ispitivanje tretira se ključalom razblaženom sumpornom kiselinom. Ostatak se odvaja filtracijom, zatim ispira i tretira ključalim rastvorom kalijum-hidroksida. Nakon odvajanja ostatka

filtracijom, ispiranja, sušenja i merenja, ostatak se žari. Gubitak mase nakon žarenja odgovara masi sirove celuloze u delu uzorka za ispitivanje (SRPS ISO 6865/2004).

-Određivanje bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM)

Sadržaj bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM) (%) je određen računski prema formuli: $BEM = 100 - (\% \text{ vlaga} + \% \text{ pepeo} + \% \text{ celuloza} + \% \text{ proteini} + \% \text{ mast})$ (Sinovec i Ševković, 1995).

Uzorci hrane, fecesa i kostiju sušeni su do apsolutno suve materije, a zatim pripremani za analizu razaranjem suvim ili mokrim postupkom. Analize svih uzetih i pripremljenih uzoraka za određivanje fosfora izvršene su korišćenjem spektrofotometrijske metode, dok je kalcijum određen atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom (AAS) na aparatu Perkin-Elmer AAnalyst 700 MHS. U uzorcima hrane, fecesa, krvnog seruma i kostiju za određivanje sadržaja fosfora i kalcijuma korišćeni su sledeći postupci.

-Određivanje sadržaja fosfora (spektrometrijska metoda)

Princip metode: suvo spaljivanje dela uzorka za ispitivanje uz prisustvo kreča pri 550 °C i kiseloj hidrolizi pepela. Deo kiselog rastvora za ispitivanje, pomeša se sa molibdovanadat reagensom i meri intenzitet dobijenog žutog kompleksa na talasnoj dužini od 430 nm (SRPS ISO 6491/2002).

-Određivanje sadržaja kalcijuma (metoda atomskeapsorpcione spektrometrije)

Princip metode: sušenje dela uzorka za ispitivanje pri 103 ± 2 °C, suvo spaljivanje dela uzorka za analizu, tretiranje pepela hlorovodoničnom kiselinom i određivanje sadržaja kalcijuma atomsko apsorpcionom spektrometrijom (AAS), plamenom tehnikom iz rastvora uz prisustvo lantan hlorida (modifikovana SRPS ISO 6869/2008).

U uzorcima hrane i fecesa određen je hrom korišćenjem atomske apsorpcione spektrofotometrije sa grafitnom krivom (AAS-HGA) na aparatu Perkin-Elmer AAnalyst 700. Pri tome je korišćen sledeći postupak.

-Određivanje sadržaja hroma (metoda atomskeapsorpcione spektrometrije)

Princip metode: sušenje dela uzorka za ispitivanje pri 103 ± 2 °C, mikrotalasno razaranje smešom koncentrovane azotne kiseline i vodonikperoksida. Određivanje sadržaja hroma atomsko apsorpcionom spektrometrijom (AAS), plamenom tehnikom (modifikovana SRPS ISO 14083/2008).

Nakon uzimanja krvi iz vene jugularis od po 12 jedinki iz svake ogledne grupe, krvni serum je izdvojen centrifugovanjem na 3000 obrtaja u minuti. Koncentracije kalcijuma i fosfora određene su po gore opisanim metodama, a aktivnost alakalne fosfataze metodom IFCC kinetički, kolorimetrijski metod (AMP pufer).

4.11. Metode fizičke analize kostiju

Nakon odmrzavanja uzoraka kostiju izvršeno je dodatno odstranjivanje ostataka mekih tkiva. Na ovaj način pripremljeni uzorci podvrgnuti su fizičkim ispitivanjima.

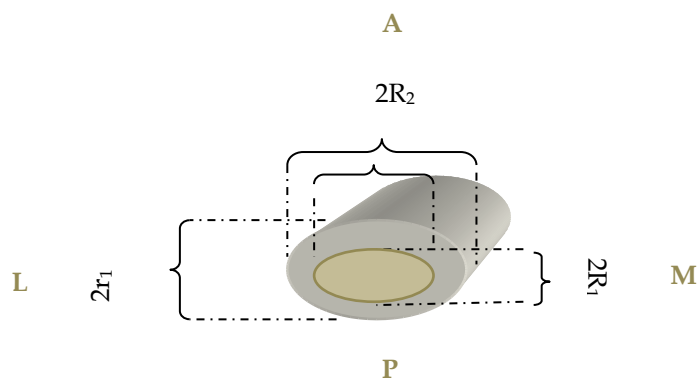
Biomehaničke i morfometrijske analize

Čvrstina kostiju (leva tibija - pisak i levi tarzus - golenjača) ispitana je modifikovanim metodom sile loma na aparatu IPINIS (Mašić i sar., 1985; Vitorović, 1992). Korišćena je metoda sa tri tačke oslonca, sa rastojanjem tačaka oslonca na koje se postavlja kost od 40 mm. Sila je delovala odozgo na srednji deo dijafize do postizanja loma [kg].

Za ispitivanje makroskopske strukture korišćena je desna golenjača. Izvršeno je presecanje srednjeg dela dijafize, upravno na uzdužnu osu kosti. Na dobijenom preseku mereni su spoljašnji i unutrašnji poluprečnici [mm] (slika 7):

R_1 i R_2 - poluprečnik, spoljašnji, u AP (antero - posteriornom) pravcu i u LM (latero - medijalnom) pravcu;

r_1 i r_2 - poluprečnik, unutrašnji, u AP (antero - posteriornom) pravcu i u LM (latero - medijalnom) pravcu.



Slika 7 – Poprečni presek tibije

U cilju određivanja:

P_u – površine ukupnog poprečnog preseka dijafize kosti;

P_m – površine poprečnog preseka medularne šupljine kosti;

P_k – površine poprečnog preseka kortikalnog dela dijafize kosti.

Polazeći od činjenice da poprečni presek dijafize golenjače brojlera ima elipsoidni oblik, za izračunavanje površina ovih poprečnih preseka korišćena je jednačina za površinu elipse:

$$P_u = \pi R_1 R_2 = 3,14 R_1 R_2 \text{ [mm}^2\text{]}$$

$$P_m = \pi r_1 r_2 = 3,14 r_1 r_2 \text{ [mm}^2\text{]}$$

$$P_k = P_s - P_m \text{ [mm}^2\text{]}$$

Rentgenografska ispitivanja

Rentgenološka ispitivanja strukture prvog reda (kortikalis, kompakta i spongioza) tibije i tarszusa izvršena su na stacionarnom rentgen aparatu „Selenos 4“ uz upotrebu kondicija od 35 KV, 16-20Mas i FOO-100 cm.

Kompjuterizovana tomografija (tomoskener)

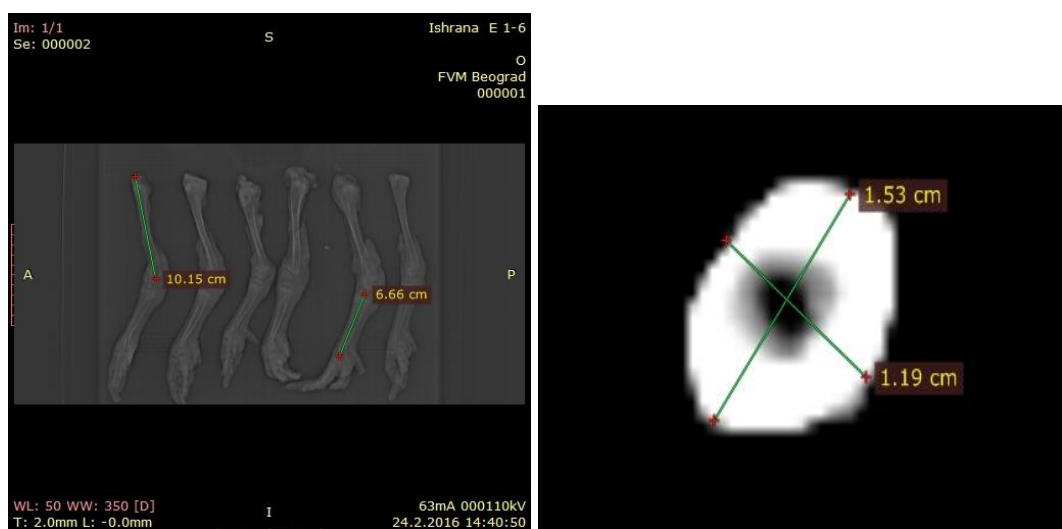
Snimanja kostiju živine obavljena su monoslajsnim aparatom za kompjuterizovanu tomografiju (CT) SOMATOM AR STAR. Snop rentgenskih zraka pravio je preseke kroz slojeve tkiva debljine 5 mm. Rađeni su

transverzalni skenovi uz upotrebu kondicija od 110 kV i 105 mA, nakon čega je izvršena multiplanarna (MPR) rekonstrukcija dobijenih snimaka, a gustina tkiva (radiodenzitet) izražen je u Hounsfieldovim jedinicama [HU]. Na kostima je merena koštana gustina kortikalnog dela kosti i to na poprečnim presecima u nivou proksimalne epifize, 1/2 dužine dijafize i distalne epifize. Na navedenim presecima, koštana gustina merena je na četiri mesta: anteriornom, posteriornom, lateralnom i medijalnom, a od izmerenih vrednosti izračunavana je prosečna vrednost.

Na kostima podvrgnutim CT snimanju, mereni su i linearni parametri (slika 8):

- dužina kostiju (tibije i tarzusa) od proksimalnog do distalnog kraja, izražena u cm;
- na preseku središnjeg dela dijafize spoljašnji i unutrašnji prečnici u antero - posteriornom (AP) i latero - medijalnom (LM) pravcu.

Izmerene vrednosti prečnika, korišćene su za izračunavanje površina porečnih preseka, po formuli za elipsu, na isti način kao i u morfometrijskim analizama, što je i objašnjeno u prethodnom potpoglavlju.



Slika 8 – Linearni parametri na kostima mereni CT - om

4.12. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati oglada grupisani su u odgovarajuće statističke serije i obrađeni uz primenu nekoliko matematičko – statističkih modela. Korišćeni su deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, standardna greška, mere varijacije – standardna devijacija, minimalna vrednost, maksimalna vrednost, koeficijent varijacije i interval varijacije). Testom analiza varijanse (ANOVA) kao i ortogonalnim polinomijalnim kontrastom (linearni i kvadratni) izvršeno je međusobno poređenje i utvrđivanje statistički značajnih razlika svih tretmana. Naknadne analize značajnosti statističkih razlika između pojedinih tretmana izvršene su Tukey post testom. Ispitivanje stepena prave iskoristivosti fosfora izvršeno je testom linearne regresije. Stepem međusobne zavisnosti dva ispitivana parametra izražen je *Pearson*-ovim koeficijentom korelacije. Svi testovi su korišćeni na nivou rizika od 5%, 1% i 0,1%, pa su prema tome i zaključci dati sa odgovarajućom verovatnoćom (95%, 99%, 99,9%).

Svi dobijeni i obrađeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza rađena je u paketu Graph Pad Prism 6.0., kao i IBM SPSS statistics 23.

5. REZULTATI ISPITIVANJA

U narednom poglavlju prikazani su podaci dobijeni hemijskim analizama kompletnih smeša, proizvodni rezultati, rezultati dobijeni hemijskim analizama fecesa i krvi, hemijskim i fizičkim analizama kostiju. Zbog bolje preglednosti rezultati su prikazani u vidu tabela, grafikona i slika za odgovarajuće ispitivane parametre.

5.1. Zdravstveno stanje

Brojleri eksperimentalnih grupa O - I i O - II bili su skladne telesne građe, pravilno razvijenog koštanog i mišićnog tkiva, živahnog temperamenta i dobre kondicije. Perje, koža i vidljive sluznice bile su uobičajenog izgleda, bez osobenosti. Appetit je bio dobar, a feces uobičajeno formiran. Sposobnost aktivnog kretanja i koordinacija pokreta bili su usklađeni, a mišićni tonus normalno izražen. Kod piladi kontrolne grupe (K), mada je pokretljivost bila očuvana i nije bilo vidljivih promena lokomotornog aparata, zapaženo je zaostajanje u rastu, što je praćeno i smanjenjem obima razvoja mišićnog tkiva.

Mortalitet tokom ogleda se, u sve tri ogledne grupe, kretao u okvirima tehnoloških normativa, bez značajnih razlika među grupama. U oglednoj grupi O - I nije bilo uginuća, a u oglednoj grupi O - II došlo je do uginuća tri jedinke i kontrolnoj (K) grupi četiri jedinke, za ceo ogled zbirno.

5.2. Proizvodni rezultati

Kretanje telesne mase piladi tokom ogleda po fazama prikazano je u tabeli 8 i prilogu 1. Pri postavljanju ogleda (prvog dana) pilad su imala ujednačenu telesnu masu, sa minimalnim numeričkim, ne i statistički značajnim razlikama. Jedinke obe ogledne grupe u odnosu na kontrolnu grupu, postigle su visoko statistički signifikantno veću telesnu masu ($p < 0,01$ i $p < 0,001$) u

svim fazama ogleda, kao i za ogled u celosti. Pilad oglednih grupa, hranjena smešama koje su sadržale dva različita izvora neorganskog fosfora, pokazala su razlike u izmerenoj telesnoj masi na nivou značajnosti od 99,9% - sedmog dana, 95% - 21. dana i sa značajnošću od 95% posmatrano za ceo ogled zbirno (tj. $p < 0,05$ i $p < 0,001$, analogno).

Tabela 8 – Telesna masa brojlera tokom ogleda, ($n=100$), [g]

Period ogleda	Grupa		
	K	O - I	O - II
1. dan	47,26 ± 2,62	47,62 ± 3,61	47,56 ± 3,00
7. dan	146,83 ± 17,21 ^{y,A}	154,12 ± 15,37 ^{x,A}	163,81 ± 16,86 ^{x,y}
21. dan	505,16 ± 131,94 ^{x,y}	824,26 ± 77,22 ^{a,x}	853,74 ± 96,77 ^{a,y}
35. dan	1161,39 ± 341,55 ^{x,y}	1830,25 ± 211,96 ^x	1873,18 ± 262,46 ^y
42. dan	1741,20 ± 454,55 ^{x,y}	2519,00 ± 249,10 ^{a,x}	2443,25 ± 273,54 ^{a,y}

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ $a,b,c...p < 0,05$ $A,B,C... p < 0,01$ $x,y,z...p < 0,001$

Prosečan ukupni prirast piladi obe ogledne grupe koje su dobijale monokalcijum fosfat, kao mineralno hranivo, bio je u granicama predviđenim tehnološkim normativima za ovu provenijenciju i dob života (tabela 9, prilog 2). Ostvaren ukupni prirast obe ogledne grupe u odnosu na kontrolnu grupu (K), u svim fazama ogleda, bio je statistički značajno veći, sa visokim do vrlo visokim nivoom značajnosti ($p < 0,01$ i $p < 0,001$).

Tabela 9 – Ukupni prirast piladi tokom ogleada, (n=100), [g]

Period ogleada	Grupa		
	K	O - I	O - II
1 - 7. dan	99,57 ± 16,79 ^{y,A}	106,50 ± 16,36 ^{x,A}	116,25 ± 16,92 ^{x,y}
7 - 21. dan	358,33 ± 129,17 ^{x,y}	670,14 ± 76,97 ^x	689,93 ± 97,38 ^y
21 - 35. dan	652,95 ± 322,00 ^{x,y}	1005,99 ± 232,30 ^y	1017,87 ± 276,60 ^x
1 - 42. dan	1693,98 ± 454,40 ^{x,y}	2471,38 ± 249,13 ^{a,x}	2395,68 ± 273,20 ^{a,y}

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ a,b,c... $p < 0,05$ A,B,C... $p < 0,01$ x,y,z... $p < 0,001$

Ostvaren dnevni prirast po fazama ogleada, kao i za ogled u celosti, pokazao je isti trend kretanja kao i ukupan prirast, tj. zabeleženi rezultati za prosečan dnevni prirast analogni su onima za prosečan ukupan prirast (tabela 10, prilog 3).

Tabela 10 – Dnevni prirast piladi tokom ogleada, (n=100), [g]

Period ogleada	Grupa		
	K	O - I	O - II
1 - 7. dan	14,22 ± 2,40 ^{y,A}	15,21 ± 2,34 ^{x,A}	16,61 ± 2,42 ^{x,y}
7 - 21. dan	25,60 ± 9,23 ^{x,y}	47,87 ± 5,50 ^x	49,28 ± 6,96 ^y
21 - 35. dan	46,64 ± 23,00 ^{x,y}	71,86 ± 16,59 ^x	72,70 ± 19,76 ^y
1 - 42. dan	40,33 ± 10,82 ^{x,y}	58,84 ± 5,93 ^{a,x}	57,04 ± 6,50 ^{a,y}

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ a,b,c... $p < 0,05$ A,B,C... $p < 0,01$ x,y,z... $p < 0,001$

Ukupna konzumacija hrane prikazana je u tabeli 11. Najmanja konzumacija hrane, u svim fazama ogleada, kao i posmatrano za ogled u celosti, bila je u kontrolnoj grupi (K). Ogleadne grupe hranjene smešama koje su sadržale neorganski izvor fosfora, postigle su konzumaciju sa manjim

numeričkim razlikama, između sebe, tako da je ogledna grupa O - II imala najmanji utrošak hrane u svim fazama ogleda pojedinačno, kao i za ceo ogled zbirno.

Tabela 11 – Ukupna konzumacija hrane tokom ogleda, (n=100),[g]

Period ogleda	Grupa		
	K	O - I	O - II
1 - 7. dan	160,00	136,00	154,40
7 - 21. dan	800,00	1059,20	1040,80
21 - 35. dan	1637,78	1961,60	1927,86
1 - 42. dan	3339,20	4408,30	4358,80

Prosečna dnevna konzumacija hrane, prikazana u tabeli 12, pratila je rezultate zabeležene za ukupnu konzumaciju, pa je kontrolna grupa (K) postigla najmanju, a ogledna grupa O - II najveću dnevnu konzumaciju hrane, u svim merenjima.

Tabela 12 – Prosečna dnevna konzumacija hrane tokom ogleda, (n=100),[g]

Period ogleda	Grupa		
	K	O - I	O - II
1 - 7. dan	22,86	19,43	22,06
7 - 21. dan	57,14	75,66	74,34
21 - 35. dan	116,98	140,11	137,70
1 - 42. dan	79,50	104,96	103,78

Konverzija hrane tokom ogleda prikazana je u tabeli 13. Najnižu konverziju hrane postigla je grupa O - I, a najvišu kontrolna grupa (K), posmatrano za ceo ogled zbirno, kao i za svaku fazu ogleda pojedinačno.

Tabela 13 – Konverzija hrane tokom ogleđa, (n=100), [kg]

Period ogleđa	Grupa		
	K	O - I	O - II
1 - 7. dan	1,61	1,28	1,33
7 - 21. dan	2,23	1,58	1,51
21 - 35. dan	2,52	1,95	1,90
1 - 42. dan	1,97	1,78	1,82

5.3. Iskoristivost mineralnih materija

Ispitivanjem sadržaja kalcijuma i fosfora u hrani, u dva uzrasna perioda (I period - 11 - 15. dana i II period - 25 - 29. dana), uočen je veći unos oba elementa u obe ogledne grupe (O - I i O - II) u odnosu na kontrolnu grupu (K) ($p < 0,001$) (tabele 14 i 15, prilozi 4 i 5). Najveći dnevni unos P i Ca hranom postigla je ogledna grupa brojlera O - I ($598 \pm 45,86$ mg/dan fosfora i $855 \pm 61,10$ mg/dan kalcijuma i, $906 \pm 31,75$ mg/dan fosfora i $1181 \pm 175,58$ mg/dan kalcijuma, za I i II period istim redom).

Tabela 14 - Dnevni unos fosfora i kalcijuma hranom u I posmatranom uzrasnom periodu^s, [mg/dan]

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	$246,00 \pm 41,89^{x,y}$	$598,00 \pm 45,86^x$	$595,00 \pm 91,64^y$
Ca	$399,00 \pm 100,64^{x,y}$	$855,00 \pm 61,10^x$	$818,00 \pm 77,44^y$

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$

$x,y,z...p < 0,001$

^sI period 11 - 16. dan

Tabela 15 - Dnevni unos fosfora i kalcijuma hranom u II posmatranom uzrasnom periodu[§], [mg/dan]

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	497,00 ± 37,08 ^{x,y}	939,00 ± 27,04 ^y	906,00 ± 31,75 ^x
Ca	868,00 ± 35,49 ^{a,x}	1471,00 ± 267,29 ^{x,b}	1181,00 ± 175,58 ^{a,b}

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$ $a,b,c...p < 0,05$ $x,y,z...p < 0,001$

[§]II period 25 - 30. dan

Količina dnevno izlučenog fosfora i kalcijuma fecesom prikazana je u tabelama 16 i 17, kao i priložima 6 i 7. Sa stanovišta statističke analize, kontrolna grupa brojlera imala je najmanju količinu P i Ca u fecesu, statistički značajno manju od ostale dve ogledne grupe ($p < 0,001$ za P u oba ogledna perioda, $p < 0,001$ za Ca u I periodu, dok je u II periodu $p < 0,05$ u odnosu na O - I i $p < 0,01$ u odnosu na O - II).

Tabela 16 - Količina dnevno izlučenog fosfora i kalcijuma fecesom, I posmatrani uzrasni period[§], [mg/dan]

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	53,20 ± 15,88 ^{x,y}	186,30 ± 50,72 ^x	205,20 ± 30,23 ^y
Ca	118,20 ± 43,32 ^{x,y}	304,10 ± 75,78 ^y	290,80 ± 63,07 ^x

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ $x,y,z...p < 0,001$

[§]I period 11 - 16. dan

Tabela 17 – Količina dnevno izlučenog fosfora i kalcijuma fecesom, II posmatrani uzrasni period^s, [mg/dan]

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	99,60 ± 34,51 ^{x,y}	283,00 ± 90,79 ^x	298,00 ± 79,87 ^y
Ca	209,74 ± 72,26 ^{A,a}	442,50 ± 175,27 ^a	463,00 ± 143,08 ^A

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$ $a,b,c...p < 0,05$ $A,B,C... p < 0,01$ $x,y,z...p < 0,001$

^sII period 25 – 30. dan

Ispitivanjem količine dnevno apsorbovanog kalcijuma i fosfora, utvrđene su statistički značajne razlike između kontrolne i ostale dve ogledne grupe, u oba perioda ($p < 0,001$), dok su između ove dve ogledne grupe postojale numeričke, ne i statistički značajne razlike (tabele 18 i 19, prilozi 8 i 9).

Tabela 18 – Količina dnevno apsorbovanog fosfora i kalcijuma, I posmatrani uzrasni period^s, [mg/dan]

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	192,80 ± 16,08 ^{x,y}	411,70 ± 50,72 ^x	389,80 ± 30,23 ^y
Ca	280,80 ± 43,32 ^{x,y}	550,90 ± 75,78 ^x	527,20 ± 63,07 ^y

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$ $x,y,z...p < 0,001$

^sI period 11 – 16. dan

Tabela 19 – Količina dnevno apsorbovanog fosfora i kalcijuma, II posmatrani uzrasni period^s, [mg/dan]

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	395,60 ± 32,76 ^{x,y}	656,00 ± 90,79 ^y	608,00 ± 79,87 ^x
Ca	658,30 ± 72,26 ^x	1028,50 ± 175,27 ^{x,y}	718,00 ± 143,08 ^y

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$ $x,y,z...p < 0,001$

^sII period 25 – 30. dan

Procentualno izražena iskoristivost suve materije obroka nije značajno varirala među oglednim grupama za oba posmatrana uzrasna perioda (tabele 20 i 21), što ukazuje na ujednačen stepen svarljivosti kompletne smeše kod piladi svih oglednih grupa. Utvrđene razlike u prividnoj svarljivosti fosfora i kalcijuma između prve i druge ogledne grupa (O - I i O - II) međusobno, sa stanovišta statističke analize nisu bile statistički značajne. U poređenju ove dve ogledne grupe sa kontrolnom grupom (K) ustanovljene se statistički značajne do vrlo značajne razlike ($p < 0,05$ i $p < 0,01$) (tabele 20 i 21, prilozi 10 i 11). Za sva tri posmatrana tretmana sveukupno, utvrđene su značajnosti i na linearnom i kvadratnom nivou, kako za prvi ($p = 0.001$ - linearni, $p = 0.005$ - kvadratni), tako i za drugi ogledni period ($p = 0.014$ - linearni, $p = 0.026$ - kvadratni kontrast).

Tabela 20 – Prividna svarljivost suve materije obroka, fosfora i kalcijuma, I posmatrani uzrasni period[§], [%]

Element	Grupa			P vrednost (kontrast)	
	K	O - I	O - II	linearni	kvadratni
SM	74,82 ± 5,68	72,95 ± 4,67	70,46 ± 4,52	0,410	0,088
P	78,37 ± 6,45 ^{a,x}	68,85 ± 8,48 ^a	65,51 ± 5,08 ^x	0,001	0,005
Ca	70,37 ± 10,86	64,43 ± 8,86	64,45 ± 7,71	0,162	0,416

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$

a,b,c...p<0,05 x,y,z...p<0,001

[§]I period 11 – 16. dan

Tabela 21 – Prividna svarljivost suve materije obroka, fosfora i kalcijuma, II
posmatrani uzrasni period[§], [%]

Element	Grupa			P vrednost (kontrast)	
	K	O - I	O - II	linearni	kvadratni
SM	78,78 ± 4,84	81,34 ± 3,79	77,03 ± 4,47	0,203	0,085
P	79,96 ± 6,94 ^{a,A}	69,86 ± 9,67 ^a	67,11 ± 8,82 ^A	0,014	0,026
Ca	75,84 ± 8,32 ^a	69,92 ± 11,91	60,79 ± 12,11 ^a	0,236	0,080

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$

$a,b,c...p < 0,05$ $A,B,C... p < 0,01$

[§]II period 25 – 30. dan

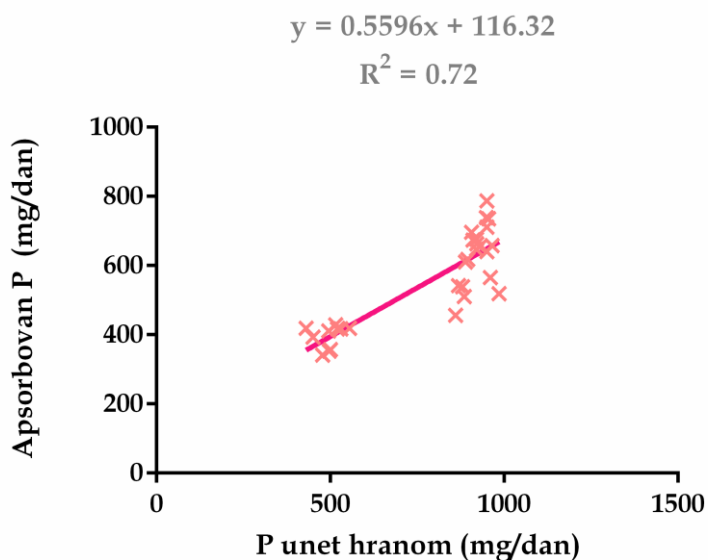
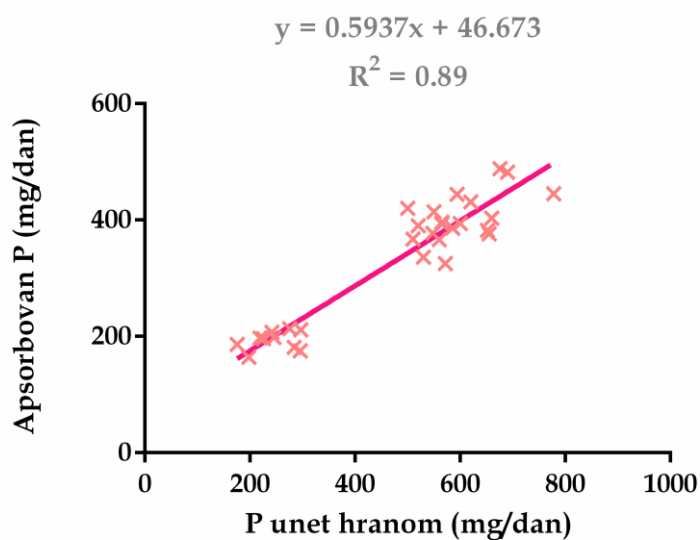
Prava svarljivost fosfora izračunata je regresijom dnevne količine apsorbovanog fosfora iz hrane u odnosu na dnevni unos fosfora hranom za oba ogledna perioda (tabela 22, grafikon 1). Dobijene su jednačine linearne regresije $y=0,5937x+46,673$ i $y= 0,5596x+116,32$, iz kojih je procenjena vrednost prave svarljivosti fosfora 59,37% i 55,96% za I i II period, redom. Procenjeni endogeni gubici iznose 46,673 mg P dnevno za pilad I uzrasta i 116,32 mg P dnevno za pilad II uzrasta.

Tabela 22 – Prava svarljivost fosfora, I i II period[§], (n = 30)

	Eksperimentalni period	
	I period	II period
Regresiona jednačina	$y=0,5937x+46,673$	$y= 0,5596x+116,32$
SE ugla regresione linije	0,039	0,065
SE odsečka regresione linije	20,025	52,8
R ²	0,89	0,72
Endogeni gubici fosfora(mg/ dan)	46,673	116,32
Prava svarljivost fosfora (%)	59,37	55,96

[§]I period 11 – 16. dan

[§]II period 25 – 30. dan



Grafikon 1 – Prava svarljivost fosfora za I ogledni period (gore) i II ogledni period (dole)

Dodatno, u ispitivanju prave svarljivosti fosfora iz potpune smeše, računskom korekcijom odnosa dnevnog unosa fosfora i izlučenog fosfora fecesom, na endogene gubitke fosfora, dobijene razlike među grupama nisu bile statistički značajne (tabela 23).

Tabela 23 – Prava svarljivost fosfora, I i II posmatrani uzrasni period, (n=30), [%]

Posmatrani period	Grupa		
	K	O - I	O - II
I period	57,86 ± 12,13	60,68 ± 9,66	56,48 ± 9,52
II period	56,22 ± 8,28	57,39 ± 10,01	54,03 ± 10,11

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

§I period 11 – 16. dan

§II period 25 – 30. dan

5.4. Koncentracija Ca i P i aktivnost ALP u krvnom serumu

Rezultati ispitivanja koncentracije kalcijuma i fosfora, kao i aktivnosti alkalne fosfataze prikazani su u tabeli 24 i prilogu 12. Zabeležene razlike u koncentraciji fosfora i kalcijuma su sa stanovišta statističke analize bile značajne ($p < 0,05$) do vrlo značajne ($p < 0,001$) između obe ogledne grupe (O - I i O - II) sa jedne strane i kontrolne grupe (K) sa druge strane. Međutim, zabeležene razlike u aktivnosti alkalne fosfataze u krvnom serumu, nisu bile statistički značajne.

Tabela 24 – Koncentracija kalcijuma i fosfora, [mg/l] i, aktivnost alkalne fosfataze [IU/l] u krvnom serumu, (n=12)

Element	Grupa		
	K	O - I	O - II
P	75,17 ± 15,41 ^{a,A}	135,3 ± 16,82 ^a	141 ± 34,57 ^A
Ca	127,70 ± 25,05 ^{x,y}	203,05 ± 21,04 ^y	212,00 ± 14,14 ^x
ALP	7142,33 ± 2689,11	4097,67 ± 2743,86	4758,33 ± 2242,21

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

a,b,c... $p < 0,05$ A,B,C... $p < 0,01$ x,y,z... $p < 0,001$

5.5. Fizičko-hemijske karakteristike kostiju

U narednom potpoglavlju prikazani su rezultati fizičko-hemijskih analiza *tibiotarsusa* (sin. tibije, golenjače) i *tarsometarsusa* (sin. tarzusa, piska), a radi bolje preglednosti dobijeni rezultati podjeljeni su prema ispitivanim podacima.

5.5.1. Čvrstina kostiju

Ispitivanjem čvrstine kostiju, kao pokazatelja stepena mineralizacije koštanog tkiva, metodom sile loma (tabela 25, prilog 13) uočene su razlike između eksperimentalnih grupa. Čvrstina kostiju je veća srazmerno sadržaju ukupnog fosfora u hrani, tako da je najmanja sila potrebna da dovede do preloma kosti potrebna za prelom kosti kontrolne grupe (K). Statistički značajno veća sila neophodna je za prelom tibije brojlera preostale dve ogledne grupe ($p < 0,05$), dok je za tarzus sila loma veća, ne i statistički značajno, za oglednu grupu O - II, dok je za oglednu grupu O - I sila loma veća na nivou značajnosti od 95%, u odnosu na kontrolnu (K) grupu brojlera.

Tabela 25 – Sila loma kostiju, (n=12), [kg]

Grupa	Sila loma	
	tibija	tarzus
K	36,31 ± 5,84 ^{a,b}	15,34 ± 3,09 ^a
O - I	47,50 ± 8,42 ^a	21,26 ± 4,17 ^a
O - II	46,06 ± 8,03 ^b	18,34 ± 3,32

*Vrednost izražena kao $X \pm Sd$

a,b,c...p<0,05

5.5.2. Morfometrijske analize kostiju

Morfometrijskim analizama tibije zapažene su numeričke razlike među oglednim grupama, koje sa stanovišta statističke analize nisu bile statistički značajne. Najveću površinu korteksa golenjače imala je ogledna grupa brojlera O - I ($35,56 \pm 10,13 \text{ mm}^2$) (tabela 26, prilog 14).

Tabela 26 – Površine poprečnog preseka dijafize tibije, (n=12), [mm²]

Grupa	Ukupna površina poprečnog preseka dijafize	Površina preseka medularne šupljine	Površina preseka korteksa dijafize
K	$48,76 \pm 14,88$	$16,42 \pm 6,35$	$32,35 \pm 15,72$
O - I	$54,58 \pm 10,14$	$19,02 \pm 4,97$	$35,56 \pm 10,13$
O - II	$52,55 \pm 10,30$	$19,59 \pm 4,75$	$32,96 \pm 7,34$

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

Merenjem mase sirovih kostiju (tabela 27, prilog 15), zabeležena je signifikantno manja masa tibije kontrolne grupe brojlera u poređenju sa oglednom grupom O - II ($p < 0,005$). Takođe, kontrolna grupa brojlera (K) imala je statistički značajno manju masu tarzusa u odnosu na O - I oglednu grupu.

Tabela 27 – Masa sirovih kostiju, (n=12), [g]

Grupa	Masa sirovih kostiju	
	tibija	tarzus
K	$6,848 \pm 1,186^a$	$3,482 \pm 1,301^a$
O - I	$9,003 \pm 1,659$	$5,087 \pm 0,749^a$
O - II	$9,316 \pm 1,758^a$	$4,513 \pm 1,085$

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

$a,b,c...p < 0,05$

5.5.3. Radiološka analiza kostiju

5.5.3.1. Rentgenografska ispitivanja kostiju

U tekstu su prikazani rezultati rentgenološkog ispitivanja strukture prvog reda kostiju (kortikalis, kompakta i spongioza). Analizom makrostrukture I reda, odnosno stepena i intenziteta impregnacije mineralnim materijama koje se deponuju u tibiji i tarzusu uspostavljeni su radiološki kriterijumi.

Rentgenogrami tibije imaju sve karakteristike cevastih kostiju, a elementi koštane strukture prvog reda su jasno izdiferencirani i mogu se analizirati u svim delovima kostiju.

Na postranom snimku tibije i tarzusa kontrolne (K) grupe brojlera, nativnom rentgenografijom zapaža se reljefno izražena slika spongioze, sitnozrnaste strukture kroz koju se naziru kosa rasvetljenja poreklom od Haverzovih kanala. Homogenost ove strukture, koju čini konstrukcija od sitnih kanala i šupljih cevi, osnovni i međuprostorni sistem lamela, je ujednačena kod svih eksperimentalnih jedinki. Dužine dijafiza tibije su $55,83 \pm 4,916$ mm, a širine kompakte iznose $1,83 \pm 0,258$ mm (tabela 28).

U predelu distalnih metafiza vidljivi su znaci pneumatizacije. Krečna senka kompakte je lamelarnog izgleda, kontrastno istaknuta i ujednačenog promera. Senka kortikalisa na epifizama tibije je diskretno konturisana.

Senke tibije i tarzusa ogledne grupe O - I pokazuju sve karakteristike formiranog skeleta tako da u rentgenskoj slici daju kontinuiranu senku u kojoj se u predelu dijafiza i metafiza postrano ističe tangencijalno zahvaćena kompakta. Najintenzivnija osifikacija je lokalizovana u predelu dijafiza gde je kompakta najšira i po intenzitetu se približava senci kortikalisa, dok su metafize i epifize pretežno spongiozne strukture. Spongioza je homogena i zbog pneumatizacije ima sitno mrežastu strukturu koja je homogenija i

kondenzovanija u odnosu na kontrolnu grupu. Nutritivni kanali su formirani i slabo su vidljivi.

Krećna slika kompakte je lamelarna, jasno konturirana i blago vunasta pri krajevima dijafiza. Preko zglobnih površina epifiza jasno je izražena senka kortikalisa. Dužine dijafiza tibije su $68,0 \pm 2,473$ mm, a širine krećne senke kompakte iznose $2,333 \pm 0,408$ mm (tabela 28).

Radiološka analiza kostne strukture kod ogledne grupe O - II sa aspekta stepena osifikacije tibije ne daje vidljivije razlike u odnosu na O - I oglednu grupu. Senka spongioze po intenzitetu, homogenosti i arhitekturi odgovara njenom izgledu u grupi O - I. Dužine dijafiza krurisa iznose $66,12 \pm 4,335$ mm, a širine kompakte su $2,25 \pm 0,418$ mm (tabela 28). Međutim, krećna senka kompakte kod ovih jedinki je diskretnija, tanja i sa slabije izraženim kontrastom. Medularni kanal je proširen, a Haverzovi kanali su jasno vidljivi kao rasvetljene zone koje se pružaju od površine kosti prema središtu spongioze. Senka kortikalisa je slabo definisana.

Dužina dijafize statistički je značajno veća kod ogledne grupe O - I ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu (K) za obe ispitivane kosti. Izmerene razlike dužine dijafize tibije i tarzusa O - II grupe i K grupe brojlera bile su statistički značajne ($p < 0,01$, $p < 0,001$, redom). Širine kompakte tibije nisu bile statistički značajno različite, dok je na nivou tarzusa postojala značajna razlika između K i O - I grupe ($p < 0,01$) (tabela 28, prilog 16, prilog 17).

Tabela 28 - Dužina dijafize i širina kompakte tibije i tarzusa, ($n=12$), [mm]

Grupa	Tibija		Tarsus	
	Dužina dijafize	Širina kompakte	Dužina dijafize	Širina kompakte
K	$55,83 \pm 4,92^{x,A}$	$1,833 \pm 0,258$	$43,67 \pm 2,80^{x,y}$	$1,667 \pm 0,408^A$
O - I	$68,00 \pm 2,47^x$	$2,333 \pm 0,408$	$55,83 \pm 3,49^x$	$2,583 \pm 0,492^A$
O - II	$66,12 \pm 4,33^A$	$2,250 \pm 0,418$	$53,17 \pm 1,94^y$	$2,250 \pm 0,418$

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

A,B,C... $p < 0,01$ x,y,z... $p < 0,001$

5.5.3.2. Ispitivanje gustine kostiju

Kompjuterizovanom tomografijom je omogućeno kvantitativno merenje gustine kosti u odabranim područjima. Broj kompjuterizovanih tomograma predstavlja aritmetičku sredinu svih izmerenih atenuiranih vrednosti u volumenu pojedinačnog elementa. Prikaz sive skale skeniranog objekta na slici pokazuje podatke o relativnoj gustini strukture (rentgenska gustina).

Na prikazanim transverzalnim nativnim presecima tibije i tarzusa, svih oglednih grupa, debljine sloja 5 mm, zabeležene su vrednosti atenuacije (denzitet) kompakte u nivou proksimalne epifize gde se nalazi preparatorična zona rasta, ½ dužine dijafize, kao i distalne epifize. Gustina CT skenova direktno je proporcionalna (linearna proporcija) koeficijentu atenuacije.

Gustina koštanog tkiva, u sva tri preseka tibije, bila je najveća kod ogledne grupe O - I ($431,2 \pm 29,49$ HU - proksimalna epifiza, $1010 \pm 195,2$ HU - ½ dužine dijafize i $659,5 \pm 138,5$ HU - distalna epifiza). Najmanje izmerene vrednosti koštane gustine pokazale je kontrolna grupa (K) ($395,2 \pm 83,85$ HU - proksimalna epifiza, $833,4 \pm 166$ HU - ½ dužine dijafize i $589,3 \pm 71,11$ HU - distalna epifiza). Zabeležene razlike su pokazale statističku značajnost na nivou od 95% u preseku na ½ dužine dijafize i, to između oglednih grupa O - I i O - II, kao i ogledne grupe O - I i kontrolne (K) grupe ($p < 0,05$) (tabela 29, prilog 18).

Tabela 29 - Gustina koštanog tkiva tibije, (n=12), [HU]

Gustina koštanog tkiva	Grupa		
	K	O - I	O - II
Proksimalna epifiza	$395,20 \pm 83,85$	$431,20 \pm 29,49$	$423,90 \pm 55,50$
½ dužine dijafize	$833,40 \pm 166,00^a$	$1019,00 \pm 180,90^{a,b}$	$864,40 \pm 81,31^b$
Distalna epifiza	$589,30 \pm 71,11$	$659,50 \pm 138,5$	$622,90 \pm 106,1$

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

a,b,c... $p < 0,05$

Koštana gustina na nivou tarzusa se statistički značajno razlikovala između kontrolne grupe (K) i ogledne grupe I (O - I) i, to u proksimalnoj epifizi ($p < 0,01$), na $\frac{1}{2}$ dužine dijafize ($p < 0,05$) i u distalnoj epifizi ($p < 0,05$). U poređenju sa drugom oglednom grupom (O - II), kontrolna grupa piladi (K) imala je statistički značajno niže vrednosti gustine koštanog tkiva ($p < 0,05$) na nivou proksimalne epifize. Sveukupno, na sva tri preseka tarzusa izmerena je najveća gustina koštanog tkiva kod piladi ogledne grupe O - I (tabela 30, prilog 19).

Tabela 30 – Gustina koštanog tkiva tarzusa, ($n=12$), [HU]

Gustina koštanog tkiva	Grupa		
	K	O - I	O - II
Proksimalna epifiza	300,00 ± 33,94 ^{A,a}	397,00 ± 56,09 ^A	376,70 ± 48,54 ^a
$\frac{1}{2}$ dužine dijafize	474,00 ± 81,01 ^a	662,50 ± 149,5 ^a	533,00 ± 52,20
Distalna epifiza	412,40 ± 35,60 ^a	480,30 ± 16,03 ^a	468,20 ± 66,66

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ $a,b,c...p<0,05$ $A,B,C... p<0,01$

Izmerne dužine kostiju su za obe ispitivane kosti (tabela 31, prilog 20) bile manje za kontrolnu grupu (K) brojlera, u odnosu na preostale dve ogledne grupe (O - I i O - II) i, to tako da je tibija piladi grupe K bila statistički značajno kraća u poređenju sa O - I ($p < 0,001$), ali i O - II oglednom grupom ($p < 0,01$). Dužina tibija oglednih grupa O - I i O - II pokazala je samo numeričke razlike, bez statističke značajnosti. Na nivou tarzusa zabeležena je značajna razlika u dužini kosti između kontrolne grupe (K) i ogledne grupe (O - I) ($p < 0,01$), dok ostale zabeležene razlike među grupama nisu bile statistički značajne.

Tabela 31 – Dužina kostiju, (n=12), [cm]

Grupa	Dužina kostiju	
	tibija	tarzus
K	9,253 ± 0,850 ^{A,x}	6,067 ± 0,360 ^A
O – I	11,190 ± 0,661 ^x	6,990 ± 0,427 ^A
O – II	10,650 ± 0,457 ^A	6,738 ± 0,558

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ A,B,C... $p < 0,01$ x,y,z... $p < 0,001$

Ukupna površina poprečnog preseka tibije kontrolne (K) grupe brojlera bila je manja u poređenju sa preostale dve ogledne grupe i, to statistički značajno manja u odnosu na O – I ($p < 0,05$), dok je u odnosu na O – II grupu ova razlika bila samo numerička. Kontrolna grupa piladi imala je i najmanje vrednosti površine medularne šupljine, kao i površine korteksa u odnosu na ogledne grupe O – I i O – II. Utvrđene razlike nisu bile statistički značajne (tabela 32, prilog 21).

Tabela 32 – Površine poprečnog preseka tibije, (n=12), [mm²]

Grupa	Ukupna površina poprečnog preseka dijafize	Površina preseka medularne šupljine	Površina preseka korteksa dijafize
K	53,29 ± 6,59 ^a	16,37 ± 6,01	36,93 ± 9,22
O – I	62,26 ± 4,10 ^a	18,26 ± 6,25	44,00 ± 5,33
O – II	60,67 ± 5,36	21,19 ± 7,62	39,47 ± 10,30

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$ a,b,c... $p < 0,05$

Ukupna površina poprečnog preseka dijafize tarzusa, statistički je značajno varirala, na visokom nivou značajnosti ($p < 0,001$) između kontrolne grupe (K) s' jedne strane i ogledne grupe O – I, kao i K grupe i ogledne grupe O

- II s' druge strane. Ista ogledna grupa jedinki (K) imala je najmanje zabeležene površine medularne šupljine i površine korteksa dijafize, bez statističke značajnosti (tabela 33, prilog 22).

Tabela 33 - Površine poprečnog preseka tarzusa, (n=12), [mm²]

Grupa	Ukupna površina poprečnog preseka dijafize	Površina preseka medularne šupljine	Površina preseka korteksa dijafize
K	42,40 ± 3,52 ^{x,y}	18,37 ± 6,316	24,03 ± 8,20
O - I	53,51 ± 3,77 ^x	19,28 ± 10,03	34,23 ± 11,03
O - II	52,99 ± 3,46 ^y	19,43 ± 8,00	33,56 ± 5,73

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

x,y,z...p<0,001

Analogno izračunatim površinama na polovini dužine dijafize tibije i tarzusa, izračunati procenti udela kortikalne kosti u ukupnoj površini poprečnog preseka dijafize bili su najmanji za kontronu (K) grupu brojlera (69,3% tibija i 56,67% tarzus), a najveći za oglednu grupu O - I (65,06% - tibija i 63,33% - tarzus) (tabela 34).

Tabela 34 - Udeo kortikalne kosti u preseku dijafize tibije i tarzusa, (n=12), [%]

	Grupa		
	K	O - I	O - II
Tibija	69,3	70,67	65,06
Tarzus	56,67	63,96	63,33

5.5.4. Hemijska analiza kostiju

Hemijski sastav kostiju prikazan je tabelama 35, 36 i 37 i priložima 23, 24 i 25. Sadržaj pepela u kostima piladi je veći srazmerno većoj količini ukupnog fosfora u hrani. Sa stanovišta statističke analize utvrđene razlike su bile značajne za tibiju ($p < 0,05$), dok su za tarzus postojale numeričke, ne i statistički značajne razlike. Slično ovome, hemijskim analizama utvrđen sadržaj fosfora i kalcijuma, bio je veći srazmerno sadržaju ukupnog fosfora u hrani, ali ove razlike, za obe ispitivane kosti, nisu bile statistički značajne (P i Ca izraženi kao % SM).

Tabela 35 – Sadržaj pepela u kostima, ($n=12$), [%]

Grupa	Pepeo (% SM)		Pepeo (% VSM)	
	tibija	tarzus	tibija	tarzus
K	42,41 ± 1,88	39,49 ± 1,67	23,51 ± 2,36 ^{a,b}	23,80 ± 4,24
O - I	44,74 ± 2,27	40,60 ± 2,32	26,56 ± 1,94 ^a	25,29 ± 2,29
O - II	44,13 ± 2,54	40,16 ± 2,42	26,40 ± 1,26 ^b	26,68 ± 1,63

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

a,b,c...p<0,05

Tabela 36 – Sadržaj fosofora u kostima, ($n=12$), [%]

Grupa	P (% SM)		P(% VSM)	
	tibija	tarzus	tibija	tarzus
K	7,46 ± 0,44	7,06 ± 0,49	4,15 ± 0,37 ^a	4,24 ± 0,75
O - I	7,92 ± 0,27	6,87 ± 0,69	4,70 ± 0,30 ^a	4,54 ± 0,40
O - II	7,59 ± 0,49	6,82 ± 0,43	4,54 ± 0,28	4,26 ± 0,32

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

a,b,c...p<0,05

Tabela 37 – Sadržaj kalcijuma u kostima, (n=12), [%]

Grupa	Ca (% SM)		Ca (% VSM)	
	tibija	tarzus	tibija	tarzus
K	14,59 ± 0,80	13,66 ± 0,66	8,22 ± 0,71 ^a	8,24 ± 1,53
O – I	15,18 ± 0,65	13,84 ± 0,86	9,02 ± 0,64	8,62 ± 0,81
O – II	15,17 ± 0,68	14,05 ± 0,87	9,08 ± 0,36 ^a	9,33 ± 0,66

*Vrednost izražena kao $\bar{X} \pm Sd$

a,b,c...p<0,05

5.6. Međusobna zavisnost iskoristivosti fosfora, proizvodnih rezultata i parametara ispitivanja na kostima

Uticaj količine ukupnog fosfora u hrani na količinu apsorbovanog fosfora, količinu apsorbovanog kalcijuma i prividnu svarljivost P i Ca, u oba ogledna perioda prikazan je u tabeli 38. Sa povećanjem koncentracije ukupnog fosfora u hrani, povećava se količina apsorbovanog fosfora sa visokim koeficijentom korelacije (0,9404^{****} - I period, 0,8470^{****} - II period), kao i količina apsorbovanog kalcijuma (0,8957^{****} - I period, 0,5093^{**} - II period). Količina fosfora u hrani je u negativnoj korelaciji sa procentom prividne svarljivosti fosfora (-0,6277^{***} - I period, -0,5465^{**} - II period), ali i procentom prividne svarljivosti kalcijuma (-0,3041 - I period, -0,3978* - II period).

Tabela 38 – Pearson –ov koeficijent korelacije između količine ukupnog fosfora u hrani i količine apsorbiranog fosfora i kalcijuma, tj. svarljivosti fosfora i kalcijuma, u oba posmatrana uzrasna perioda

	Parametri	Količina P u hrani
I period	Količina apsorbiranog P	0,9404 **** (0,8774-0,9715)
	% prividne svarljivosti P	-0,6277***
	Količina apsorbiranog Ca	0,8957****
	% prividne svarljivosti Ca	-0,3041
II period	Količina apsorbiranog P	0,8470**** (0,7005- 0,9250)
	% prividne svarljivosti P	-0,5465**
	Količina apsorbiranog Ca	0,5093**
	% prividne svarljivosti Ca	-0,3978*

Vrednosti obeležene superskriptom..... * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$)

Zavisnost između količine apsorbiranog fosfora i stepena iskoristivosti fosfora i, proizvodnih rezultata piladi u ogledu, prikazana je *Pearson*-ovim koeficijentom korelacije (tabela 39). Povećanje količine apsorbiranog fosfora praćeno je povećanjem telesne mase u obe perioda, sa visokim stepenima korelacije (0,7754**** - I period, 0,6296**** - II period), povećanjem prirasta (0,7723**** - I period, 0,4177**** - II period) i konzumacije hrane (0,9463**** - I period, 0,7385 - II period). U odnosu na konverziju zabeležena je negativna korelaciona veza (-0,5774**** - I period, -0,2509**** - II period). Postignuta telesna masa i ukupni prirast su direktno zavisni od konzumacije hrane sa visokim koeficijentom korelacije (0,8270**** i 0,8222**** - telesna masa i prirast, analogno, I period i 0,5563**** i 0,3815**** - telesna masa i prirast, II period). Između konverzije i ostalih ispitivanih parametara zapažen je negativan korelacioni odnos (telesna masa i konverzija -0,8761**** i -0,6154****, I i II period, istim redom;

prirast i konverzija $-0,8816^{****}$ i $-0,1956^{****}$, I i II period, redom; utrošak hrane i konverzija $-0,6231^{****}$ i $-0,2341^{****}$, I i II period).

Zavisnost između sadržaja ukupnog fosfora u hrani i ispitivanih parametara na kostima i u krvnom serumu izražena je *Pearson*-ovim koeficijentom korelacije (tabela 40). Zapažen je pozitivan korelacioni odnos između fosfora u hrani i: fizičkih osobina kosti (sila loma $0,5834^*$, gusitna kostiju $0,1803$), hemijskog sastava kosti (r vrednosti : % pepela tibija $0,4341$, % P tarsus $0,3911$, % Ca tibija $0,3819$), koncentracije fosfora ($0,7700^{****}$) i koncentracija kalcijuma ($0,8515^{****}$). Između prisutnog fosfora u obroku i aktivnosti alkalne fosfataze zabeležena je negativna korelacija ($-0,4937^*$).

Ispitivani parametri na kostima međusobno su povezani, pa je tako uočena jaka pozitivna korelaciona veza između sadržaja pepela, P i Ca u kostima (izraženih kao procenat suve materije) za obe ispitivane kosti (tibija: P $0,5945^{**}$, Ca $0,9557^{****}$; tarsus: P $0,4619$, Ca $0,9368^{****}$). Takođe, ispitivani parametri krvnog seruma pokazuju međusobnu povezanost, pa su koncentracije fosfora i kalcijuma u serumu pozitivno korelirane ($0,8679^{****}$), dok ova dva parametra u odnosu na aktivnost alkalne fosfataze pokazuju negativan korelacioni odnos (P $-0,4784^*$, Ca $-0,5535^*$). Koncentracija fosfora i kalcijuma u krvnom serumu u međusobnoj je vezi sa hemijskim sastavom ispitivanih kostiju, što je izraženo *Pearson*-ovim koeficijentima (tibija: pepeo $0,4263$, P $0,5036^*$, Ca $0,4047$; tarsus: pepeo $0,1862$, P $-0,1495$, Ca $0,1643$).

Tabela 39 - Pearson-ov koeficijent korelacije između količine apsorbiranog fosfora i proizvodnih rezultata

	Parametri	I period					II period				
		P apsorbovan	Telesna masa	Prirast	Konзумacija hrane	Konverzija	P apsorbovan	Telesna masa	Prirast	Konзумacija hrane	Konverzija
I period	P apsorbovan	1	0,7754****	0,7723****	0,9463****	-0,5774****					
	Telesna masa		1	0,9959****	0,8270****	-0,8761****					
	Prirast			1	0,8222****	-0,8816****					
	Konзумacija hrane				1	-0,6231****					
	Konverzija					1					
II period	P apsorbovan						1	0,6296****	0,4177****	0,7385****	-0,2509****
	Telesna masa							1	0,4008****	0,5563****	-0,6154****
	Prirast								1	0,3815****	-0,1956****
	Konзумacija hrane									1	-0,2341****
	Konverzija										1

Tabela 40 – Pearson-ov koeficijent korelacije između količine fosfora u hrani i parametara na kostima i u krvnom serumu

Parametri	P u hrani	Sila loma	Gustina kostiju	Pepeo tibija	P tibija	Ca tibija	Pepeo tarzus	P tarzus	Ca tarzus	P serum	Ca serum	ALP serum
P u hrani	1	0,5834*	0,1803	0,4341	0,3911	0,3819	0,2218	-0,1791	0,1492	0,7700***	0,8515****	-0,4937*
Sila loma		1	0,1358	0,4595	0,04630	0,3527	0,3539	0,08361	0,2591	0,2822	0,4365	-0,07847
Gustina kostiju			1	0,2563	0,1882	0,2856	0,2819	0,1113	0,3040	0,4999*	0,4870*	-0,7632
Pepeo tibija				1	0,5945**	0,9557****	0,4519	0,0285	0,3619	0,4263	0,5737*	-0,1631
P tibija					1	0,5237*	0,4173	0,3434	0,3860	0,5036*	0,4887	-0,3584
Ca tibija						1	0,2759	0,0113	0,2308	0,4047	0,5918**	-0,2352
Pepeo tarzus							1	0,4619	0,9368****	0,1862	0,2592	-0,1353
P tarzus								1	0,5305*	-0,1495	-0,0055	-0,1742
Ca tarzus									1	0,1643	0,2637	-0,2458
P serum										1	0,8679****	-0,4784*
Ca serum											1	-0,5535*
ALP serum												1

6. DISKUSIJA

Diskusija je podeljena u potpoglavlja radi bolje preglednosti, a prema postavljenom cilju i zadacima ogleđa. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita stepen biološke iskoristivosti ukupnog fosfora iz hrane na osnovu proizvodnih rezultata, prividne i prave svarljivosti fosfora i kalcijuma iz kompletne smeše, sadržaja fosfora i kalcijuma u krvi i stepena mineralizacije koštanog tkiva. Takođe, istraživanje je imalo za cilj da se utvrdi u kom odnosu ispitivani parametri stoje međusobno, kao i prema sadržaju fosfora u hrani (ukupnog, fitinskog i nefitinskog). Stoga, u ovom ogleđu urađena je evaluacija različitih mineralnih izvora fosfora, a dobijeni rezultati su upoređeni sa literaturnim podacima.

6.1. Hemijski sastav smeša

Ishrana piladi u ogleđu vršena je smešama standardnog sirovinskog sastava, po recepturama uobičajenim za intenzivni odgoj brojlera. Hemijskim analizama hrane utvrđeno je da su ogleđne smeše ispunjavale zahteve tehnoloških normativa i zakonskih propisa (Cobb 500 guide, Pravilnik „Sl. Gl. RS“ 4/2010), kao i preporuke o potrebama za pilad određene proizvodne kategorije i faze odgoja (NRC, 1994). Kako su smeše korigovane samo u odnosu na sadržaj mineralnih hraniva, utvrđene koncentracije fosfora i kalcijuma su se razlikovale po grupama, tako da je kontrolna grupa hranjena hranom sa 0,43% fosfora u hrani za prvu i drugu potpunu smešu i 0,35% za treću potpunu smešu za ishranu piladi. Koncentracije kalcijuma su 0,70%, 0,75% i 0,69% u istim smešama za ovu grupu piladi. Sadržaj fosfora u ogleđnim grupama je, uključivanjem monokalcijum fosfata, podešen tako da je u ogleđnim grupama bio na nivou od 0,80%, 0,66% i 0,60% za prvu, drugu i treću kompletnu smešu, dok su se koncentracije kalcijuma kretale oko 1,10%, 0,90% i 0,80% za starter, grover i finišer, istim redom. Takođe, koncentracija vitamina D3 je na nivou od 4.950 IU po kg hrane za sve tri smeše.

U formulisanju obroka posebna pažnja posvećena je potencijalnom sadržaju proteina, te je odabir hraniva izvršen tako da je sadržaj sirovih proteina u smešama

na nivou od oko 19%, što je u skladu sa preporukama grupe autora istaknutim u protokolu za ispitivanje iskoristivosti fosfora, po kome nivo proteina treba da bude ispod 22% (WPSA, 2013). Proteinski sastav hrane treba da bude takav da se postigne optimalan aminokiselinski sastav, a da se izbegne dodavanje proteina u višku. Proteini hrane se vezuju sa fitatima u gastričnoj fazi varenja, čime se umanjuje njihova rastvorljivost i podložnost digestiji. Uz to fitinska kislina deluje negativno na resorpciju proteina i vezivanjem za proteaze umanjujući njihovu aktivnost (Woyengo i Nyachot, 2013; Cowieson i sar., 2016). Dokazano je da fitinska kislina u obroku umanjuje pravu svarljivost amino kiselina za najmanje 8% (Cowieson i sar. 2006). U cilju izbegavanja ovih unakrsnih reakcija proteina i fitata, koji mogu uticati na rezultate iskoristivosti pojedinačnih elemenata, neophodna je adekvatna formulacija proteinskog dela obroka.

Ogledne smeše nisu sadržale aditive bilo kog tipa (enzime, organske kiseline, fitobiotike, mikroorganizme, esencijalna ulja...), što je takođe u skladu sa pomenutim protokolom (WPSA, 2013).

Međutim, nivoi fosfora u hrani ovde su viši u odnosu na preporuke autora protokola za ispitivanje iskoristivosti fosfora, prema kome je adekvatna količina ukupnog fosfora u bazalnoj smeši 0,30%, koja se uvećava za 0,15%, tako da se postigne nivo od 0,45% ukupnog fosfora u ispitujućim smešama (WPSA, 2013). Ogledne smeše sa ovakvim koncentracijama ukupnog fosfora ispitivane su od strane više autora (0,24 – 0,42% Liu i sar. (2013a), 0,21 – 0,30% Jiang i sar. (2015), 0,12 – 0,42% Mutucumarana i sar. (2015)).

S druge strane, brojni su ogleđi u kojima je raspon ispitujućih koncentracija fosfora u hrani bio znatno širi. Leske i Coon (2002) su ispitivali smeše sa dodatim monokalcijum fosfatom, kao izvorom fosfora, tako da je postignuta koncentracija ukupnog fosfora u hrani varirala od 0,323% do 1,134% po grupama, odnosno 0,111% do 0,929% nefitinskog fosfora. Coon i sar. (2007) u evaluaciji različitih mineralnih hraniva upotrebljavali su ogledne smeše sa 0,32% ukupnog fosfora, tj. 0,18% fitinskog i 0,14% nefitinskog fosfora za bazalnu hranu, dok su ove koncentracije za ogledne grupe bile: 3,2 - 10,5% ukupnog tj., 1,4 - 9,0 % nefitinskog fosfora za različite izvore neorganskog fosfora po grupama.

Shastack i sar. (2012) su ispitivali oglednu hranu u kojoj je koncentracija ukupnog fosfora nešto niža nego u ovom ogledu, a varirala je od 0,35 do 0,59% ukupnog fosfora.

Brojni su ogledi u kojima je ispitivana kompletna smeša sa sličnim nivoima koncentracije kao u ovom ogledu: (0,41 - 0,67% (Rutherford i sar., 2004) i 0,56 - 0,66% ukupnog fosfora (Hemme i sar., 2005); 0,64- 0,84% ukupnog fosfora, a 0,25 - 0,45% nefitinskog (Hamdi i sar., 2015); 0,15 - 0,75% ukupnog fosfora, tj. 0,04 - 0,45% fitinskog fosfora i 0,09 - 0,28% nefitinskog fosfora (Perryman i sar., 2016)).

Li i sar. (2015) su u svom ogledu svarljivosti takođe ispitivali slične koncentracije fosfora kao u ovom ogledu, pa je 0,45% ukupnog fosfora, odnosno 0,30% fitinskog i 0,15% nefitinskog fosfora bilo u osnovnoj smeši, koja je u oglednim grupama korigovana tako da je sadržaj ukupnog fosfora povećan na 0,44 do 0,64%, odnosno sadržaj fitinskog na 0,25% i nefitinskog fosfora na 0,19 - 0,39%.

Stanovište ovog autora je da se ispitivanjem kompletne smeše sa uobičajenim sadržajem fosfora za pilad u tovu dobijaju rezultati koji realno odražavaju stepen usvajanja fosfora u praktičnim uslovima intezivnog odgoja. Smanjivanjem ukupnog fosfora u smeši i upotrebom ogledne hrane sa niskim sadržajem fosfora - ispod potreba jedinke, pospešuje se uključivanje homeostatskih mehanizama u organizmu ogledne jedinke, sa ciljem da se u uslovima deficita održi normalna koncentracija fosfora u krvi. Na taj način se osim uključivanja fosfora iz depoa (koštanog tkiva), ovaj mineral apsorbuje u većem procentu i iz digestivnog trakta. Takođe, u uslovima uključivanja fosfora iznad potreba jedinke, sva suvišna količina fosfora iz hrane izlučuje se iz organizma. Zato dobijeni rezultati ne odražavaju realno količinu zadržanog fosfora u organizmu. Posebno ako se uzme u obzir da se iskoristivost fosfora uobičajeno izražava procentualno u odnosu na količinu njegovog unosa. Tako, ako bi se poredile količine apsorbovanog fosfora, izražene u jedinicama mase, dobili bi se značajno različiti rezultati u odnosu na procentualno izražene vrednosti iskoristivosti fosfora. Zato se podešavanjem koncentracije fosfora na uobičajene za zadovoljenje potreba jedinki, dobijaju precizniji rezultati, koji su i praktično vredniji za proizvođače.

6.2. Zdravstveno stanje

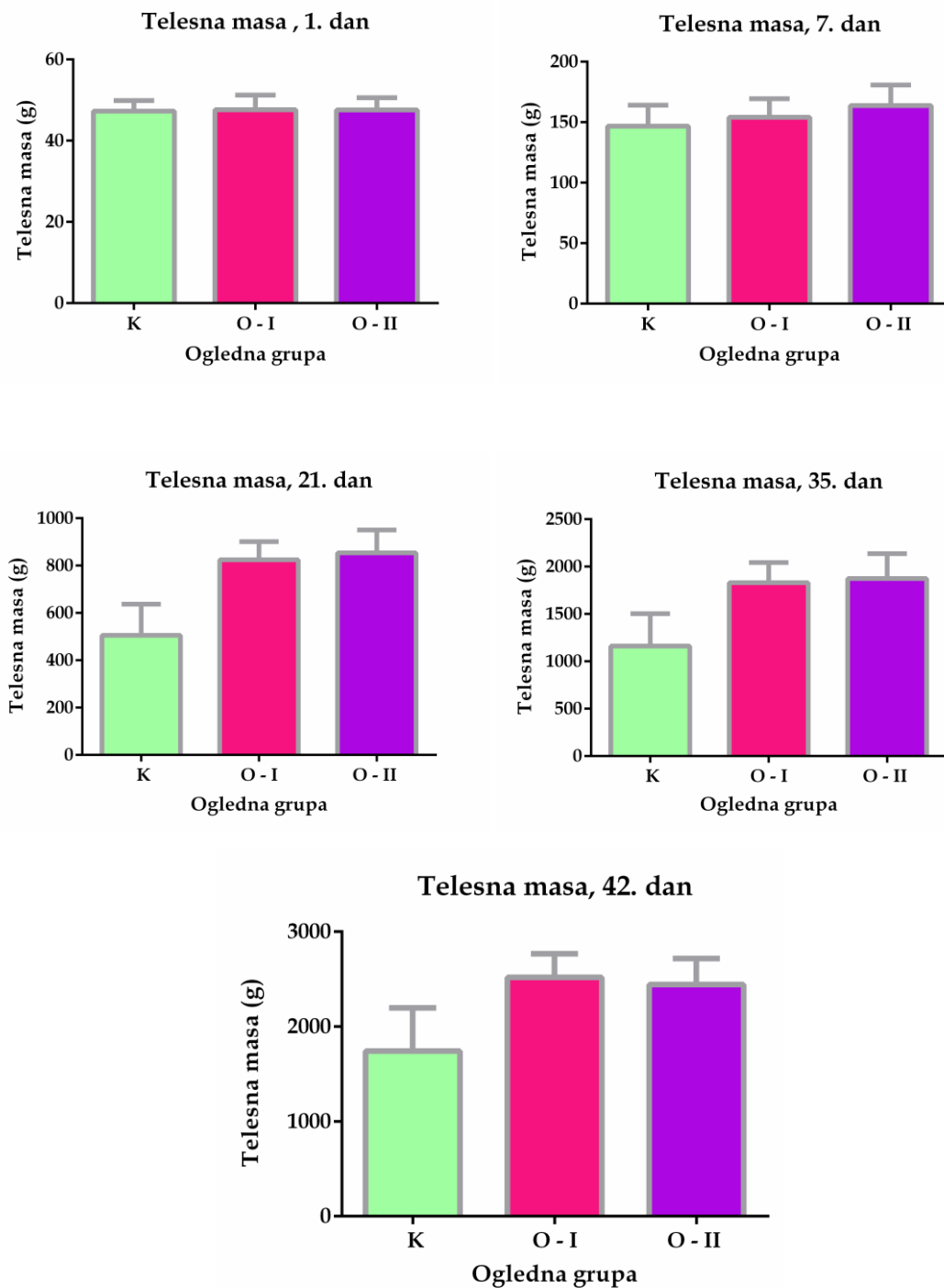
Brojleri eksperimentalnih grupa kojima je bio uključen mineralni izvor fosfora u hranu, bili su skladne telesne građe, pravilno razvijenog koštanog i mišićnog tkiva, živahnog temperamenta i dobre kondicije. Perje, koža i vidljive sluznice bile su uobičajenog izgleda, bez osobenosti. Apetit je bio dobar, a feces uobičajeno formiran. Sposobnost aktivnog kretanja i koordinacija pokreta bili su usklađeni, a mišićni tonus normalno izražen.

Pilad svih oglednih grupa nisu ispoljavala kliničke znake oboljenja. Mortalitet tokom ogleda kretao se u okvirima tehnoloških normativa, bez značajnih razlika među grupama. Zabeležen je mortalitet po grupama: kontrolna grupa (K) – tri jedinke, ogledne grupe: O – I – bez uginuća i O –II – četiri jedinke.

Brojleri kontrolne (K) grupe piladi, koja je hranjena bazalnom hranom sa niskim sadržajem fosfora, ispoljila su zaostajanje u rastu. Ipak, smanjivanje sadržaja fosfora nije se odrazilo na funkciju i izgled lokomotornog aparata, pa su ova pilad bila normalne pokretljivosti i vitalnosti. Mada su brojleri kontrolne grupe imali očuvani unos hrane tokom celog trajanja oglednog perioda, može se pretpostaviti da dugotrajni deficit fosfora, usled njegove uloge u energetsom metabolizmu pre svega, ali i u drugim metaboličkim procesima, dovodi do smanjenja intenziteta procesa biosinteze, pa posledično i smanjenog telesnog rasta.

6.3. Proizvodni rezultati

Posmatranjem kretanja telesnih masa brojlera tokom oglednog perioda uočava se da su u ogled uključene jedinke ujednačenih telesnih masa, koje su standardizovane na $47,48 \pm 3,098$ g. Dalje, u svakom od oglednih perioda zasebno, kao i posmatrano za ceo ogled zbirno zapaža se značajna razlika u telesnim masama oglednih grupa (O – I i O – II) u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$) (grafikon 2).

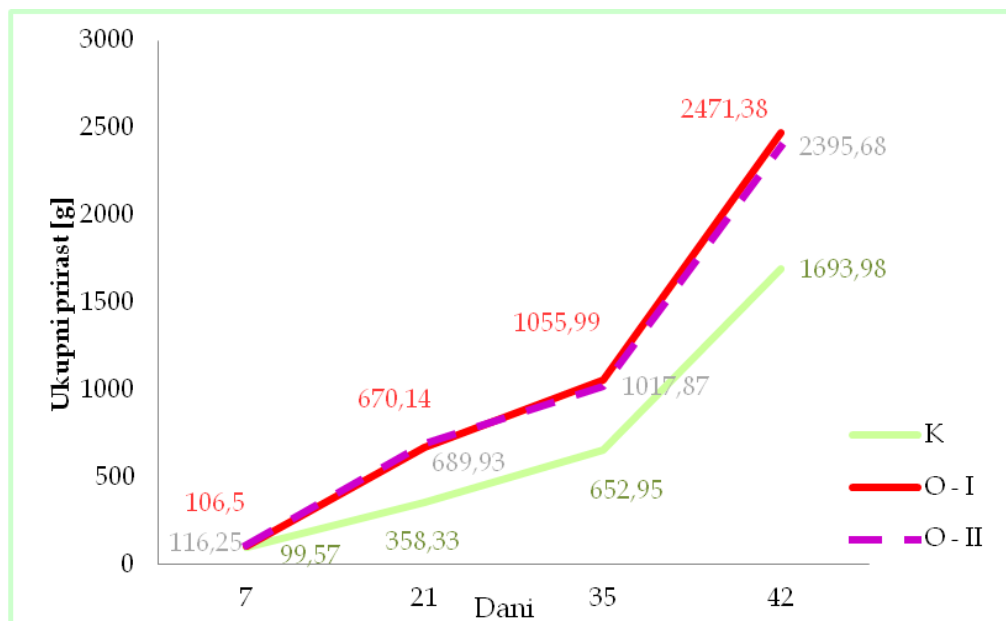


Grafikon 2 – Telesna masa piladi tokom ogleda, po merenjima, (n=100), [g]

Poznate su mnogobrojne uloge fosfora u metabolizmu, kako na nivou ćelije, tako i na nivou organizma u celini. Između ostalog fosfor je kao gradivni element jedinjenja nosioca energije (ATP-a i ADP-a) uključen u procese transfera energije. Dodatno, ovaj element uključen je u metabolizam masti, ugljenih hidrata, proteina i drugih hranljivih materija. Usled toga, nedostatak fosfora u ishrani dovodi do poremećaja homeostaze ovih procesa u organizmu, pa posledično i slabijeg prirasta i pada telesne mase kod deficitarno hranjenih jedinki. Ako se uzme u obzir da je u mišićnom tkivu živine fosfor prisutan u procentu od oko 0,17 - 0,24% SM (Serdar i Katalenić, 2005), kao i da je neophodan za sintezu mišićnih proteina, jasno je da će svaki njegov deficit u organizmu voditi ka usporenom rastu i razvoju. Kod brojlerske piladi ovo je posebno izraženo, usled intenzivnog i brzog porasta organizma.

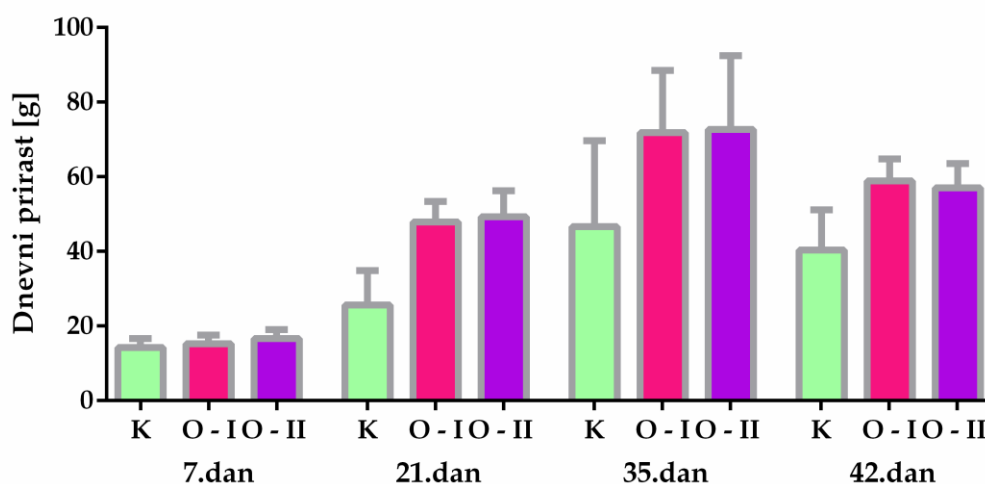
Kod kontrolne grupe piladi, kojoj je isključen neorganski izvor fosfora, zapažena je niža telesna masa sa visokim nivoom značajnosti ($p < 0,001$) u odnosu na preostale dve ogledne grupe. Dodatno, poređenjem ove dve ogledne grupe kojima nije redukovana nivo fosfora u obroku, zapažene su razlike u telesnim masama, koje su na završetku ogleda bile statistički značajne ($p < 0,05$) (grafikon 2). Ovaj podatak govori u prilog intenzivnijem iskorišćavanju fosfora iz monokalcijum fosfata korišćenom u oglednoj grupi I (O - I), pošto su svi ostali parametri ishrane, ali i uslovi ogleda generalno, bili identični.

Ovakve rezultate za telesnu masu, prate utvrđeni ukupni i dnevni prirasti, tako da je 42. dana ogleda O - I grupa brojlera imala značajno veći prirast u poređenju sa O - II grupom ($p < 0,05$), dok su obe ogledne grupe imale visoko signifikantno viši i ukupni i dnevni prirast u odnosu na kontrolnu grupu brojlera (K) ($p < 0,001$) (grafikon 3, grafikon 4).



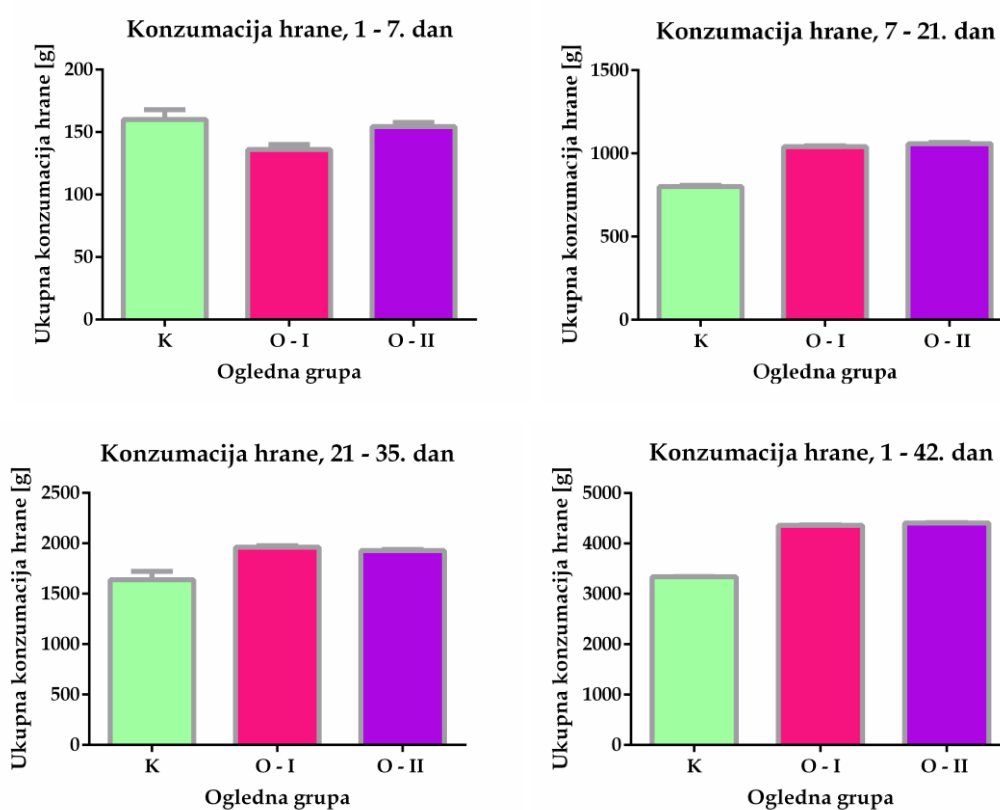
Grafikon 3 – Ukupni prirast piladi tokom ogleda, po periodima, (n=100),[g]

Gotovo identične podatke o izmerenoj telesnoj masi, kao i rezultatima prirasta piladi hranjenih smešama sa približno istim sadržajem fosfora i kalcijuma u hrani, navode i drugi autori (Leske i Coon, 2002; Coon i sar., 2007; Shastak i sar., 2012; Liu i sar., 2013a; Mutucumarana i sar., 2015).



Grafikon 4 - Dnevni prirast piladi tokom ogleda, po periodima, (n=100),[g]

Posmatrajući konzumaciju hrane u izvedenom ogledu uočena je najmanja konzumacija hrane za kontrolnu grupu brojlera (K) u svim merenjima. Pad apetita smatra se inicijalnim simptomom ozbiljnijeg deficita fosfora (McDowell, 2003), što posledično vodi smanjenoj konzumaciji hrane pa i manjem prirastu i telesnoj masi. Ogledne grupe hranjene smešom sa dodatim neorganskim izvorom fosfora imale su konzumaciju hrane sa manjim numeričkim razlikama, tako da je za sve ogledne periode, kao i za ceo ogled zbirno, ogledna grupa (O - I) imala najveći utrošak hrane (4408,3 g - ukupna konzumacija i 105 g - dnevna konzumacija) (grafikon 5).



Grafikon 5 – Ukupna konzumacija hrane tokom ogleda, po periodima, (n=100), [g]

Dodatno, podaci za konverziju, kao odnos prirasta i utroška hrane, su kompatibilni ostalim navedenim proizvodnim rezultatima, pa je najveće vrednosti konverzije imala grupa sa redukovanim sadržajem fosfora u obroku (K) od 1,97 posmatrano za ogled u celosti. Najnižu vrednost konverzije postigla je ogledna grupa O - I (od 1,78).

Maller i sar. (2016) navode vrednosti ukupne konzumacije u skladu sa dobijenim rezultatima ovog oglada i to, od 4380 - 4450 g 42. dana oglada i 1220 - 1280g 21. dana oglada, kao i konverzije koja je ovde 1,68 - 1,70 42. oglednog dana. Ovakvi navodi su i u skladu sa navodima Mutucumarana i sar. (2015), koji su utvrdili vrednosti dnevne konzumacije od oko 120 g po piletu, u uzrastu od 21. do 28. dana.

Woyengo i sar. (2010) su zabeležili ukupnu konzumaciju hrane za pilad 21. dana od 811 do 1027,6 g, dok je konverzija za iste ogledne grupe 1,34 - 1,37. Nešto niže vrednosti konverzije navode i Zeller i sar. (2015), u čijem istraživanju je utvrđena konverzija od 1,39 do 1,49 za brojlere u periodu od 15. do 24. dana. Prema Cardoso Júnior i sar. (2010) konverzija je 1,63 kod piladi 35. dana od izleganja. Rodehutsord i sar. (2012) su zabeležili nešto niže vrednosti ukupne konzumacije, koja se kretala u rasponu od 660 do 690 g, po grupama sa različitim nivoima fosfora u obroku, za period od 20. do 28. dana starosti.

S druge strane de Carvalho Mello i sar. (2012) navode da je ukupna konzumacija oko 4500 g po grupama za uzrast do 46. dana, dok je konverzija značajno veća (2,30 - 46. dan, 1,7 - 33. dan) nego u ovom ogledu.

Ovde treba uzeti u obzir da su merenja u različitim ogledima vršena u različitim vremenskim intervalima, pa nejednaki posmatrani periodi nisu najpodesniji za poređenje. Takođe, osim koncentracije fosfora u obroku, značajan je uticaj ostalih faktora držanja, odgoja i ishrane piladi na proizvodne rezultate. Tako, variranje može biti posledica različitih eksperimentalnih uslova, druge provenijencije brojlera (Ross 308), seksiranja piladi, nakon koga su uključene samo muške jedinke u ogled i slično.

Posmatrajući sveukupno proizvodne rezultate za ogled u celosti, zapaža se da su najbolje proizvodne rezultate postigli brojleri ogledne grupe (O - I), što favorizuje ovde korišćeno mineralno hranivo. Interesantno je istaći da je unutargrupna varijabilnost posmatranih parametara bila najmanja za istu oglednu grupu, te da je u funkciji vremena najujednačejiniji porast jedinki bio u ovoj oglednoj grupi brojlera (O - I), dok se u preostale dve (K i O - II) tokom oglada povećavala unutargrupna varijabilnost posmatranih osobina.

6.4. Iskoristivost mineralnih materija

Ispitivanjem sadržaja fosfora i kalcijuma u fecesu oglednih grupa utvrđeno je smanjenje njegove količine proporcionalno smanjenju dnevno unete količine fosfora, pa je kontrolna grupa brojlera (K) imala statistički značajno manju količinu fosfora i kalcijuma u fecesu naspram oglednih grupa O - I i O - II ($p < 0,001$). Takođe, poređenjem dobijenih vrednosti apsorbovanog fosfora i kalcijuma (mg/dan) zapaža se statistički značajno veća količina apsorbovanih ovih mineralnih materija kod oglednih grupa (O - I i O - II) u poređenju sa kontrolnom grupom (K) i to za oba posmatrana uzrasna perioda.

Dostupni podaci iz literature za ove ispitivane parametre su znatno varijabilni. Rodehutsord i Dieckmann (2005) su utvrdili količine od 115 do 315 mg/dan izlučenog fosfora fecesom, Dilger i Adeola (2006) od 651 do 1808 mg/kg SM, Liu i sar. (2012) - 475 - 591 mg/ dan, Liu i sar. (2013a) - 205 - 1025 mg/ dan, Perryman i sar. (2016) - 0,31 - 2, 08 g/kg SM. Osim variranja određenih eksperimentalnih uslova, pre svega uzrasta piladi i dužine perioda sakupljanja fecesa, različiti su i načini izražavanja dobijenih rezultata. Najčešće se količina fosfora izlučenog iz organizma prikazuje kao mg izlučenog fosfora dnevno po ptici ili kao mg izlučenog fosfora po kg SM fecesa. Sve ove varijabilnosti čine literaturne podatke nepodesnim za poređenje.

Prividna svarljivost fosfora obe ogledne grupe (O - I i O - II) statistički se značajno razlikovala u poređenju sa kontrolnom (K) grupom. Izračunate vrednosti prividne svarljivosti su 68,85% (O - I) i 65,51% (O - II) za I uzrastni period i 69,86% (O - I) i 67,11% (O - II) za II uzrastni period.

Leske i Coon (2002) smatraju da je prividna svarljivost fosfora iz obroka u kome je monokalcijum fosfat predstavljao izvor neorganskog fosfora od 52,7% do 67,6%, po oglednim grupama, za različite nivoe fosfora u hrani. Slično navedenom, Perryman i sar. (2016) su prijavili vrednosti od 44,9% do 64,2%, kao i Rodehutsord i Dieckmann (2005) koji su ustanovili prividnu svarljivost fosfora od 57,6% do 62,7%.

Ipak, među literaturnim podacima mogu se naći i druga stanovišta. Tako, Liu i sar. (2013a) izveštavaju o višim vrednostima prividne svarljivosti fosfora (73,6% do 85,5%) nego u ovde izvedenom ogledu, što može biti posledica nižih koncentracija fosfora u oglednoj smeši. Zatim, nešto niži procenat iskoristivosti fosfora (59,2%) utvrdili su Liu i sar. (2013b), koji se može pripisati kraćem vremenu sakupljanja fecesa, koje je u njihovom ogledu trajalo 96 h. Vrednosti utvrđene u ovom ogledu, takođe su veće u odnosu na one o kojima izveštavaju Shastak i sar. (2012) (od 54,9 % do 56,3%), a smatra se da ove varijabilnosti nastaju kao posledica ispitivanja različitih mineralnih hraniva (mononatrijum fosfat i dikalcijum fosfat), bez obzira na slične koncentracije ukupnog fosfora u hrani, u odnosu na ovde izveden ogled.

Ispitivanje prave ukupne svarljivosti fosfora regresionom metodom je uobičajeno u ogledima na živini (Perryman i sar., 2016; Mutucumarana i sar., 2015; Rodehustcord i sar., 2012; Dilger i Adeola, 2006) i svinjama (Liu i sar., 2016). Prava svarljivost se izračunava regresijom količine dnevno apsorbovanog fosfora u odnosu na količinu dnevno unetog fosfora. Na taj način izvršena je korekcija prividne svarljivosti fosfora za endogene gubitke fosfora, a u cilju dobijanja što preciznijih rezultata.

Ukupna prava svarljivost fosfora utvrđena u ovom ogledu (59,37% za prvi period i 55,96% za drugi period) u skladu je sa procentima prave svarljivosti koje su utvrdili Liu i sar. (2013a) (52,6% - 58,3%), kao i Dilger i Adeola (2006) (59,82%). Mutucumarana i sar. (2014) su dokazali da se prava svarljivost fosfora kreće u granicama od 46,4% do 72,7%.

Komparacijom uglova za dva ispitujuća uzrasna perioda (59,37% vs. 55,96%) ustanovljeno je da se prava svarljivost fosfora nije značajno razlikovala među brojlerima različite starosti ($p = 0.6774$) u ovde izvedenom ogledu. Do ovakvih zaključaka su došli i Shastak i sar. (2012), koji u svom ogledu nisu ustanovili značajne razlike u iskoristivosti fosfora kod brojlera istog uzrasta kao i u ovom ogledu. Do sličnih zapažanja su došli i Rodehustcord i sar. (2003), u ogledu sprovedenom na tri i pet nedelja starim Pekinškim patkama. S druge strane, u ovde prikazanim rezultatima ogleda, između dva ispitujuća perioda signifikantno su varirale količine

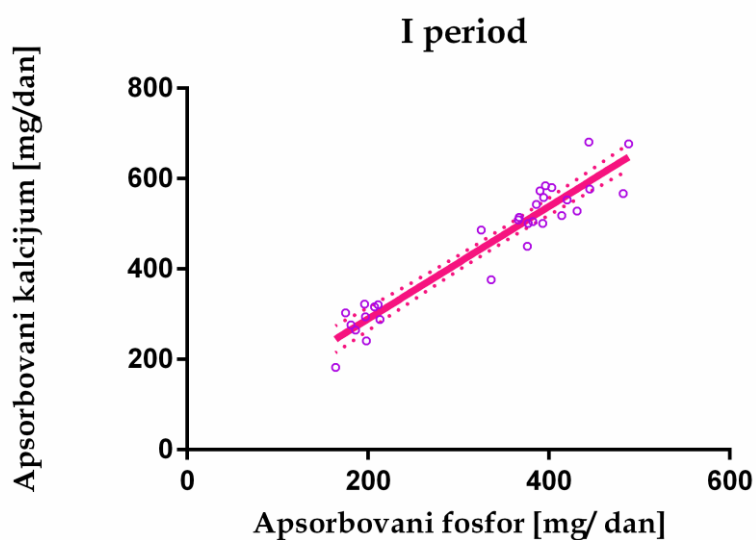
dnevno unetog fosfora hranom, izlučenog fosfora fecesom i apsorbovanog fosfora ($p < 0.001$), što se može objasniti povećanom konzumacijom hrane kod starijih ptica.

Endogeni gubici fosfora su iznosili 46,673 i 116,32 mg/dan, za prvi i drugi ispitujući period. Literaturni podaci za endogene gubitke fosfora kod brojlera su vrlo varijabilni. Prethodne studije su izveštavale o endogenim gubicima fosfora od: 190,5 mg (Dilger i Adeola, 2006), 51,3 mg - 123 mg (Liu i sar., 2012), 38,9 mg - 109 mg (Liu i sar., 2013b), 272 mg (Rutherford i sar., 2002), 446 mg (Rutherford i sar., 2004). Ove nepodudarnosti najpre mogu biti posledica različitih metodoloških pristupa, ali i mnogi drugi faktori mogu uticati na procenu endogenih gubitaka fosfora (npr. koncentracija Ca u hrani, odnos Ca:P, vrsta mineralnog hraniva...) (Perryman i sar., 2016; Liu i sar., 2013a).

U ovom ogledu endogeni gubici fosfora su signifikantno različiti od nule. Ovo nije u skladu sa navodima nekih drugih autora (Liu i sar., 2016; Perryman i sar., 2016) po kojima endogeni gubici fosfora nisu signifikantno različiti od nule, što ukazuje na velika variranja u procenjenim vrednostima endogenog fosfora među oglednim jedinkama pojedinačno. Ovi autori navode i negativne vrednosti endogenih gubitaka fosfora, što se smatra posledicom ekstrapolacije regresione linije (Mutucumarana i sar., 2014; Liu i sar., 2013a; Rodehutsord i sar., 2012; Shastak i sar., 2012). Ovako kontradiktorni podaci otvaraju pitanje o validnosti regresione metode u utvrđivanju endogenih gubitaka fosfora. Ipak, u ovom ogledu utvrđeni endogeni gubici su pozitivni i kompatibilni sa pretpostavkom regresione metode po kojoj nivo fosfora u hrani ne utiče na endogene gubitke fosfora.

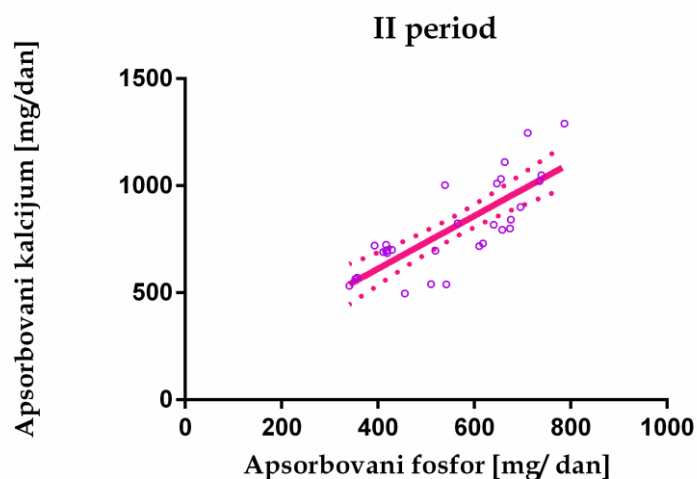
Kako je prisutan kalcijum u obroku jedan od činilaca koji značajno utiču na dostupnost fosfora iz hrane, utvrđivanje iskoristivosti kalcijuma može biti pokazatelj biološke vrednosti mineralnog hraniva. Utvrđena prividna svarljivost kalcijuma u ovom ogledu kretala se od 60,79 do 69,92%, za oba starosna perioda. Rezultate slične ovde navedenim pokazali su i drugi autori (Walk i sar. (2012) 50,4% - 62,2% za brojlere; Wendt i Rodehutsord (2004) 47,4% - 69,6% za Pekinške patke). Međutim, postoje i navodi o značajno nižim nivoima iskoristivosti kalcijuma (32,7% - 40,8% Rodehutsord i Dieckmann (2005)).

Literaturni podaci prividne svarljivosti kalcijuma navode vrednosti u veoma širokom rasponu, koje su uslovljene eksperimentalnim uslovima. U ovde izvedenoj studiji kalcijum je poticao i iz stočne krede (osim monokalcijum fosfata, kukuruza i soje). Prividna svarljivost kalcijuma nije značajno varirala među oglednim grupama ($p = 0,236$ – prvi ogledni period, $p = 0,162$ – drugi ogledni period). Ako se uzme u obzir da su se smeše kojima su hranjeni brojleri kontrolne grupe s jedne strane i oglednih grupa sa druge strane, razlikovale isključivo po prisutnosti monokalcijum fosfata, nepostojanje razlike u svarljivosti kalcijuma među njima ukazuje da je prividna svarljivost kalcijuma iz monokalcijum fosfata slična stepenu prividne svarljivosti kalcijuma iz stočne krede. Ovakvo stanovište je u skladu sa navodima drugih autora (Rodehutsord i sar., 2012; Stein i sar., 2008). Stein i sar. (2006) su dokazali da iskoristivost kalcijuma iz stočne krede ne zavisi od prisustva ili odsustva fosfora u obroku svinja. Međutim, odnos Ca:P u hrani može odrediti uticaj iskoristivosti fosfora na kalcijum i obrnuto. Ovaj odnos se usled toga i ispituje kao jedan od krucijalnih faktora koji determiniše usvajanje fosfora iz obroka. U ovde izvedenom ogledu kalcijum nije bio ograničavajući faktor za apsorpciju fosfora, usled sličnog Ca:P odnosa u oglednim smešama. Odnos između količine apsorbovanog kalcijuma i apsorbovanog fosfora je bio 1,244:1 u prvom starosnom periodu, odnosno 1,234:1 u drugom starosnom periodu (grafikon 6).



$$[y = 1.244 * x + 40.60; R^2 = 0.91; S_{y,x} = 42.11]$$

Vrednosti su prikazane kao \bar{x} (o) \pm SE(•)



$$[y = 1.234 * x + 118.9; R^2 = 0.62; S_{y,x} = 33.3$$

Vrednosti su prikazane kao \bar{x} (o) \pm SE(•)]

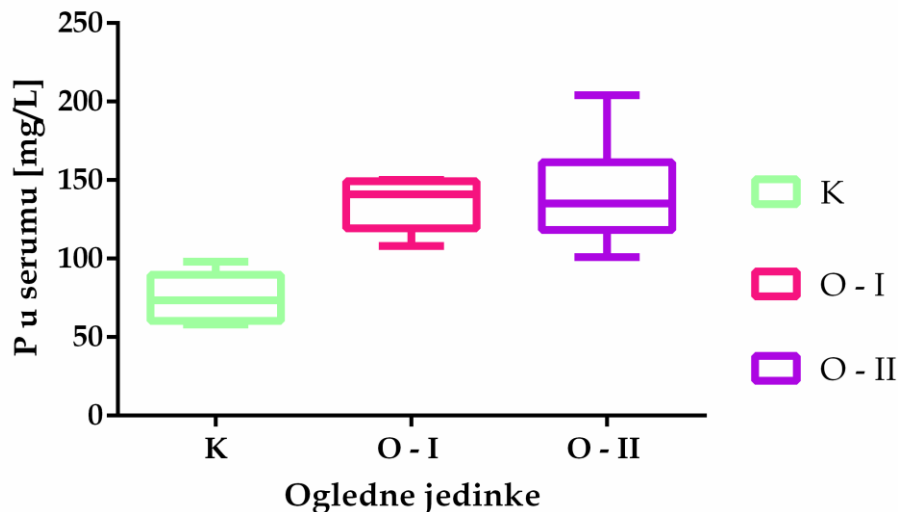
Grafikon 6 – Odnos između količine apsorbovanog kalcijuma i fosfora u I i II periodu, (n=30)

6.5. Koncentracije kalcijuma i fosfora i aktivnost alkalne fosfataze u krvnom serumu

Koncentracije fosfora i kalcijuma u krvi su fiziološki u uskim granicama, pa ne pružaju adekvatan uvid u iskoristivost ovih minerala iz hrane. Usled brzog uključivanja homeostatskih mehanizama radi održavanja koncentracija kalcijuma i fosfora unutar ovih granica, one nisu pouzdan indikator snabdevenosti organizma fosforom. Tako, u uslovima deficita dolazi do pojačane mobilizacije kalcijuma i fosfora iz koštanog tkiva, ali i pojačane njihove resorpcije iz digestivnog trakta. Ipak, smatra se da se pri pojavi jakog deficita fosfora u organizmu, najpre javlja hipofosfatemija praćena hiperkalcemijom, što je prvi indikator ishrane siromašne fosforom. Stoga, na osnovu niskih serumskih nivoa ovih minerala može se pretpostaviti visoko deficitarna ishrana, ali u evaluaciji određenih mineralnih izvora ovo nije dovoljno osetljiva metoda.

Ispitivanjem koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu brojlera tokom ogleda utvrđene su statistički značajno manje koncentracije fosfora i kalcijuma

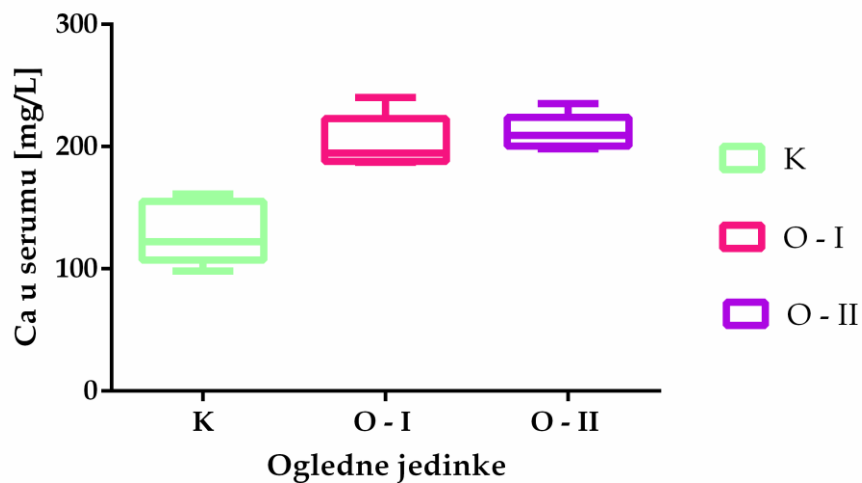
kod kontrolne grupe piladi (K), koja nije imala neorganski izvor fosfora uključen u hranu, u poređenju sa oglednim grupama (O - I i O - II). Razlike u izmerenim koncentracijama ovih mineralnih materija oglednih grupa međusobno su bile samo numeričke bez statističke značajnosti, kao i bez značajnijih odstupanja u odnosu na literaturne podatke (grafikon 7 i grafikon 8).



Grafikon 7 – Koncentracija fosfora u kronom serumu oglednih jedinki, (n=12), [mg/L]

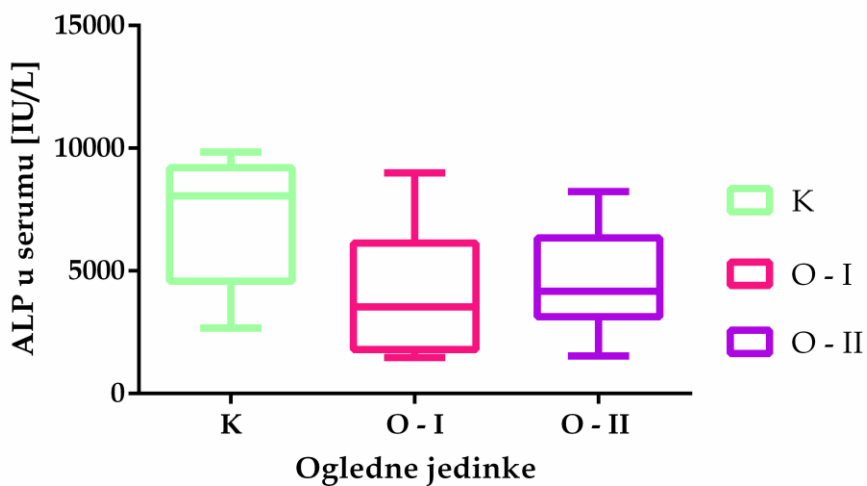
Do ovakvih zaključaka su došli i Shastak i sar. (2012) ispitujući serumske koncentracije fosfora i kalcijuma, koji navode da ovi parametri nisu dovoljno senzitivni za poređenje dva različita izvora fosfora. Slično stanovište zastupaju i Gueguen (1999) i De Groote i Lippens (2002).

Linearni porast koncentracije fosfora u plazmi sa porastom koncentracije fosfora u hrani dokazan je za nivoe fosfora do 0,3% fosfora (Gardiner, 1962; Hurwitz, 1964). U brojnim ogledima određivana je koncentracija fosfora u plazmi (Lima i sar., 1997; Fernandes i sar., 1999; Manangi i Coon, 2006) ili serumu (Rama Rao i sar., 1999; Hemme i sar., 2005), kao pokazatelj bioiskoristivosti fosfora iz hrane. Ipak, ova veza uočena je kod niskih koncentracija fosfora u obroku tj. jakih deficita, a smatra se limitirano upotrebljivim parametrom pri evaluaciji mineralnih hraniva.



Grafikon 8 – Koncentracija kalcijuma u krvnom serumu oglednih jedinke, (n=12), [mg/L]

Razlike u aktivnosti alkalne fosfataze, nisu bile statistički značajne među sve tri grupe brojlera (grafikon 9). Kako je aktivnost ovog enzima uslovljena, osim procesa remodeliranja koštanog tkiva i aktivnošću hepatocita, smatra se nedovoljno pouzdanim indikatorom iskoristivosti fosfora.



Grafikon 9 – Aktivnost alkalne fosfataze u krvnom serumu oglednih jedinke, (n=12), [IU/L]

6.6. Fizičko - hemijske karakteristike kostiju

Ispitivanje mehaničkih, morfo-metrijskih i hemijskih karakteristika kostiju je uobičajeno u ogledima ispitivanja svarljivosti fosfora i kalcijuma i smatra se visoko senzitivnom metodologijom u istraživanjima ovog tipa. Koštano tkivo je tkivo izbora u ispitivanju iskoristivosti fosfora, što je u skladu sa ulogom kalcijuma i fosfora u izgradnji i metabolizmu koštanog tkiva, kao i sa stalnim remodeliranjem kostiju naspram potreba organizma. U periodu rasta i razvoja metabolizam na nivou kostiju je izrazito intezivan, pre svega metabolizam mineralnih materija, zato što se kost neprekidno formira pod periostom, dok se sa endostalne strane stalno resorbuje. Kod brojlerske piladi, ovi su procesi izraženi zbog brzog i intezivnog porasta organizma u kratkom vremenskom periodu tova.

Integritet skeleta je uslovljen brзом stopom porasta, ali i genetskim svojstvima, okruženjem, menadžmentom odgoja, lokomotornom aktivnošću, uzrastom, toksinima i infektivnim bolestima. Međutim, kao krucijalni faktor navodi se ishrana (Rath i sar., 2000; Talaty i sar., 2009).

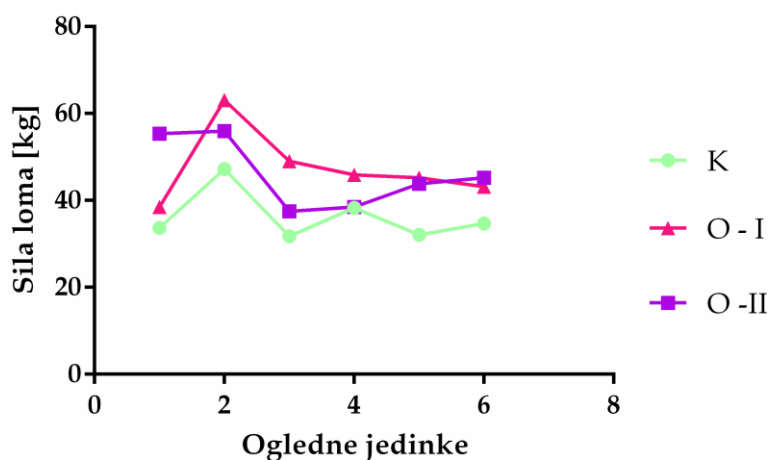
Deficit fosfora ili kalcijuma u hrani dovodi do poremećaja razvoja kostiju, kao jednog od patognomoničnih simptoma. U uslovima ishrane siromašne u fosforu, dolazi do usporavanja kalcifikacije, dok se sinteza prekoštane hrskavice normalno odvija. To dovodi do proširenja hipertrofične zone rasta dugih kostiju (epifizne ploče), kao i do defekata na hrskavici u smislu usporene koštane diferencijacije. Rast kostiju je usporen uz pojavu degeneracije. Na kostima sa intenzivnijim rastom, koje trpe veće opterećenje, promene su najpre uočljive (femur, tibia, tarsus, metatarsus...) (Šefer, 2002).

6.6.1. Čvrstina kostiju

Mehanička svojstva kosti su pod uticajem ishrane, ekspresije gena za sintezu kolagena i proteina, kvantiteta i kvaliteta prisutnih organiskih i neorganskih materija, koncentracije i veličine mineralnih materija i strukture kosti (Boskey i sar., 1999).

Čvrstina kostiju, kao pokazatelj mehničkih svojstava kosti, pre svega je uslovljena građom matriksa i strukturom kosti. Matriks čine kolagena vlakna, međusobno povezana intermolekulskim vezama, koja pružaju otpor kostiju na istezanje. Između kolagenih vlakana je mineralni sadržaj, koji obezbeđuje otpor kosti na kompresiju. Meru čvrstine kosti predstavlja sila loma. Deficit fosfora u obroku, dovodi do pojačane mobilizacije fosfora iz koštanog tkiva, kao njegovog depoa, pa posledično i promene karakteristika koštanog tkiva, među kojima je i čvrstina kostiju. Sila loma se proporcionalno smanjuje sa smanjenjem sadržaja fosfora u obroku.

U ovde izvedenom ogledu, najmanja sila loma bila je potrebna za kosti kontrolne grupe brojlera (K) i, to signifikantno do visoko signifikantno niža u odnosu na preostale dve ogledne grupe ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Ogledna grupa I (O - I) imala je čvršće kosti u odnosu na oglednu grupu II (O - II) brojlera, bez statističke značajnosti (grafikon 10, grafikon 11).

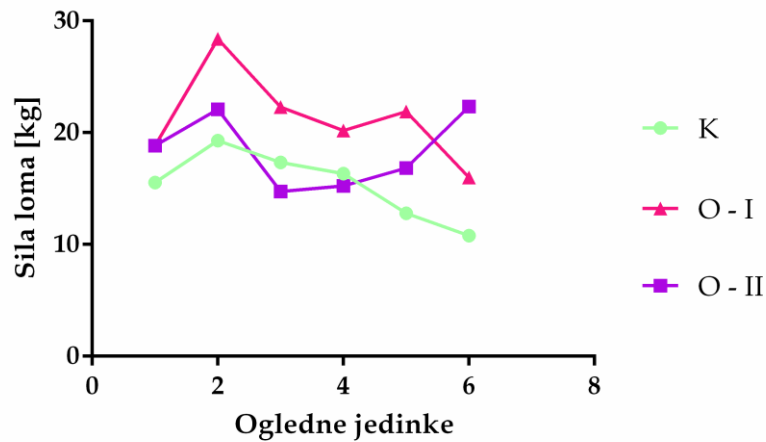


Grafikon 10 – Sila loma tibije oglednih jedinki 42. dana ogleda, ($n=12$), [kg]

Hemme i sar. (2005) su ustanovili značajne razlike u čvrstoći kostiju brojlerske piladi, koja je ovde uzeta kao pouzdan pokazatelj bioiskoristivosti fosfora različitih izvora i, to monokalcijum fosfata, dikalcijum fosfata i defluorinisanog fosfata.

Nasuprot ovome, Shastack i sar. (2012) navode da poređenjem sila loma tibije brojlera nisu zabeležene značajne razlike među oglednim grupama, pa da ova

metoda nije dovoljno senzitivna u ispitivanju bioiskoristivosti fosfora različitih izvora.

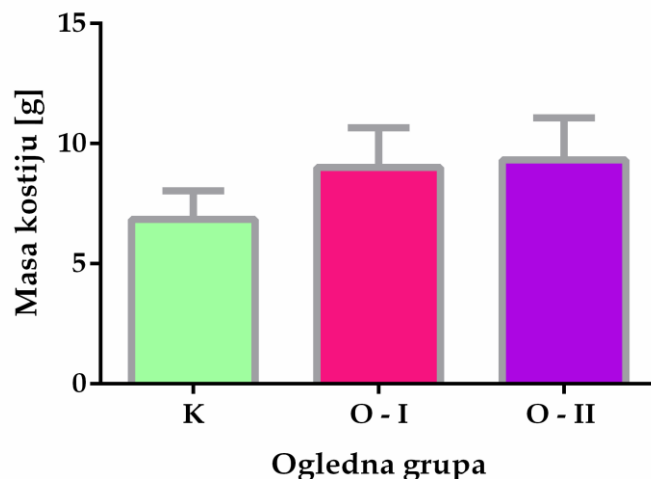


Grafikon 11 – Sila loma tarzusa oglednih jediniki 42. dana ogleda, (n=12),[kg]

Treba istaći da, osim fizičkih i mehaničkih svojstava kostiju, na preciznost rezultata mogu uticati brojni faktori, kao što su: tip upotrebljenog instrumenta, odabir kosti koja će se podvrgnuti ispitivanjima, postupak sa kostima pre analize i sl. Dodatno, jedinica u kojoj je sila loma izražena može biti njutn ili kg/m^2 , što otežava komparaciju literaturnih podataka. Ipak, sila loma zajedno sa drugim karakteristikama kostiju (pre svega hemijskim sastavom i gustinom) značajno doprinosi uvidu u stepen minerealizacije koštanog tkiva, a samim tim i nivo dostupnog fosfora i kalcijuma iz hrane, pa i evaluaciji različitih mineralnih izvora.

6.6.2. Morfometrijske analize kostiju

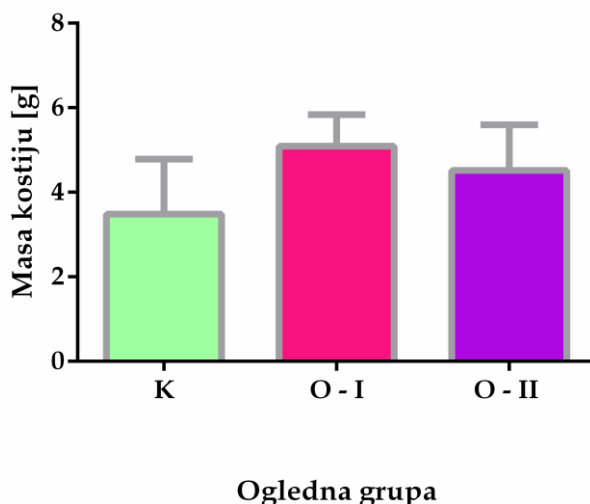
Morfometrijskim analizama kostiju uočava se ujednačen rast kosti kod brojlera oglednih grupa O - I i O - II, dok su pilad kontrolne grupe (K) pokazala manje izmerene vrednosti parametara dužine, površina poprečnih preseka i mase kosti (grafikon 12, grafikon 13). Ovo se može objasniti deficitom fosfora u ishrani ove grupe piladi, koja se manifestuje smanjenim razvojem i masom koštanog tkiva.



Grafikon 12 – Mase tibije oglednih jedinki 42. dana ogleda, (n=12),[g]

Masa tibije može se koristiti i za izražavanje drugih svojstava kosti, pre svega količine pepela (u mg na masu kosti), a uobičajeno se meri masa sirove kosti ili masa suve i odmašćene kosti. U ovde izvedenom ogledu izražena je masa sirove kosti brojlera starih 42 dana, a u skladu je sa navodima drugih autora za teške linije (Lukić, 2001). Shim i sar. (2012) su zabeležili nešto veće vrednosti mase tibije (11,23 – 15,36 g), što može biti posledica druge provenijencije piladi uključene u ovaj ogled.

Morfometrijske analize ne odražavaju samo mineralni sadržaj koštanog tkiva, već su pod uticajem veličine kosti i telesne mase jedinke, pa individualna variranja mogu uticati na preciznost rezultata.



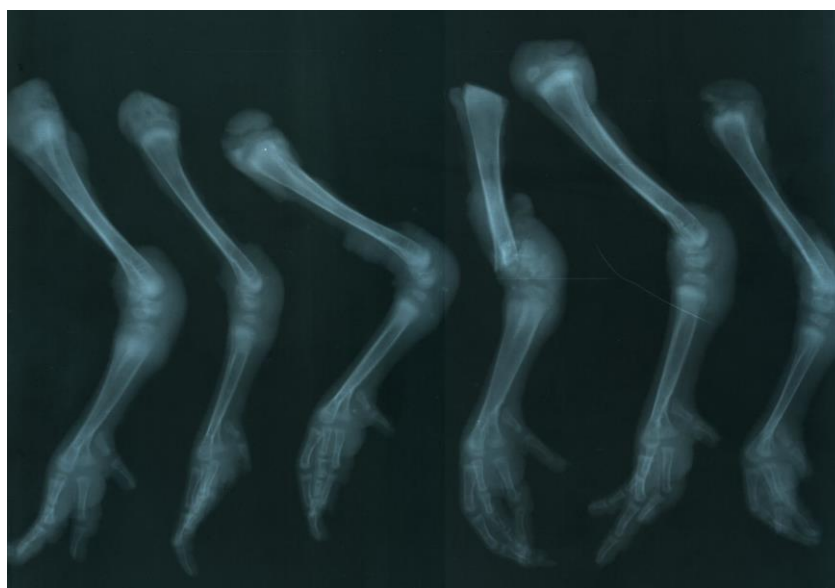
Grafikon 13 – Mase tarzusa oglednih jedinki 42. dana ogleda, (n=12),[g]

6.6.3. Radiološka analiza kostiju

6.6.3.1. Rentgenografska ispitivanja

Rentgenološka ispitivanja strukture prvog reda kostiju (kortikalis, kompakta i spongioza) ukazuju na blage razlike između grupa. Najizraženije razlike opisane su u izgledu spongioze i kompakte kontrolne grupe brojlera, hranjene hranom bez mineralnog izvora fosfora, u odnosu na preostale dve grupe. Krećna senka kompakte je najjasnija, kontrastno istaknuta kod ogledne grupe O - I brojlera, dok je kod ostale dve grupe brojlera diskretnija.

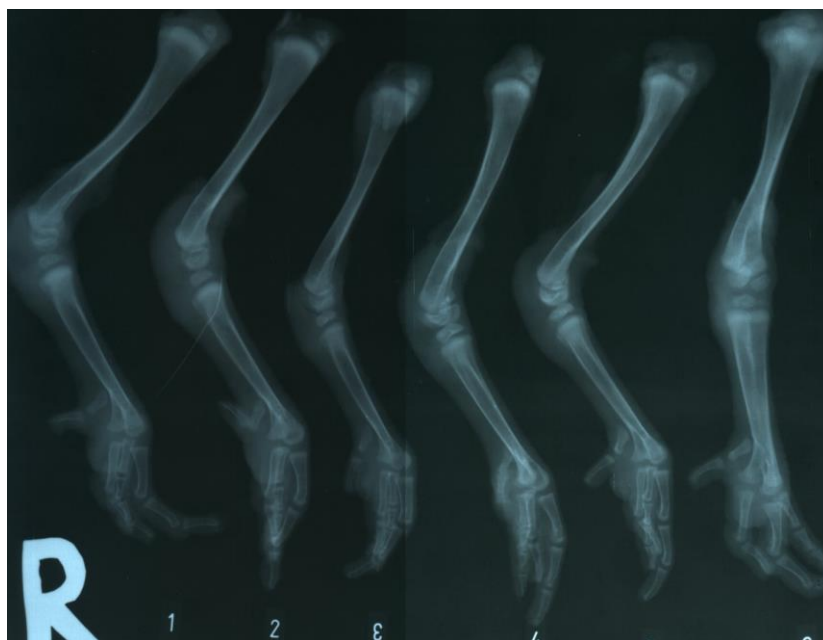
Opisane promene utvrđene rentgenografskim ispitivanjima makrostrukture prvog reda tibije i tarzusa brojlera, ukazuju da su najizraženiji stepen osifikacije imala pilad ogledne grupe O - I, dok je najmanji stepen osifikacije imala gupa hranjena obrokom deficitarnim u fosforu (K). Ovo ispitivanje pruža značajan uvid u stepen mineralizacije koštanog tkiva, koji je kvalitativne i opisne prirode. Ipak izostaju precizni kvantitativni pokazatelji, pa se s' obzirom na dobijene rezultate, može zaključiti da ovaj metod nije dovoljno senzitivan za determinisanje i/ili upoređivanje iskoristivosti fosfora iz hrane (slika 5, slika 6 i slika 7).



Slika 9 – Rentgenogrami tibije i tarzusa desne noge oglednih jedinki kontrolne grupe (K), 42. dana



Slika 10 – Rentgenogrami tibije i tarzusa desne noge oglednih jedinki ogledne grupe O – I, 42. dana



Slika 11 – Rentgenogrami tibije i tarzusa desne noge oglednih jedinki ogledne grupe O – II, 42. dana

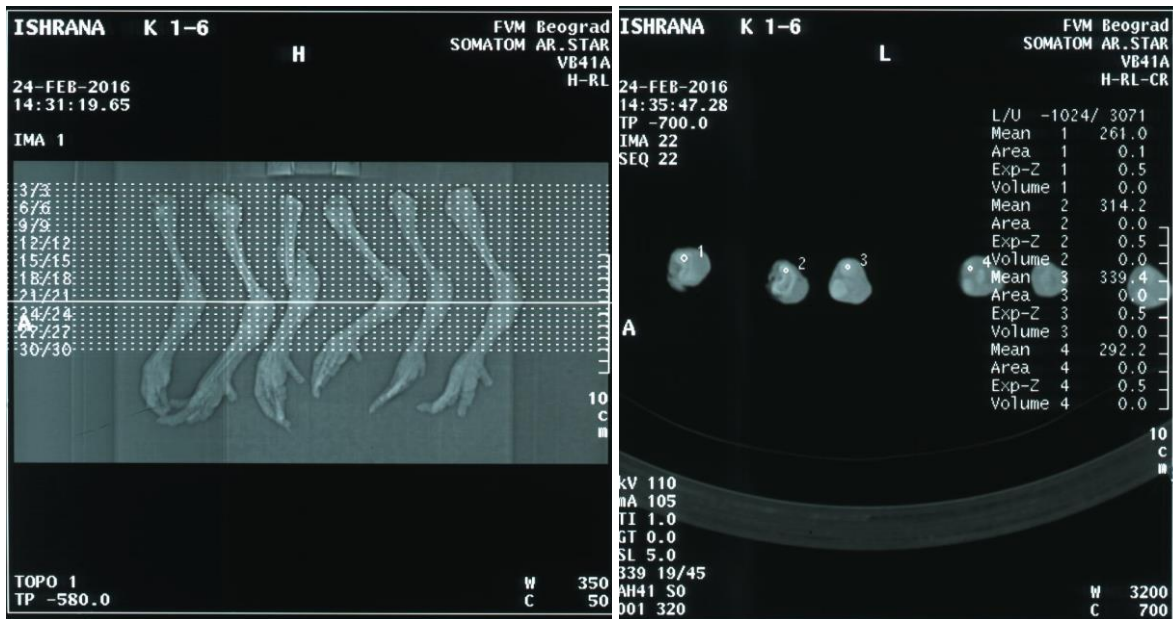
6.6.3.2. Gustina kostiju

Gustina kostiju podrazumeva volumetrijsko merenje, kojim se iskazuje gustina u smislu odnosa mase i zapremine. Jedinice u kojima se gustina može izražavati, mogu biti Hounsfieldove jedinice ili g/cm^3 . Gustina kosti se može meriti u određenom ograničenom području kosti ili duž cele kosti. Uobičajeno je merenje gustine duž cele kosti tzv. DEXA metodom (dual-energy x-ray absorptiometry), ali ova metoda daje dvodimenzionalne skenove, koji ne razlikuju kortikalni od trabekularnog dela kosti (Talaty i sar., 2009). Stoga je izražavanje gustine odnosno tzv. denziteta koštanog tkiva izmerenog ovom metodom u g/cm^2 . Tako, kod merenja duž cele kosti treba biti obazriv kod interpretacije rezultata (Korver i sar., 2004).

Kao najveći nedostatak kompjuterizovane tomografije (CT-a), navodi se to što je merenje ovom metodom sprovedeno na jednom određenom preseku kosti. Pojedini autori su merili gustinu koštanog tkiva na polovini dužine tibije (Shastak i sar., 2012, u čijem ogledu je gustina tibije varirala od 410 do 558 g/cm^3 za različite izvore fosfora u hrani). Merenja na više tačaka duž kosti u proksimalnom, središnjem i distalnom regionu su pokazala visoke nivoe korelacije, međusobno, kao i sa merenjima duž cele kosti i to kako kod brojlera, tako i kod kokošaka nosilja i petlova (Bishop i sar., 2000; Korver i sar., 2004). Stoga se može zaključiti da je merenje gustine na određenom području pojedinačne kosti, odražava stanje stepena mineralizacije koštanog tkiva skeleta u celosti.

U ovde izvedenom ogledu, merenja su najpre obavljena na prelasku epifiza u dijafizu kosti, što je zona porasta kosti, pa se smatra predilekcionim mestom gde će se najpre uočiti posledice nutritivnih deficijencija. Najveće vrednosti gustine koštanog tkiva zabeležene su kod ogledne grupe O - I ($431,2 \pm 29,49$ HU), nešto manje na presecima tibije ogledne grupe O - II ($423,9 \pm 55,50$ HU), dok su najmanje vrednosti gustine izmerene kod kontrolne ($395,2 \pm 83,85$ HU) grupe (K) piladi. Kompatibilno ovim rezultatima, na preostala dva preseka duž tibije, kao i merenjima koštane gustine na nivou tarzusa, dokazane su najveće vrednosti gustine koštanog tkiva kod piladi iste ogledne grupe (O - I), što ukazuje na najveći stepen mineralizacije koštanog tkiva ove grupe piladi. Ovakvi rezultati posledica su razlika

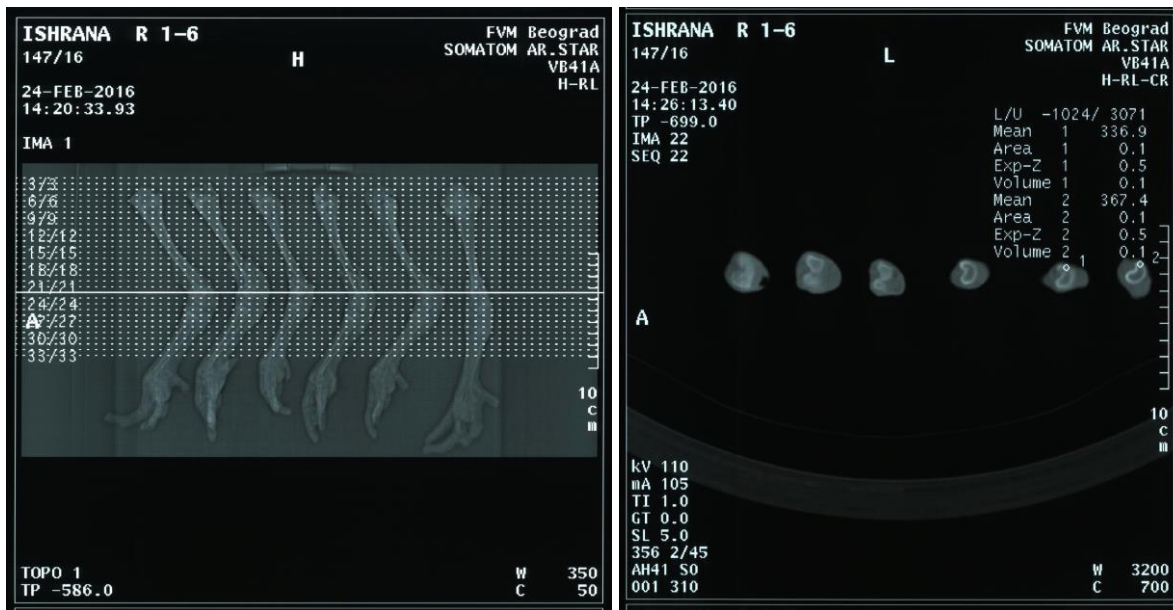
u količini dostupnog fosfora u hrani, koje se odražavaju na mineralni denzitet koštanog tkiva (grafikon 14, grafikon 15, slika 12, slika 13, slika14).



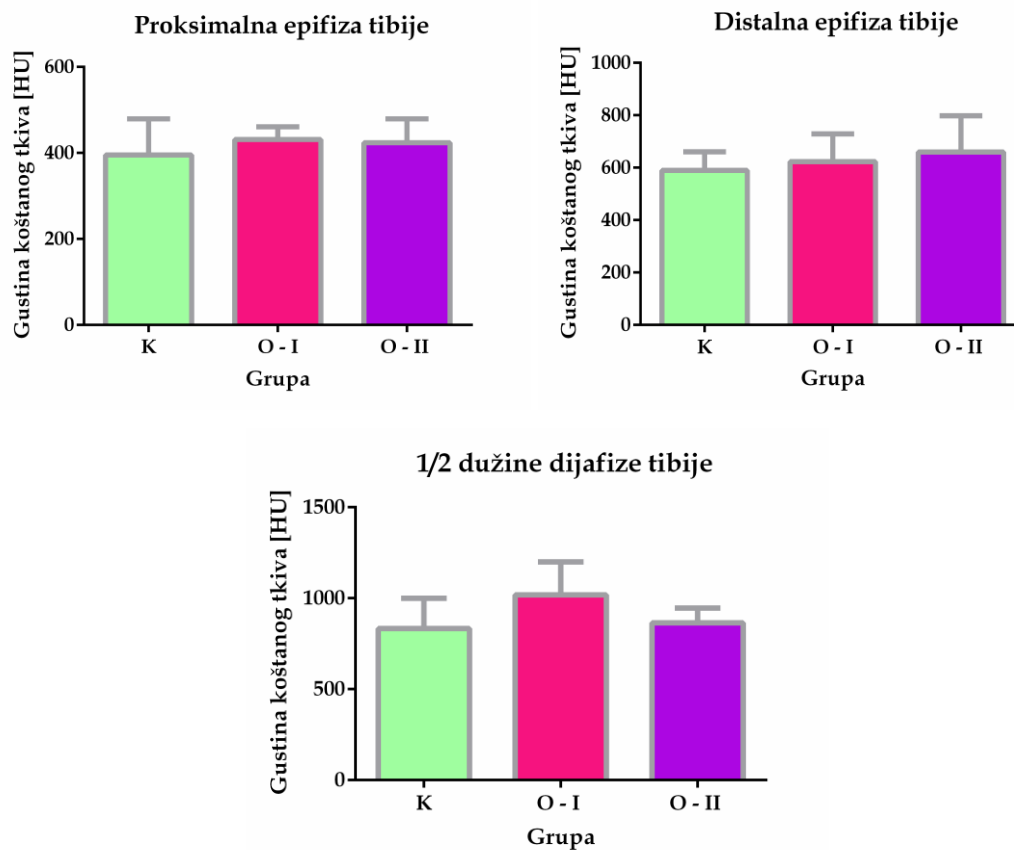
Slika 12 – CT snimak tibije i tarzusa desne noge oglednih jedinki kontrolne grupe (K), 42. dana



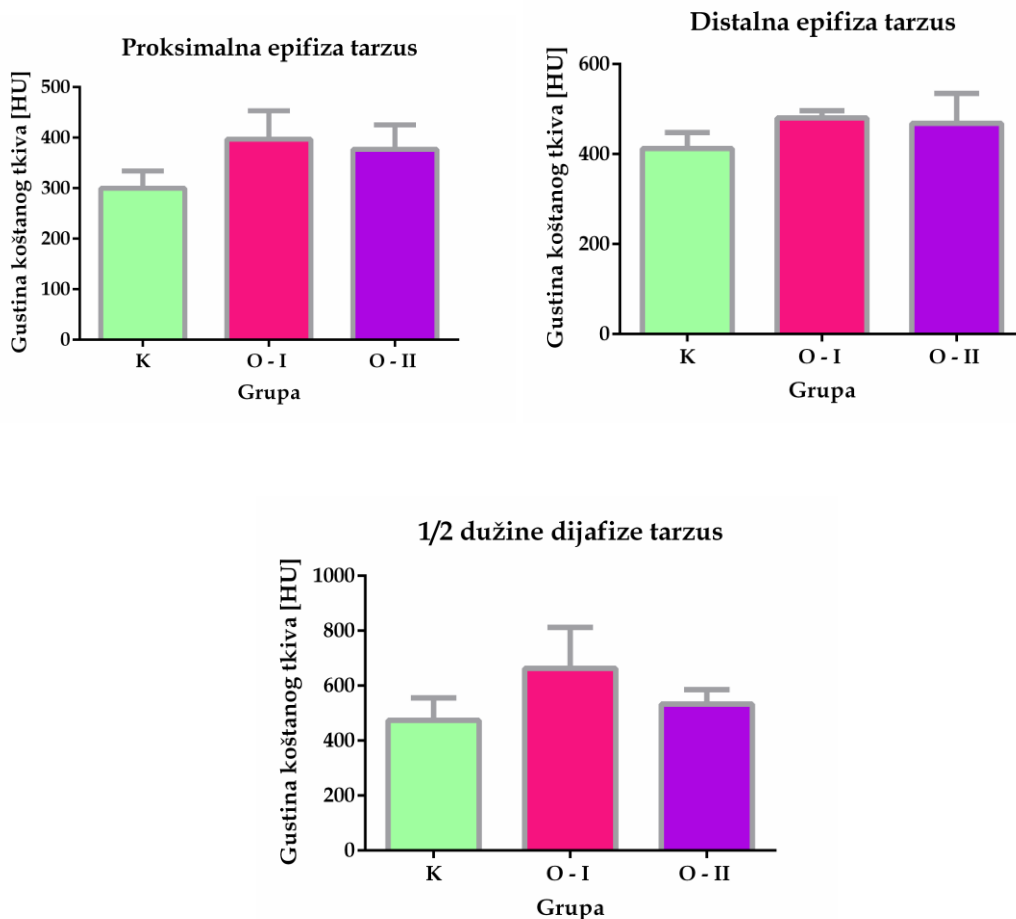
Slika 13 – CT snimak tibije i tarzusa desne noge oglednih jedinki ogledne grupe O – I, 42. dana



Slika 14 – CT snimak tibije i tarzusa desne noge oglednih jedinki ogledne grupe O – II, 42. dana



Grafikon 14 – Gustina koštanog tkiva tibije piladi 42. dana ogleda, (n=12),[HU]



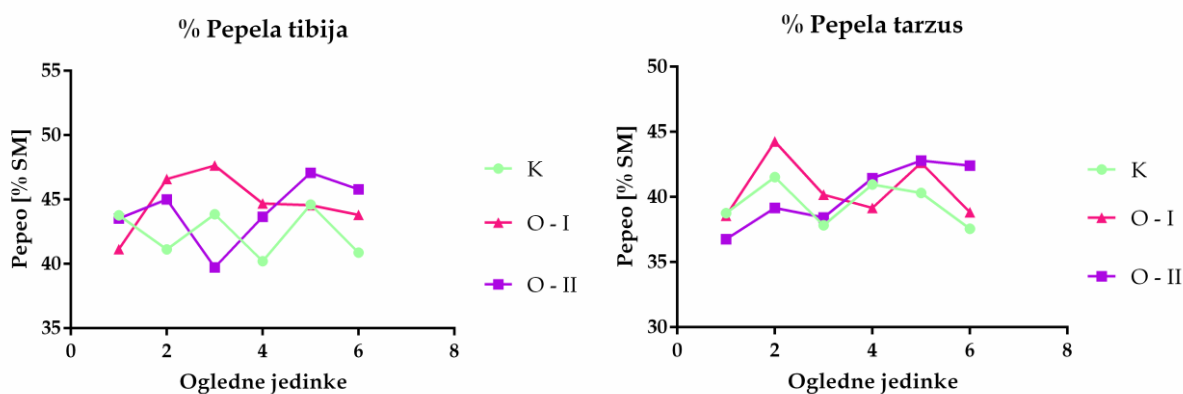
Grafikon 15 – Gustina koštanog tkiva tarsusa piladi 42. dana ogleđa, (n=12), [HU]

Gustina može biti adekvatan indikator i deficita kalcijuma u obroku (Rath i sar., 2000). U ogleđu izvedenom na kokama nosiljama White Leghorn provenijencije dokazan je linearni pad gustine koštanog tkiva, sa padom koncentracije kalcijuma u ogleđnoj smeši (Schreiweis i sar., 2003).

6.6.4. Hemijska analiza kostiju

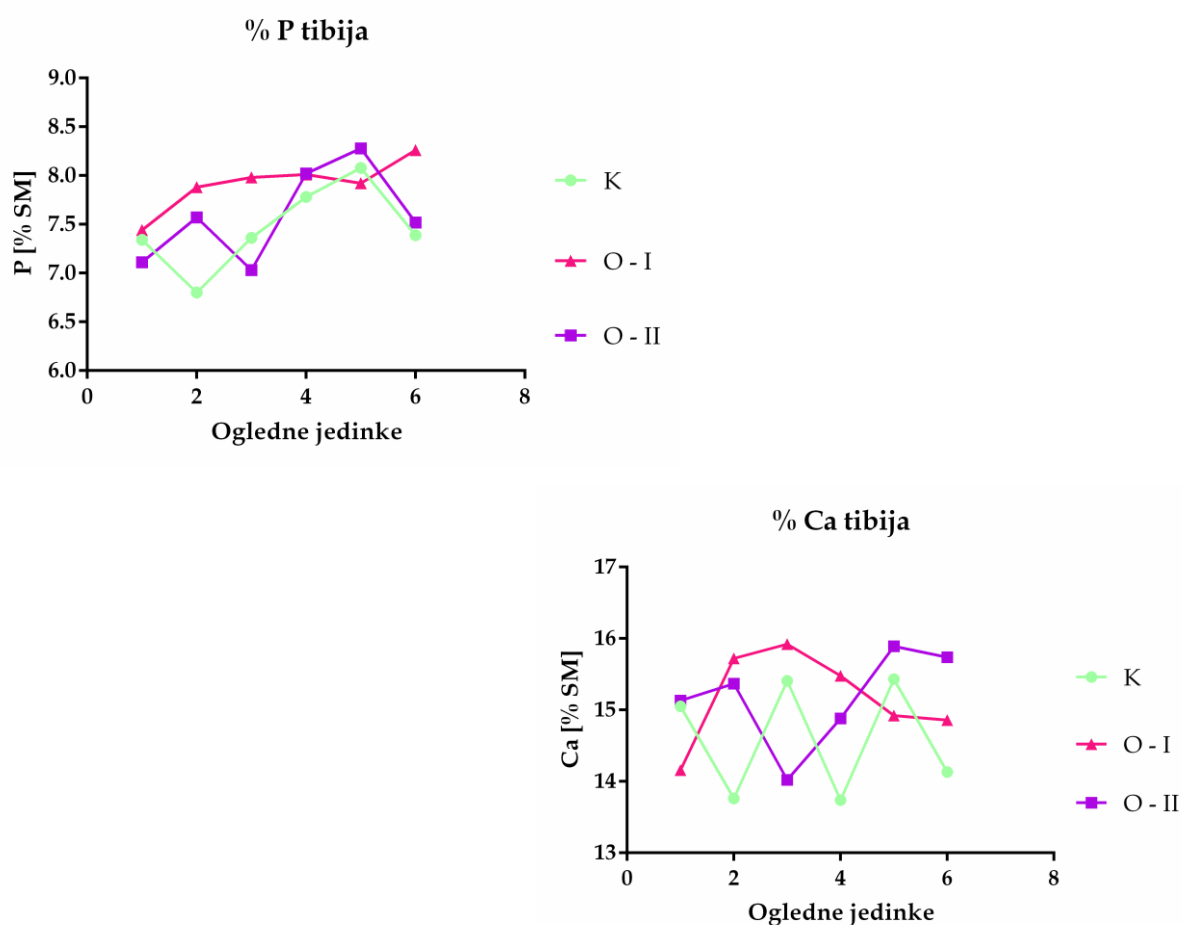
Hemijskim analizama kostiju utvrđen je sadržaj pepela u tibiji i tarzusu, koji ukazuje na optimalnu mineralizaciju koštanog tkiva oglednih grupa O - I i O - II (44,74% i 44,13%, istim redom, za tibiju i 40,60% i 40,16%, za tarzus) koje su dobijale mineralni izvor fosfora u obroku, dok je kontrolna grupa imala nešto niži procenat pepela u odnosu na preostale dve grupe (42,41% - tibija i 39,49% tarzus) (grafikon 15).

Do sličnih zapažanja došli su i Shastack i sar. (2012) koji su zabeležili nivoe pepela od 41,6% do 48,4% u tibiji i 38,4% do 44,2% u tarzusu, oglednih grupa hranjenih hranom sa različitim neorganskim izvorima fosfora. Li i sar. (2015) ustanovili su 33,8 - 45,3% pepela u tibiji, a Adeola i Walk (2013) 34,8 - 46,9% pepela, u ogledima iskoristivosti fosfora iz kompletnih smeša sa i bez dodate fitaze. Nešto veće vrednosti sadržaja pepela u istoj ispitivanoj kosti utvrdili su Hamdi i sar. (2015) (49,55 - 51,97%), ali je ovaj ogled izveden na piladi u starosti od 14 dana. Takođe, Leske i Coon (2002), u evaluaciji različitih mineralnih izvora fosfora, navode vrednosti pepela tibije od 41,1 do 51,8%, za 24 dana staru pilad, kao i 47,2 - 52,7% pepela u tibiji muških jedinki 42. dana starosti. Coon i sar. (2007) dokazali su procentualni sadržaj pepela od 40,1 do 53,1%, u tibijama brojlera 21. dana uzrasta, ispitujući različite izvore neorganskog fosfora nego u ovde izvedenom ogledu (dikalcijum fosfat i defluorinisani fosfat). Navedne varijacije mogu se pripisati razlikama u samom dizajnu ogleda.



Grafikon 16 – Sadržaj pepela u tibiji i tarzusu oglednih jedinki 42. dana, (n=12), [% SM]

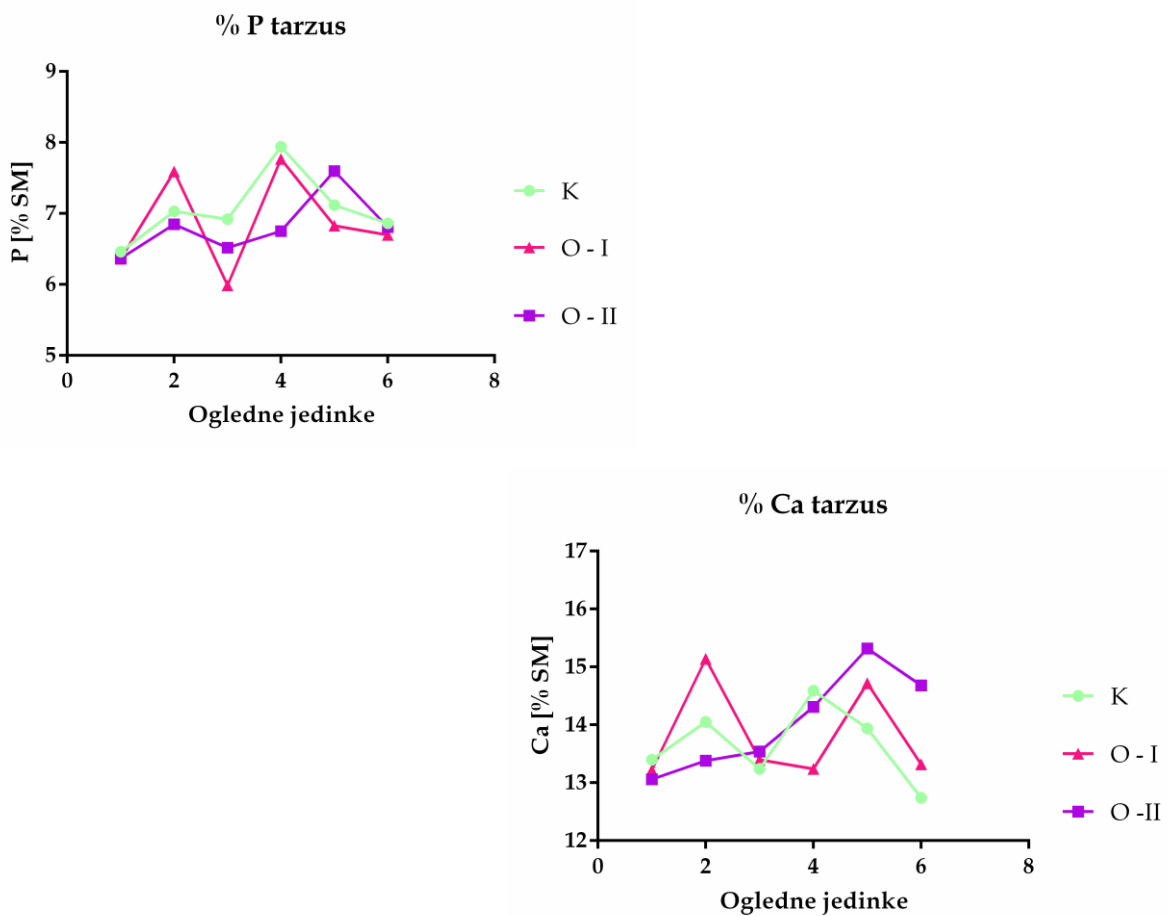
Utvrđeni nivoi fosfora i kalcijuma su bili najniži za grupu brojlera hranjenu hranom bez dodatog neorganskog fosfora (K) i to za obe ispitivane kosti - tibiju (7,46% P i 14,59% Ca) i tarzusu (7,06% P i 13,66% Ca). U tibiji oglednih grupa kod kojih je u obroku bio prisutan monokalcijum fosfat, O - I i O - II, utvrđen je veći sadržaj oba minerala (7,92% i 7,59% fosfora, 15,18% i 15,17% Ca, istim redom) (grafikon 16). Ustanovljene vrednosti fosfora i kalcijuma u tarzusu ove dve ogledne grupe su: 6,87% i 13,84% za O - I i 6,82% i 14,05% za O - II (grafikon 17).



Grafikon 17 – Sadržaj fosfora i kalcijuma u tibiji oglednih jedinki 42. dana, (n=12), [% SM]

Do sličnih zapažanja došli su i Walk i sar. (2012), koji su ustanovili 7,46% P i 16,7% Ca u tibiji brojlera hranjenih obrokom sa sličnim sadržajem fosfora i kalcijuma kao u ovde izvedenom ogledu.

Islam i sar. (2012) su dokazali 7,9 – 8,1% P i 21,6 – 21,9% Ca u tibiji brojlera. Veće koncentracije kalcijuma u koštanom tkivu ustanovili su i Hemme i sar. (2005) i, to 20,1% Ca, a 10,8% P u SM tibije, u ispitivanju iskoristivosti fosfora iz različitih izvora, kod piladi 36. dana života, kojima je u eksperimentalnoj hrani standardizovana koncentracija fosfora na 6 g P na kg SM hrane. Koštano tkivo tibije piladi različitih oglednih grupa sadržalo je 7,20% do 9,25% P i 16,43% do 18,62% Ca u ogledu koji su izveli Li i sar. (2016).



Grafikon 18 – Sadržaj fosfora i kalcijuma u tarsusu oglednih jediniki 42. dana, (n=12), [% SM]

Tibija je kost izbora u navedenim ispitivanjima, pa je u najvećem broju ogleda prikazan mineralni status ove kosti kao reprezentativne za skelet u celosti. Pre svega, zbog svoje veličine, ova kost podložna je i drugim vrstama analize (fizičkim – sila loma, morfometrija...). Takođe, smatra se da duge, cevaste kosti imaju intenzivniji

metabolizam, pa će kao veći depoi pre podleći mobilizaciji mineralnih elemenata u uslovima deficita. Ipak, postoje ogledi u kojima su ispitivanjima podvrgnute i druge kosti, koje su pokazale visok stepen korelacije dobijenih rezultata sa rezultatima hemijskih analiza tibije. Tako, Li i sar. (2015) su pored tibije ispitivali i tarzus (*tarsometatarsus*) i utvrdili 9,78 – 11,64% P u tibiji i 8,45 – 11,63% P u tarzusu. Shastack i sar. (2012) su u ispitivanju iskoristivosti fosfora koristili tibiju, tarzus i falange prstiju, dok su Hemme i sar. (2005) pored tibije analizirali i humerus i femur.

Sveukupno posmatrajući dobijene rezultate, može se zaključiti da je hemijski sastav dobar pokazatelj stepena mineralizacije koštanog tkiva, te da je zbirno pilad kontrolne grupe (K) imala kosti najmanjeg stepena čvrstoće i gustine, koje su u isto vreme bile i sa najnižim sadržajem pepela, kalcijuma i fosfora. Dok je ogledna grupa O – I, pokazala najveći stepen mineralizacije koštanog tkiva, u obe ispitivane kosti, kroz sve prikazane karakteristike, što govori u prilog upotrebi monokalcijum fosfata koji je u ishrani ove ogledne grupe predstavljao izvor neorganskog fosfora.

6.7. Međusobna zavisnost iskoristivosti fosfora, proizvodnih rezultata i parametara ispitivanja na kostima

Količina ukupnog fosfora u hrani, kao ključni faktor koji determiniše usvojivost fosfora, u jakoj je korelacionoj vezi sa količinom apsorbovanog fosfora, u oba ispitivana perioda (0,9404^{****} - I period, 0,8470^{****} - II period), a ovakva veza je ustanovljena i odnosu na količinu apsorbovanog kalcijuma (0,8957^{****} - I period, 0,5093^{**} - II period). Ogledne smeše su formulisane uobičajeno za intenzivan odgoj piladi, tako da kvantitativno i kvalitativno zadovolje potrebe piladi u skladu sa važećim preporukama. Potpunim isključivanjem monokalcijum fosfata smanjena je koncentracija ukupnog fosfora u hrani, a njegovim smanjenjem smanjuju se i količine apsorbovanog kalcijuma i fosfora sa gore navedenim koeficijentom korelacije. S' druge strane, korelaciona veza između koncentracije fosfora u obroku i procenta prividne svarljivosti fosfora i kalcijuma je jaka i negativna (fosfor: -0,6277^{***} - I period, -0,5465^{**} - II period, kalcijum: -0,3041 - I period, -0,3978^{*} - II period). Posledično,

može se zaključiti da ovi parametri stoje u obrnuto proporcionalnom odnosu, pa se smanjivanjem neorganskog fosfora u obroku, procenat prividne svarljivosti povećava, kao posledica uključivanja homeostatskih mehanizama u stanjima deficita u organizmu. Posmatrani ogledni periodi (I period 11 - 26. dana i II period 25 - 30. dana) nisu pokazali značajne razlike međusobno, kako su pilad u obe faze u intezivnom rastu, pa su i osetljiva na nutritivne deficijencije u oba uzrasna perioda.

Povećanje količine apsorbovanog fosfora iz hrane dovodi do povećanja telesne mase ($0,7754^{****}$ - I period, $0,6296^{****}$ - II period) i prirasta piladi ($0,7723^{****}$ - I period, $0,4177^{****}$ - II period). Uzimajući u obzir značajne metaboličke uloge fosfora, njegov deficit vodi ka smanjenju procesa biosinteze i redukciji energetskeg metabolizma, što za posledicu ima smanjenje porasta organizma, što je kod brojlerske piladi posebno izraženo kao posledica intenzivnog i brzog telesnog rasta i razvoja. Slična povezanost ustanovljena je i između količine apsorbovanog fosfora i konzumacije hrane ($0,9463^{****}$ - I period, $0,7385$ II period), dok je u odnosu na konverziju zabeležena negativna korelaciona veza ($-0,5774^{****}$ - I period, $-0,2509^{****}$ - II period).

Posmatrajući proizvodne rezultate zbirno, može se podvući da su pilad kontrolne grupe brojlera, sa redukovanim nivoom fosfora u hrani, postigla slabiji prirast, uz istovremeno slabije iskorišćavanje hrane. Redukcija negativnih efekata na telesni razvoj, a samim tim i proizvodne performanse, postignuta je dodavanjem monokalcijum fosfata kao izvora neorganskog fosfora, u obe ogledne grupe - O - I i O - II, sa većim stepenom poboljšanja proizvodnih rezultata kod ogledne grupe O - I, što ukazuje na veću iskoristivost fosfora iz monokalcijum fosfata korišćenog u ishrani piladi ove ogledne grupe.

Sa povećanjem koncentracije ukupnog fosfora u hrani, povećava se čvrstoća kosti, pa je naspram fizičkih osobina kostiju zabeležen pozitivan korelacioni odnos (sila loma $0,5834^*$, gusitna kostiju $0,1803$). Takođe, posmatrajući povezanost sa hemijskim sastavom kostiju zapažena je pozitivna korelaciona veza (r vrednosti : % pepela tibija $0,4341$, % P tibija $0,3911$, % Ca tibija $0,3819$).

Sve karaktersitike za ove dve ispitivane kosti međusobno pokazuju pozitivnu povezanost. Ova veza je ustanovljena za utvrđene procenat pepela tibije i tarzusa ($r =$

0,4519), kao i %P i % Ca (0,3434 i 0,2308, redom), što može ukazivati na senzitivnost obe kosti u utvrđivanju bioiskoristivosti fosfora iz hrane. Shastack (2012) je ustanovio izrazito jak stepen korelcije među procentima pepela za ove dve kosti ($r = 0,94$), kao i sa falangama prstiju, pa navodi da se mogu smatrati jednako senzitivnim u ogleđima svarljivosti fosfora.

Gustina kosti, kao pokazatelj stepena mineralizacije je pozitivno korelisana sa hemijskim sastavom (tibija: $r = 0,2879$ i tarzus: $r = 0,3447$). Umereno jaku vezu između gustine koštanog tkiva izmerene CT-om i sadržaja pepela u kostima ($r: 0,09 - 0,24$) utvrdili su i drugi autori i to kako za tibiju, tako i za femur i humerus, kod brojlera i kokoši nosilja (Saunders-Blades i sar., 2003; Bishop i sar.,2000).

Shastack (2012) je ustanovio vrednosti *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije od 0,748 za tibiju i 0,621 za tarzus, što ukazuje na potencijal upotrebe kompjuterizovane tomografije kao jedne od metoda izbora. Ipak, ovaj autor navodi da kod starijih ptica zbog povećanog deponovanja masti u kostima, preciznost ovog merenja može biti upitna. Postoje tvrdnje da su veće vrednosti gustine koštanog tkiva izmerene CT-om kod starijih jedinki, posledica povećane gustine medularnog dela kosti (McCoy et al., 1996). Sposobnost kompjuterizovane tomografije da razlikuje kortikalni i trabekularni (sa medularnim) delom kosti bi mogla da se upotrebi u ispitivanju ovih tvrdnji (Korver i sar., 2004).

Koncentracija ukupnog fosfora u hrani je pokazala jaku korelacionu vezu sa koncentracijom fosfora ($0,7700^{***}$) i kalcijuma u krvnom serumu ($0,8515^{***}$), što ukazuje na mogućnost ispitivanja ovih parametara u utvrđivanju iskoristivosti fosfora. Ipak, serumske koncentracije mogu biti pod uticajem brojnih drugih faktora, ne samo nutritivnih, pa se uzimaju kao validan parametar samo u uslovima teških deficijencija ili drastičnih razlika u bioiskoristivosti fosfora (Jongbloed and Kemme, 2002).

Karakteristike koštanog tkiva, sveukupno posmatrano, znatno su senzitivnije i pružaju precizniju ocenu mineralnih hraniva, u smislu potencijalno dostupnog fosfora organizmu jedinke, u poređenju sa parametrima krvi i proizvodnim performansama. S' druge strane, ovako dobijene vrednosti su relativne i nisu od praktičnog značaja u formulaciji obroka. Kvalitativne metode, mada pružaju

značajne informacije o pojedinačnom ispitivanom mineralnom izvoru fosfora, ne daju kao kvantitativne (prividna i prava svarljivost) rezultate koji imaju upotrebnu vrednost. Procenti svarljivosti mogu se materijalizovati u smislu korekcije obroka na sadržaj fosfora, što im daje prednost u praktičnoj primeni i od značaja su za proizvođače i odgajivače živine.

Zaključno, može se istaći značaj ispitivanja biološke dostupnosti fosfora iz različitih neorganskih izvora, ne samo u smislu različitog tipa izvora (monkalcijum fosfat, dikalcijum fosfat, dinatrijum fosfat..), već i unutar istog tipa mineralnog hraniva. Varijabilnost usvojivosti fosfora iz različitih komercijano dostupnih monokalcijum fosfata može biti visoka, zavisno od hemijskog sastava, proizvodnog procesa, proizvodne šarže, uslova skladištenja i čuvanja, prisustva nečistoća i sl. Do ovakvih zaključaka su došli i drugi autori (Waibel i sar., 1984; Lima i sar., 1995; Lima i sar., 1997). Ovakva variranja usloviće razlike i u iskoristivosti fosfora iz kompletne smeše. Posledično, poželjno je razviti metodologiju koja će biti standardizovana za oglede ovog tipa, ali i standarizovati formulaciju bazalne hrane, na taj način da dobijeni rezultati imaju primenljivu vrednost u živinarskoj proizvodnji.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u izvedenom ogledu izvedeni su sledeći zaključci:

1. Upotrebom različitih izvora neorganskog fosfora nisu uočeni simptomi poremećaja zdravstvenog stanja kod oglednih grupa brojlera. Pilad hranjena hranom bez dodatog neorganskog izvora fosfora (kontrolna grupa) ispoljila su zaostajanje u rastu. Mortalitet se tokom ogleda kretao u okvirima tehnoloških normativa, bez značajnih razlika među grupama.

2. Grupa brojlera, kod koje je fosfor u hrani poticao isključivo iz biljnih hraniva (kontrolna grupa) imala je statistički značajno lošije proizvodne rezultate (telesna masa, ukupni i dnevni prirast) u odnosu na preostale dve ogledne grupe. Ova grupa nije postigla proizvodne rezultate u skladu sa tehnološkim normativima. Komparacijom proizvodnih rezultata oglednih grupa koje su dobijale hranu sa različitim izvorom fosfora, uočene su statistički signifikantno bolje proizvodne performanse kod ogledne grupe I. Ukupna i dnevna konzumacija hrane bila je najveća a konverzija najmanja kod ogledne I grupe.

3. Ogledne grupe piladi u posmatranim uzrasnim periodima (od 11 - 15. dana i od 25 - 29. dana starosti) imale su značajno veći dnevni unos kalcijuma i fosfora, u odnosu na kontrolnu grupu piladi. U II uzrasnom periodu I ogledna grupa imala je statistički značajno veći dnevni unos kalcijuma u odnosu na II oglednu grupu što nije utvrđeno u I uzrasnom periodu. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u unosu fosfora između oglednih grupa brojlera u I i II uzrasnom periodu.

Količina dnevno apsorbiranog fosfora i kalcijuma, kao i količina dnevnog izlučenog fosfora i kalcijuma fecesom kod oglednih grupa brojlera bila je statistički značajno veća u odnosu na grupu brojlera hranjenu hranom bez neorganskog izvora fosfora.

Utvrđeni trend promene ali bez statistički značajnih razlika između oglednih grupa brojlera, je ukazao na veći stepen apsorpcije fosfora i kalcijuma, kao i manji nivo izlučivanja ovih minerala fecesom kod I ogledne grupe.

4. Utvrđivanjem prave i prividne svarljivosti fosfora, kao i prividne svarljivosti kalcijuma iz kompletnih smeša ustanovljena je najveća biološka dostupnost ovih mineralnih materija kod piladi ogledne I grupe. Poređenjem prave i prividne iskoristivosti fosfora i kalcijuma u dva različita uzrasna perioda brojlera nisu ustanovljene statistički značajne razlike.

5. Uključivanje mineralnog izvora fosfora u hranu dovelo je do značajno većih koncentracija fosfora i kalcijuma u krvnom serumu oglednih grupa piladi, u poređenju sa grupom piladi hranjenom smešom bez dodatog mineralnog hraniva (kontrolna grupa). Nasuprot ovome, aktivnost alkalne fosfataze u krvnom serumu nije se statistički značajno razlikovala između poređenih grupa brojlera.

6. Utvrđen je statistički značajno veći prosečan sadržaj pepela, u tibiji, kod oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Prosečan sadržaj kalcijuma kod O II grupe, a prosečan sadržaj fosfora kod O I grupe je bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu.

Prosečan sadržaj pepela, fosfora i kalcijuma u tarzusu nije se statistički razlikovao između poređenih grupa brojlera.

7. Biomehaničkim ispitivanjima utvrđeno je da je sila loma tibije bila statistički značajno veća kod oglednih grupa brojlera u odnosu na kontrolnu grupu, a sila loma tarzusa bila je statistički značajno veća kod ogledne I grupe u odnosu na kontrolnu grupu brojlera, ali se nije značajno razlikovala od sile loma tarzusa O II grupe. Takođe nije utvrđena statistički značajna razlika između sile loma O II i kontrolne grupe brojlera.

8. Morfometrijskom analizom kostiju nisu utvrđene statistički značajne razlike između površina ukupnog poprečnog preseka dijafize, površina preseka medularne šupljine kao i površine preseka korteksa dijafize. Mase sirovih kostiju (tibije i tarzusa) oglednih grupa brojlera bile su veće u odnosu na kontrolnu grupu s tim da su mase tibije O II grupe, odnosno tarzusa O I bile i satistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu.

8. Rentgenografskim ispitivanjima makrostrukture prvog reda uočen je najveći stepen osifikacije kod piladi I ogledne grupe.

Prosečne dužine dijafiza obe ispitivane kosti su bile statistički značajno veće kod oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu, dok je širina kompakte bila veća samo kod tarzusa ogledne I grupe u odnosu na kontrolnu grupu.

Kompjuterizovanom tomografijom ustanovljena je najveća gustina koštanog tkiva na kostima piladi I ogledne grupe, koja je bila i statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu. Kod iste grupe jedinki izmerene su i najveće: dužine kostiju, površine poprečnih preseka, kao i udeli kortikalne kosti u ukupnim površinama poprečnih preseka. Stepenn mineralizacije koštanog tkiva bio je najveći kod piladi ove grupe.

10. Visoki i pozitivni stepeni korelacije ustanovljen između količine ukupnog fosfora u hrani i količine apsorbovanog fosfora, kao i ispitivanih parametara kostiju i krvnog seruma, ukazuju na direktno proporcionalnu vezu između ovih parametara, dok je negativan korelacioni koeficijent ukupnog sadržaja fosfora u obroku i procenata svarljivosti posledica uključivanja homeostatskih mehanizama u uslovima deficita fosfora u hrani.

11. Dobijeni rezultati ukazuju da je monokalcijum fosfat korišćen u ishrani I ogledne grupe pokazao veći stepen biološke dostupnosti fosfora i ima potencijalne benefite kao izvor fosfora u odnosu na monokalcijum fosfat korišćen u ishrani brojlera II ogledne grupe.

8. SPISAK LITERATURE

1. Adeola, O., Walk, C. L. (2013). Linking ileal digestible phosphorus and bone mineralization in broiler chickens fed diets supplemented with phytase and highly soluble calcium. *Poultry Science*, 92: 2109-2117.
2. AEC Tables (1993). Recommendation for Animal Nutrition. 6th Edition, Rhone - Poulenc, France.
3. Akinmusire, A.S., Adeola, O. (2009). True digestibility of phosphorus in canola and soybean meals for growing pigs: influence of microbial phytase. *Journal of Animal Science*, 87: 977-983.
4. Aksakal, D.H., Bilal, T. (2002). Effects Of microbial phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on the absorption of minerals from broiler chicken diets containing different levels of calcium. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50: 307-313.
5. Alvaro, D., Cantafora, A., Attili, A.F., Corradini, S.G., Luca, C.D. (1986). Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry*, 83:551-554.
6. Ammerman, C. B. (1995). Methods for estimation of mineral bioavailability. Pages 83-94 in: *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals, and Vitamins*. C. B. Ammerman, D. H. Baker, and A. J. Lewis (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, CA.
7. Ammerman, C. B., Douglas, C.R., Davis, G. K., Harms, R.H. (1961). Comparison of phosphorus availability assay techniques for chicks. *Poultry Science*, 40:548-553.
8. Angel, R., Saylor, W.W., Mitchell, A.D., Powers, W., Applegate, T.J. (2006). Effect of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on broiler chicken bone mineralization, litter phosphorus, and processing yields. *Poultry Science*, 85:1200-1211.

9. Angel, R., Tamim, N.M., Applegate, T.J., Dhandu, A.S., Ellestad, L.E. (2002). Phytic acid chemistry: influence on phytin- phosphorus availability and phytase efficacy. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11, 471–480.
10. Anđelković, Z., Somer, Lj., Matavulj, M., Lačković, V., Lalošević, D., Nikolić, I., Milosavljević, Z., Danilović, V. (2002). Čelija i tkiva. GIP “Bonafides” doo, Niš.
11. Applegate, T.J., Angel, R., Classen, H.L. (2003). Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, or bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. *Poultry Science*, 82:1140-1148.
12. Auman, S.K. (2003). Increasing Dietary Phosphorus Retention and Decreasing Fecal Phosphate Excretion in Modern Commercial Broilers. PhD Diss. Univ. North Carolina, Raleigh.
13. Ballam, G.C., Nelson, T.S., Kirby, L.K. (1984). Effect of fiber and phytate source and calcium and phosphorus level on phytate hydrolysis in the chick. *Poultry science*, 63: 333 – 338.
14. Bergwitz, C., Jupner, H. (2010). Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D and FGF23. *Annual review of medicine*, 61: 91 – 104.
15. Berndt, T., Kumar, R. (2009). Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology*, 24: 17 – 25.
16. Biehl, R.R., Baker, D.H. (1997). Utilisation of phytate and nonphytate phosphorus in chicks as affected by source and amount of vitamin D3. *Journal of Animal Science*, 75:2986-2993.
17. Biehl, R.R., Baker, D.H., Deluca, H.F. (1995). 1 α -hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilisation in chicks fed soy-based diets. *Journal of Nutrition*, 125:2407-2416.
18. Bishop, S.C., Fleming, R.H., McCormack, H.A., Flock, D.K., Whitehead, C.C. (2000). Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. *Br. Poultry Science*, 41:33–40.
19. Boskey, A.L., Wright, T.M., Blank, R.D. (1999). Collagen and bone strength. *J. Bone Miner. Res*, 14:330–335.

20. Breves, G., Schroder, B. (1991). Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutrition research reviews*, 4: 125 – 140.
21. Burnell, T.W., Cronwell, G.L., Stahly, T.S. (1990). Effect of particle size on the biological availability of calcium and phosphorus in deflurinated phosphate for chicks. *Poultry Science*, 69:1110-1117.
22. Cardoso Júnior, A., Rodrigues, P.B., Bertechini, A.G., Fonseca de Freitas, R.T., Ribeiro de Lima, R., Resende Lima, G.F. (2010). Levels of available phosphorus and calcium for broilers from 8 to 35 days of age fed rations containing phytase. *R. Bras. Zootec.*, 39 (6): 1237-1245.
23. Carlos, A.B., Edwards, H.M.Jr. (1998). The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilisation by laying hens. *Poultry Science*, 77:850-858.
24. Chang, C.W. (1967). Study of phytase and fluoride effects in germinating corn seeds. *Cereal Chemistry*, 44:129-142.
25. Chen, X., Moran, E.T. (1995). The withdrawal feed of broilers: Carcass responses to dietary phosphorus. *J. Appl. Poult. Res*, 4:69-82.
26. Cheryan, M. (1980) Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,13:297-335.
27. Chung, T.K., Baker, D.H. (1990). Phosphorus utilization in chicks fed hydrated sodium calcium aluminosilicate. *J. Anim. Sci*, 68:1992-1998.
28. Cobb 500 Nutrition guide http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/cobb500guides/Cobb500_Broiler_Performance_And_Nutrition_Supplement.pdf
29. Coon, C., Leske, K., Seo, S. (2002). The availability of calcium and phosphorus in feedstuffs. Pages 151-179 in *Poultry Feedstuffs: Supply, composition and nutritive value*. J. M. McNab and K. N. Boorman (eds.). CABI Pub, New York.
30. Coon, C.N., Seo, S., Manangi, M.K. (2007). The determination of retainable phosphorus, relative biological availability, and relative biological value of phosphorus sources for broilers. *Poultry Science*, 86:857-868.
31. Cooper, G.M. (2000). *The Cell-A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Association, Sunderland, MA.

32. Coffey, R.D., Mooney, K.W., Cromwell, G.L., Aaron, D.K. (1994). Biological availability of phosphorus in defluorinated phosphates with different phosphorus solubilities in neutral ammonium citrate for chicks and pigs. *J. Anim. Sci*, 72:2653-2660.
33. Cowieson, A.J., Acamovic, T., Bedford, M.R. (2006). Phytic acid and phytase: Implication for protein utilisation by poultry. *Poultry Science*, 85:878_885.
34. Cowieson, A.J., Ruckebusch, J.P., Knap, I., Guggenbuhl, P., Fru-Nji, F. (2016). Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 222:180-189.
35. Cowieson, A.J., Wilcock, P., Bedford, M.R. (2011). Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *Worlds Poultry Science Journal*, 67:225-236.
36. Cross, K., Dodds, P., Noble, R., McCartney, R., Connor, K. (1987). Effects of age and diet on the lipid content and composition of gallbladder bile, liver and serum in laying strains of hen. *British Poultry Science*, 28:577-584.
37. Danisi, G., Straub, R.W. (1980). Unidirectional influx of phosphate across the mucosal membrane of rabbit intestine. *European journal of physiology*, 385: 117 - 122.
38. Davis, N.T., Olpin, S.E. (1979). Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. *Br. J. Nut*, 41: 590 - 604.
39. Davies, M.I., Ritcey, G.M., Motzok I. (1970). Intestinal phytase and alkaline phosphatase of chicks: influence of dietary calcium, inorganic and phytate phosphorus and vitamin D3. *Poultry Science*, 49:1280-1286.
40. Davies, K.M., Rafferty, K., Heaney, R.P. (2004). Determinants of endogenous calcium entry into the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80:919-923.
41. Day, E.J., McNaughton, J., Dilworth, B.C. (1973). Chemical versus chick bio assay for phosphorus availability of feed grade sources. *Poultry Science*, 52:393-395.
42. De Groote, G., Lippens, M. (2002). Phosphorus bioavailability for poultry. In *Bioavailability of Major and Trace elements*. A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, G. De Groote, M. Lippens, and F. Meschy, ed. International Association of the European (EU) Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials, Brussels, Belgium, pp 43 - 48.

43. de Carvalho Mello, H.H., Gomes, P.C., Rostagno, H.C., Teixeira Albino, L.F., da Rocha, T.C., de Almeida, R.L., Calderano, A.A. (2012). Dietary requirements of available phosphorus in growing broiler chickens at a constant calcium:available phosphorus ratio. *Revista Brasileira de Zootecnica.*, 41 (11): 2323-2328.
44. Díaz-Castro, J., Alférez, M.J., López-Aliaga, I., Nestares, T., Sánchez-Alcover, A., Campos, M.S. (2013). Bile composition, plasma lipids and oxidative hepatic damage induced by calcium supplementation; effects of goat or cow milk consumption. *Journal of Dairy Research*, 80:246-254.
45. Dilger, R.N., Adeola, O. (2006). Estimation of True Phosphorus Digestibility and Endogenous Phosphorus Loss in Growing Chicks Fed Conventional and Low-Phytate Soybean Meals. *Poultry Science*, 85, 661–668.
46. Edwards, H.M.Jr. (1983). Phosphorus. 1. Effect of breed and strain on utilization of suboptimal levels of phosphorus in the ration. *Poultry Science*, 62:77-84.
47. Edwards, H.M.Jr. (1993). Dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *Journal of Nutrition*, 123:567-577.
48. Eeckhout, W., De Paepe, M. (1991). The quantitative effects of an industrial microbial phytase and wheat phytase on the apparent phosphorus absorbability of a mixed feed by piglets. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, 56:1643-1647.
49. Eeckhout, W., De Paepe, M. (1994). Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 47:19-29.
50. Fan, M.Z., Archbold, T., Sauer, W.C., Lackeyram, D., Rideout, T., Gao, Y., Lange, F.M.D., Hacker, R.R. (2001). Novel methodology allows simultaneous measurement of true phosphorus digestibility and the gastrointestinal endogenous phosphorus outputs in studies with pigs. *Journal of Nutrition*, 131:2388-2396.
51. Fang, R.J., Yin, Y.L., Wang, K.N., He, J.H., Chen, Q.H., Li, T.J., Fan, M.Z., Wu, G. (2007). Comparison of the regression analysis technique and the substitution method for the determination of true phosphorus digestibility and faecal endogenous phosphorus losses associated with feed ingredients for growing pigs. *Livestock Science*, 109:251- 254.

52. Favus, M.J., Bushinsky, D., Lemann, J.J. (2006). Regulation of calcium, magnesium and phosphate metabolism, in M.J. Favus (Ed), Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, American Society for bone and mineral research, Washington DC. pp 76 - 83.
53. Fernandes, J. I. M., Lima, F.R., Mendonca, C.X.Jr., Mabe, I., Albuquerque, R., Leal, P.M. (1999). Relative bioavailability of phosphorus in feed and agricultural phosphates for poultry. *Poultry Science*, 78:1729-1736.
54. Field, R.A., Riley, M.L., Mello, F.C., Corbridge, M.H, Kotula, A.W. (1974). Bone composition in cattle, pigs, sheep and poultry. *J. Anim. Sci*, 39:493-499.
55. Fleming, R.H., Korver, D.R., McCormack, H., Whitehead, C.C. (2004). Assessing bone mineral density in vivo: Digitized fluoroscopy and ultrasound. *Poultry Science*, 83:207-214.
56. Fleming, R.H., McCormack, H.A., Whitehead, C.C. (2000). Prediction of breaking strength in osteoporotic avian bone using digitized fluoroscopy, a low cost radiographic technique. *Calcif. Tissue Int*, 67:309-313.
57. Gardiner, E.E. (1962). The relationship between dietary phosphorus level and the level of plasma inorganic phosphorus of chicks. *Poultry Science*, 41:1156-1163.
58. Garcia, A.R., Dale, N. (2006). Foot ash as a means of quantifying bone mineralization in chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, 15:103-109.
59. Ghishan, F.K., Jenkins, J.T., Younoszai, M.K. (1980). Maturation of calcium transport in the rat small and large intestine. *Journal of Nutrition*, 110:1622-1628.
60. Gibson, D.M., Ullah, A.H. (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260: 503-513.
61. Gillis, M.B., Edwards, H.M. Jr., Young, R.J. (1962). Studies on the availability of calcium orthophosphates to chickens and turkeys. *J. Nutr*, 78:155-161.
62. Gillis, M.B., Norris, L.C., Heuser, G.F. (1948). The utilization by the chick of phosphorus from different sources. *J. Nutr*, 35:195-207.
63. Gillis, M.B., Norris, L.C., Heuser, G.F. (1954). Studies on the biological value of inorganic phosphates. *J. Nutr*, 52:115-125.

64. Gleeson, D., Murphy, G., Dowling, R. (1990). Calcium binding by bile acids: in vitro studies using a calcium ion electrode. *Journal of Lipid Research*, 31:781-791.
65. Godoy, S., Meschy, F. (2001). Utilisation of phytate phosphorus by rumen bacteria in a semi-continuous culture system (Rusitec) in lactating goats fed on different forage to concentrate ratios. *Reproduction Nutrition Development*, 41:259-265.
66. Godoy, S., Chicco, C., Meshy, F., Requena, F. (2005). Phytic phosphorus and phytase activity in animal and feed ingredient. *Interciencia*, 30: 24 – 28.
67. Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K.D. (1998). Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food Biochemistry*, 22: 143-161.
68. Greiner, R., Farouk, A., Alminger, M.L., Carlsson, N.G. (2002). The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 986-994.
69. Greiner, R., Carlsson, N.G., Alminger, M.L. (2000). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytase of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 84: 53-62.
70. Gueguen, L. (1999). Determination of dietary phosphorus availability. Pages 163-172 in *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management*. M. B. Coelho and E. T. Kornegay, ed. BASF Reference Manual, Mount Olive, NJ.
71. Hamdi, M., L'opez-Verg'e, S., Manzanilla, E.G., Barroeta, A.C., P'erez, J.F. (2015). Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poultry Science*, 94:2144-2151.
72. Hara, A., Ebina, S., Kondo, A., Funaguma, T. (1985). A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 3539-3544.
73. Hayakawa, T., Suzuki, K., Miura, H., Ohno, T., Igaue, I. (1990). Myo-inositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid phosphates with phytase activity from ricebran. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 279-286.
74. Hayes, S.H., Cromwell, G.L., Stahly, T.S., Johnson, T.H. (1979). Availability of phosphorus in corn, wheat and barley for the chick. *J. Anim. Sci*, 49:992-999.

75. Hemme, A., Spark, M., Wolf, P., Paschertz, H., Kamphues, J. (2005). Effects of different phosphorus sources in the diet on bone composition and stability (breaking strength) in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89:129-133.
76. Hester, P.Y., Schreiweis, M.A., Orban, J.I., Mazzuco, H., Kopka, M.N., Ledur, M.C., Moody, D.E. (2004). Assessing bone mineral density in vivo: Dual energy X-ray absorptiometry. *Poultry Science*, 83:215-221.
77. Hu, H., Wise, A., Henderson, C. (1996). Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig. *Nutrition Research*, 16:781-787.
78. Hurwitz, S. (1964). Estimation of net phosphorus utilization by the slope method. *J. Nutr*, 84: 83-91.
79. Hurwitz, S., Bar, A. (1971). Calcium and phosphorus interrelationships in the intestine of fowl. *Journal of Nutrition*, 101:677-686.
80. Hurwitz, S., Bar, A. (1972). Site of vitamin D action in chick intestine. *American Journal of Physiology*, 222:761-767.
81. Huyghebaert, G., De Groote, G., Keppens, L. (1980). The relative biological availability of phosphorus in feed phosphates for broilers. *Ann. Zootec.*, 29:245-253.
82. IFP (2006). Inorganic Feed Phosphates sector group of CEFIC. Evaluating feed phosphates. http://www.feedphosphates.org/guide/evaluating_feed_phosphates.html. Accessed Aug. 2011.
83. INRA-AFZ, (2004). Tables of composition and nutritional value of feed materials; pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish. In: Sauvant D, Perez JM, Tran G, editors. INRA-AFZ. Netherlands: Wageningen Academic Publishers; pp. 13-300.
84. Islam, K.M.S., Schaeublin, H., Wenk, C., Wanner, M., Liesegang, A. (2012). Effect of dietary citric acid on the performance and mineral metabolism of broiler. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96: 808-817.
85. Jacyna, M. (1990). Interactions between gall bladder bile and mucosa; relevance to gall stone formation. *Gut*, 31:568-570.
86. Janković, Ž., Palić, D. (1972). Anatomija domaćih životinja (*Osteologia i Myologia*). Odbor za izdavačku delatnost Saveza veterinara i veterinarskih tehničara SFRJ, Beograd.

87. Jiang, X.R., Luo, F.H., Wu, S.G., Zhang, H.J., Bontempo, V., Qu, M.R., Yue, H.Y., Qi, G.H. (2015). Effect of phytase supplementation on apparent phosphorus digestibility and phosphorus output in broiler chicks fed low-phosphorus diets. *Int. J. of Health, Animal science and Food safety*, 2 (1):9 - 17.
88. Jongbloed, A.W., Kemme, P.A. (1990). Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 28:233-242.
89. Jongbloed, A.W., Kemme, P.A. (2002). Terms and Methods to assess and evaluate the bioavailability of minerals for livestock: a general introduction. Pages 5-16 in *Bioavailability of major and trace elements* (Jongbloed, A. W., P. A. Kemme, G. De Groote, M. Lippens, and F. Meschy). EMFEMA, Brussels, Belgium.
90. Kerr, M.J., Classen, H.L., Newkirk, R.W. (2000). The effects of gastrointestinal tract micro-flora and dietary phytase on inositol hexaphosphate hydrolysis in the chicken. *Poultry Science*, 79 (suppl.1), 11 (Abstract).
91. Ketels, E., De Groote, G. (1988). The relative bioavailability and the ileal digestibility of phosphorus in mineral and animal sources. *Proc. 18th World's Poult. Congress - Nagoya*, pp. 873-874.
92. Korver, D.R., Saunders-Blades, J.L., Nadeau, K.L. (2004). Assessing bone mineral density in vivo: Quantitative computed tomography. *Poultry Science*, 83:222-229.
93. Kornegay, E.T. (2001). Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity, in: M.R. Bedford and G.G. Partridge (Eds.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 237- 271.
94. Lemme, A., Ravindran, V., Bryden, W.L. (2004). Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*, 60:423-438.
95. Leske, K., Coon, C. (2002). The development of feedstuff retainable phosphorus values for broilers. *Poultry Science*, 81:1681-1693.
96. Levi, M., Popovtzer, M. (1999). Disorders of phosphate balance, in: R.W. Schrier, T. Berl and J.V. Bonventre (Eds.), *Atlas of Diseases of the Kidney*, Current Medicine, Inc., Philadelphia, PA. pp. 7.1-7.14

97. Leytem, A.B., Thacker, P.A., Turner, B.L. (2007). Phosphorus characterization in feces from broiler chicks fed low-phytate barley diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1459 – 1501.
98. Li, J., Yuan, J., Miao, Z., Song, Z., Yang, Y., Tian, W., Guo, Y. (2016). Effect of Dietary Nutrient Density on Small Intestinal Phosphate Transport and Bone Mineralization of Broilers during the Growing Period. *PLoS ONE* 11(4): e0153859. doi:10.1371/journal.pone.0153859
99. Li, W., Angel, R., Kim, S.-W., Jim´enez-Moreno, E., Proszkowiec-Weglarz, M., Plumstead, P. W. (2015). Impact of response criteria (tibia ash weight vs. percent) on phytase relative non phytate phosphorus equivalence. *Poultry Science*, 94:2228–2234.
100. Li, X.-K., Wang, J.-Z., Zhang, C.-H., Li, X., Tang, C.-H. (2015). Content and distribution of different phosphorus forms in broiler chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100: 271–278.
101. Liebert, F., Htoo, J.K., Sünder, A. (2005). Performance and nutrient utilization of laying hens fed low phosphorus corn-soybean and wheat-soybean diets supplemented with microbial phytase. *Poultry Science*, 84:1576-1583.
102. Lima, F.R., Mendonca, C.X. Jr., Alvarez, J.C., Garzillo, J.M.F., Ghion, E., Leal, P.M. (1997). Biological evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poultry Science*, 76:1707-1713.
103. Lima, F.R., Mendonca, C.X. Jr., Alvarez, J.C., Ratti, G., Lenharo, S.L.R., Kahn, H., Garzillo, J.M.F. (1995). Chemical and physical evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of phosphorus in animal nutrition. *Poultry Science*, 74:1659-1670.
104. Liu, J., Bollinger, D.W., Ledoux, D.R., Veum, T.L. (2000). Effects of dietary calcium:phosphorus ratios on apparent absorption of calcium and phosphorus in the small intestine, cecum, and colon of pigs. *Journal of Animal Science*, 78:106-109.
105. Liu, S.B., Li, S.F., Lu, L., Xie, J.J., Zhang, L.Y., Luo, X.G. (2012). Estimation of standardized phosphorus retention for corn, soybean meal, and corn-soybean meal diet in broilers. *Poultry Science*, 9: 1879–1885.

106. Liu, J.B., Cao, S.C., Chen, L., Zhang, H.F. (2016). Effect of dietary phosphorus level on the determination of standardized and true total tract digestibility of phosphorus for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 215: 117-123.
107. Liu, J.B., Chen, D.W., Adeola, O. (2013a). Phosphorus digestibility response of broiler chickens to dietary calcium-to-phosphorus ratios. *Poultry Science*, 92: 1572-1578.
108. Liu, S.B., Xie, J.J., Lu, L., Li, S.F., Zhang, L.Y., Jiang, Y., Luo, X.G. (2013b). Estimation of standardized phosphorus retention for inorganic phosphate sources in broilers. *Journal of Animal Science*, 91: 3766-3771.
109. Lukić, M. (2001). Uticaj fitaze u ishrani brojlera na proizvodne rezultate i zdravstveno stanje. Magistarska teza. Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
110. Maddaiah, V.T., Kurnick, A.A., Hulett, B.J., Reid, B.L. (1964). Nature of intestinal phytase activity. *Experimental Biology and Medicine*, 115:1054-1057.
111. Maenz, D.D., Classen, H.L. (1998). Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of chicken. *Poultry Science*, 77:557-563.
112. Mahajan, A., Dua, S. (1997). Nonchemical approach for reducing antinutritional factors in rapeseed (*Brasica campestris* Var. Toria) and characterisation of enzyme phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:2504-25
113. Maller, A., Oliveira de Quadros, T.C., Junqueira, O.M., Graña, A.L., de Lima Montaldi, A.P., Alarcon, R.F., Jorge, J.A. de Lourdes, T.M., Polizeli, M. (2016). Biochemical effect of a histidine phosphatase acid (phytase) of *Aspergillus japonicus* var. Saito on performance and bony characteristics of broiler. *SpringerPlus*, 5:1418.
114. Manangi, M.K., Coon, C.N. (2006). Phosphorus utilization and environmental concerns. Pages 97-111 in Proc. 4th Mid-Atlantic Nutr. Conf. N. G. Zimmermann, ed. Univ. Maryland, College Park, MD.
115. Marks, J., Debnam, E.S., Unwin, R.J. (2010). Phosphate homeostasis and the renal - gastrointestinal axis. *American Journal of Physiology - Renal physiology*, 299: 285 - 296.

116. Marounek, M., Skrivan, M., Rosero, O., Rop, O. (2010). Intestinal and total tract phytate digestibility and phytase activity in the digestive tract of hens fed a wheat-maize-soybean diet. *Journal of animal and food sciences*, 19: 430 - 439.
117. Matsumoto, T., Fontaine, O., Rasmussen, H. (1980). Effect of 1,25 - dihydroxyvitamin D-3 on phosphate uptake into chick intestinal brush border membrane vesicles. *Biochimica and Biophysica Acta*, 599: 13 - 23.
118. Matyka, S., Korol, W., Bogusz, G. (1990). The retention of phytin phosphorus from diets with fat supplements in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 31:223- 230.
119. Mašić, B., Antonijević, N., Vitorović, D., Pavlovski, Z., Milošević, N., Jastšenjski, S. (1985). Prilog određivanju čvrstoće kostiju pilića. *Peradstvo*, 8 - 9: 19 - 24.
120. McCuaig, L., Davies, M.I., Motzok, I. (1972). Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: effect of dietary magnesium, calcium, phosphorus and thyroactive casein. *Poultry Science*, 51:526-530.
121. McCuaig L.W., Motzok I. (1972). Regulation of intestinal phosphatase by dietary phosphate. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 50:1152-1156.
122. McCoy, M.A., Reilly, G.A.C., Kilpatrick, D.J. (1996). Density and breaking strength of bones of mortalities among caged layers. *Res. Vet. Sci*, 60:185-186.
123. Mc Dowell, L.R. (2003). *Minerals in animal and human nutrition*. Academic press, Inc, California, USA.
124. Mehmood, T., Chaudhry, M., Tufail, M., Irfan, N. (2009). Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchemical Journal*, 91:94-99.
125. Mendez, A., Dale, N. (1998). Foot ash as a parameter to assay bone mineralization. *Poultry Science*, 77 (Suppl. 1):40.
126. Meyer, G.B., Babcock, S.W., Sunde, M.L. (1968). An accurate *in vivo* technique for measuring bone mineral mass in chickens. *J. Nutr*, 96:195-205.
127. Mitchell, R.D., Edwards, H.M.Jr. (1996). Effects Of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilisation and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. *Poultry Science*, 75:95-110.

128. Mohammed, A., Gibney, M.J., Taylor, T.G. (1991). The effects of dietary levels of inorganic phosphorus, calcium and cholecalciferol on the digestibility of phytate phosphorus by the chick. *British Journal of Nutrition*, 66: 251 - 259.
129. Mongin, P. (1981). Recent advances in dietary anion-cation balance: application in poultry. *Proceedings of the Nutrition Society* 40: 285-294.
130. Moore E.W. (1984). The role of calcium in the pathogenesis of gallstones: Ca⁺⁺ electrode studies of model bile salt solutions and other biologic systems. *Hepatology*, 4:228S-243S.
131. Moran, E.T.Jr., Todd, M.C. (1994). Continuous submarginal phosphorus with broilers and the effect of preslaughter transportation: Carcass defects, further-processing yields, and tibia-femur integrity. *Poultry Science*, 73:1448-1457.
132. Morris, E.R. (1986). Phytate and dietary mineral bioavailability. In: E. D. Graf (ed.), *Phytic Acid Chemistry and Applications*. Pilatus Press, Minneapolis, MN, pp.57.
133. Motzok, I., Arthur, D., Branion, H.D. (1956). Utilization of phosphorus from various phosphate supplements by chicks. *Poultry Science*, 35:627-649.
134. Mutucumarana, R.K., Ravindran, V., Ravindran, G., Cowieson, A.J. (2014). Measurement of true ileal phosphorus digestibility in meat and bone meal for broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 92: 5520-5529.
135. Mutucumarana, R.K., Ravindrana, V., Ravindran, G., Cowiesonc, A.J. (2015). Measurement of true ileal phosphorus digestibility in maize and soybean meal for broiler chickens: Comparison of two methodologies. *Animal Feed Science and Technology*, 206: 76-86.
136. Nahm, K.H. (2007). Efficient phosphorus utilization in poultry feeding to lessen the environmental impact of excreta. *Worlds poultry science journal*, 63: 625 - 654.
137. Namgung, R.A.N., Tsang, R.C. (2011). Neonatal calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis, in: R.A. Polin, W.W. Fox and S.H. Abman (Eds.), *Fetal and Neonatal Physiology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. pp. 384-402.
138. Nelson, T.S. (1976). The hydrolysis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. *Poultry Science*, 55:2262-2264.

139. Nelson, T.S., Kirby, L.K. (1987). The calcium binding properties of natural phytate in chick diets. *Nutrition Reports International*, 35:949-956.
140. Nelson, T. S., Peeler, H.T. (1961). The availability of phosphorus from single and combined phosphates to chicks. *Poultry Science*, 40:1321-1328.
141. Nelson, T.S., Walker, A.C. (1964). The biological evaluation of phosphorus compounds. *Poultry Science*, 43:94-98.
142. Norris D.O. (2007). *Vertebrate endocrinology*. 4th ed. Elsevier Inc., Burlington, MA.
143. NRC - National Research Council (2005). *Mineral tolerance of animals*. 2nd Edition, National Academy of Sciences, Washington D.C.
144. NRC - National Research Council (1994). *Nutrient requirements for poultry*. Ninth revised edition, National Academy of Sciences, Washington D.C.
145. O'Dell, B.L., Boland, A.D., Koirtyhann, S.P. (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20:718-721.
146. Oloffs, K., Cossa, J., Jeroch, H. (2000). The importance of native phytase activity in wheat on the phosphorus utilization in broilers and laying hens. *European Poultry Science*, 64:157-191.
147. Onyango, E.M., Hester, P.Y., Stroshine, R., Adeola, O. (2003). Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. *Poultry Science*, 82:1787-1791.
148. Orban, J.I., Roland, D.A.Sr. (1992). The effect of varying bone meal sources on phosphorus utilization by 3-week-old broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 1:75-83.
149. Orban, J.I., Roland, D.A.Sr., Bryant, M.M., Williams, J.C. (1993). Factors influencing bone mineral content, density, breaking strength, and ash as response criteria for assessing bone quality in chickens. *Poultry Science*, 72:437-446.
150. Partridge, I., Low, A., Sambrook, I., Corring, T. (1982). The influence of diet on the exocrine pancreatic secretion of growing pigs. *British Journal of Nutrition*, 48:137-145.

151. Patwardhan, V.N. (1937). The occurrence of a phytin-splitting enzyme in the intestine of albino rats. *Biochemical Journal*, 31:560-564.
152. Pedersen, C., Boersma, M.G., Stein, H.H. (2007). Digestibility of energy and phosphorus in ten samples of distillers dried grains with solubles fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 85:1168-1176.
153. Petersen, G.I., Stein, H.H. (2006). Novel procedure for estimating endogenous losses and measurement of apparent and true digestibility of phosphorus by growing pigs. *Journal of Animal Science*, 84:2126-2132.
154. Perryman, K.R., Masey O'Neill, H.V., Bedford, M.R., Dozier, W.A. (2016). Effects of calcium feeding strategy on true ileal phosphorus digestibility and true phosphorus retention determined with growing broilers. *Poultry Science*, 95: 1077-1087.
155. Phillippy, B.Q. (1999). Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* phytases to inactivation by gastrointestinal enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1385-1388.
156. Plumstead, P.W., Leytem, A.B., Maguire, R.O., Spears, J.W., Kwanyuen, P., Brake, J. (2008). Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 1. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus. *Poultry Science*, 87:449-458.
157. Pointillart, A., Fourdin, A., Fontaine, N. (1987). Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *Journal of Nutrition*, 117:907-913.
158. Pond, W.G., Church, D.C., Pond, K.R., Schockencht, P.A. (2005). *Basic animal nutrition and feeding*. 5th ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ.
159. Prattley, C.A., Stanley, D.W. (1982). Protein-phytate interactions in soybeans. 1. Localization of phytate in protein bodies and globoids. *Journal of Food Biochemistry*, 6:243-253.
160. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje (2010). „Sl. Gl. RS“ 4/2010.
161. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane (1987), Sl. list SFRJ, 15.

162. Proszkowiec-Weglarz, M., Angel, R. (2013). Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *Journal of Applied Poultry Research*, 22:609–627.
163. Qian, H., Kornegay, E.T., Denbow, D.M. (1997). Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium:total phosphorus ratio in broiler diets. *Poultry Science*, 76:37-46.
164. Rama Rao, S.V., Raju, M.V.L.N., Reddy, M.R. (2007). Performance of broiler chicks fed high levels of cholecalciferol in diets containing sub-optimal levels of calcium and non-phytate phosphorus. *Animal Feed Science and Technology*, 134:77-88.
165. Rama Rao, S.V., Ramasubba Reddy, V., Ravindra Reddy V. (1999). Non-phytin phosphorus requirements of commercial broilers and White Leghorn layers. *Animal Feed Science and Technology*, 80:1-10.
166. Rath, N.C., Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M. (2000). Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poultry Science*, 79:1024–1032.
167. Ravindran, V., Kornegay, E.T., Potter, L.M., Ogunabameru, B.O., Welten, W.K., Wilson, J.H., Potchanakorn, M. (1995a). An evaluation of various response criteria in assessing biological availability of phosphorus for broilers. *Poultry Science*, 74:1820-1830.
168. Ravindran, V., Bryden, W.L., Kornegay, E.T. (1995b). Phytates occurrence bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviewers*, 6: 125 – 143.
169. Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindra, G., Selle, P.H., Bryden, W.L. (2000). Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorous levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *British Poultry Science*, 41:193–200.
170. Rodehutsord, M., Dieckmann, A., (2005). Comparative studies with three-week-old chickens, turkeys, ducks, and quails on the response in phosphorus utilization to a supplementation of monobasic calcium phosphate. *Poultry Science*, 84: 1252–1260.

171. Rodehutsord, M., Dieckmann, A., Witzig, M., Shastak, Y. (2012). A note on sampling digesta from the ileum of broilers in phosphorus digestibility studies. *Poultry Science*, 91: 965–971.
172. Rodehutsord, M., Timmler, R., Wendt, P. (2003). Response of growing Pekin ducks to supplementation of monobasic calcium phosphate to low-phosphorus diets. *Poultry Science*, 82: 309–319.
173. Rowland, L.O.Jr., Harms, R.H., Wilson, H.R., Ross, I.J., Fry, J.L. (1967). Breaking strength of chick bones as an indication of dietary calcium and phosphorus adequacy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 126:399-401.
174. Rush, J.K., Angel, C.R., Banks, K.M., Thompson, K.L., Applegate, T.J. (2005). Effect of dietary calcium and vitamin D3 on calcium and phosphorus retention in white pekin ducklings. *Poultry Science*, 84:561-570.
175. Rutherford, S.M., Chung, T.K., Morel, P.C.H., Moughan, P.J. (2004). Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poultry Science*, 83: 61–68.
176. Rutherford, S.M., Chung, T.K., Moughan, P.J. (2002). The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *British Poultry Science*, 44: 598–606.
177. Sandberg, A.S., Larsen, T., Sandstrom, B. (1993). High dietary calcium level decreases colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet. *Journal of Nutrition*, 123:559- 566.
178. Saunders-Blades, J.L., Korver, D.R., Nadeau, K.L. (2003). Quantitative computed tomography as a tool for assessing bone quality in poultry. *Poultry Science*, 82 (Suppl.1):11. (Abstr.)
179. Schlemmer, U., Jany, K.D., Berk, A., Schulz, E., Rechkemmer, G. (2001). Degradation of phytate in the gut of pigs – pathway of gastrointestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Archives of Animal Nutrition*, 55:255–280.
180. Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R.M., Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53:S330–S375.

181. Schreiweis, M.A., Orban, J.I., Ledur, M.C., Hester, P.Y. (2003). The use of densitometry to detect differences in bone mineral density and content of live White Leghorns fed varying levels of dietary calcium. *Poultry Science*, 82:1292-1301.
182. Schroder, B., Breves, G., Rodehutschord, M. (1996). Mechanisms of intestinal phosphorus absorption and availability of dietary phosphorus in pigs. *Dtsch Tieraztl Wochenschr*, 103: 209 - 214
183. Scott, J.J., Loewus, F.A. (1986). A calcium- activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Physiology*, 82:333-335.
184. Shafey, T.M., McDonald, M.W. (1991). The effects of dietary calcium, phosphorus, and protein on the performance and nutrient utilization of broiler chickens. *Poultry Science*, 70:548-553.
185. Shastak, Y., Rodehutschord, M. (2013). Determination and estimation of phosphorus availability in growing poultry and their historical development. *World's Poultry Science Journal*, 69:569-586
186. Shastak, Y., Witzig, M., Hartung, K., Rodehutschord, M. (2012). Comparison of retention and prececal digestibility measurements in evaluating mineral phosphorus sources in broilers. *Poultry Science*, 91:2201-2209.
187. Shim, M.Y., Karnuah, A.B., Mitchell, A.D., Anthony, N.B., Pesti, G.M., Aggrey, S.E. (2012). The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. *Poultry Science*, 91 :1790-1795.
188. Selle, P.H., Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 135:1-41.
189. Selle, P.H., Ravindran, V. (2008). Phytate degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*, 113: 99-122.
190. Selle, P.H., Cowieson, A.J., Ravindran, V. (2009). Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science*, 124: 126-141.
191. Serdar, M., Katalenić, M. (2005). Količine prirodnog fosfora u mesu peradi. *Meso*, VII (5):40-44.

192. Sinovec, Z., Ševković, N. (1995). Praktikum iz ishrane. Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd.
193. Sklan, D., Budowski, P. (1978). Hydrolysis of biliary phospholipids in the upper small intestine of the chick. *Lipids*, 13:158-160.
194. Snow, J.L., Baker, D.H., Parsons, C.M. (2004). Phytase, citric acid, and 1- α -hydroxycholecalciferol improve phytate phosphorus utilisation in chicks fed a corn-soybean meal based diet. *Poultry Science*, 83:1187-1192.
195. Stein, H.H., Kadzere, C.T., Kim, S.W., Miller, P.S. (2008). Influence of dietary phosphorus concentration on the digestibility of phosphorus in monocalcium phosphate by growing pigs. *Journal of Animal Science*, 86: 1861-1867.
196. Stein, H.H., Boersma, M.G., Pedersen, C. (2006). Apparent and true total tract digestibility of phosphorus in field peas (*Pisum sativum* L.) by growing pigs. *Can. J. Anim. Sci*, 86: 523-525.
197. Steiner, T., Mosenthin, R., Zimmermann, B., Greiner, R., Roth, S. (2007). Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. *Animal Feed Science and Technology*, 133:320-334.
198. Stojić, V. (2010). Veterinarska fiziologija. Naučna KMD, Beograd.
199. Sullivan, T.W., Douglas, J.H., Gonzalez, N.J., Bond, P.L.Jr. (1992). Correlation of biological value of feed phosphates with their solubility in water, dilute hydrogen chloride, dilute citric acid, and neutral ammonium citrate. *Poultry Science*, 71:2065-2074.
200. Summers, J.D., Slinger, S.J., Pepper, W.F., Motzok, I., Ashton, C.C. (1959). Availability of phosphorus in soft phosphate and phosphoric acid and the effect of acidulation of soft phosphate. *Poultry Science*, 38:1168-1179.
201. Sutton, A.L., Radcliffe, S., Joern, B.C. (2004). Overview of phosphorus issues in swine feeding, Swine Odor and Waste management, University of Illinois, Urbana - Champaign, IL.
202. Suzuki, U., Yoshimura, K., Takaishi, M. (1907). Uber ein Enzym ' Phytase' das Anhydro-oxy-methylen-diphosphosäure spaltet. *College of Agriculture Bulletin. Tokyo Imperial University*, 7:503-505.

203. Šefer, D. (2002). Efekat korišćenja fitaze u ishrani prasadi na proizvodne rezultate, iskoristivost fosfora i stepen mineralizacije koštanog tkiva. Doktorska disertacija. Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
204. Šefer, D., Sinovec, Z. (2008). Opšta ishrana. Fakultet Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd.
205. Talaty, P.N., Katanbaf, M.N., Hester, P.Y. (2009). Life cycle changes in bone mineralization and bone size traits of commercial broilers. *Poultry Science*, 88:1070-1077.
206. Tamim, N.M., Angel, R. (2003). Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4687-4693.
207. Tamim, N.M., Angel, R., Christman, M. (2004). Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poultry Science*, 83:1358-1367.
208. Valette, P., Malouin, H., Corring, T., Savoie, L., Gueugneau, A., Berot, S. (1992). Effects of diets containing casein and rapeseed on enzyme secretion from the exocrine pancreas in the pig. *British Journal of Nutrition*, 67:215-222.
209. van der Klis, J.D., Versteegh, H A.J. (1996). Phosphorus nutrition of poultry. Pages 71-83 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy, J. Wiseman and W. Haresign (eds.). Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.
210. van der Klis, J.D., Versteegh, H.A.J., Simons, P.C.M., Kies, A.K. (1997). The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poultry Science*, 76:1535-1542.
211. Vandepopuliere, J. M., Ammerman, C.B., Harms, R.H. (1961). The relationship of calcium-phosphorus ratios to the utilization of plant and inorganic phosphorus by the chick. *Poultry Science*, 40:951-957.
212. Van Kauwenbergh, S. (2010). *World Phosphate Reserves and Resources*, International Fertilizer Development Centre (IFDC), Washington, DC.

213. Vasan, P., Dutta, N., Mandal, A.B., Sharma, K. (2008). Influence of caecetomy on the absorption on the bioavailability of minerals from vegetable protein supplements in adult roosters. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 21:1178-1182.
214. Veum, T.L. (2010). Phosphorus and calcium nutrition and metabolism, in: D.M. S.S. Vitti and E. Kebreab (Eds.), *Phosphorus and Calcium Utilization and Requirements in Farm Animals*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 94-111.
215. Vijayaraghavan, P., Primiya, R.R., Vincent, S.G.P. (2013). Thermostable alkaline phytase from *Alcaligenes* sp. In improving bioavailability of phosphorus in animal feed. *In vitro analysis*. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1-6.
216. Vitorović, D. (1992). *Anatomske karakteristike kostiju i mišića pilića lakog i teškog tipa gajenih na podu i u kavezima*. Doktorska disertacija. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
217. Viveros, A., Brenes, A., Arija, I., Centeno, C. (2002). Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. *Poultry Science*, 81:1172-1183.
218. Waibel, P.E., Nahorniak, N.A., Dziuk, H.E., Walser, M.M., Olson, W.G. (1984). Bioavailability of phosphorus in commercial phosphate supplements for turkeys. *Poultry Science*, 63:730-737.
219. Walk, C.L., Addo-Chidie, E.K., Bedford, M.R., Adeola, O. (2012). Evaluation of a highly soluble calcium source and phytase in the diets of broiler chickens. *Poultry Science*, 91:2255-2263.
220. Wasserman, R.H., Taylor, A.N. (1973). Intestinal absorption of phosphate in the chick: Effect of vitamin D₃ and other parameters. *Journal of Nutrition*, 103:586-599.
221. Wendt, P., Rodehutschord, M. (2004). Investigations on the availability of inorganic phosphate from different sources with growing white Pekin ducks. *Poultry Science*, 83:1572-1579.
222. Weremko, D., Fandrejewski, H., Zebrowska, T., Han, I.K., Kim, J., Cho, W. (1997). Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 10:551-566.
223. Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J. (1996). Phytase. *Advances in Applied Microbiology*, 42:263-303.

224. Woyengo, T.A., Nyachoti, C.M. (2013). Review: Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry – current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci*, 93: 9-21.
225. Woyengo, T.A., Slominski, B.A., Jones, R.O. (2010). Growth performance and nutrient utilization of broiler chickens fed diets supplemented with phytase alone or in combination with citric acid and multicarbohydase. *Poultry Science*, 89:2221–2229.
226. WPSA (2013). Determination of phosphorus availability in poultry. Working group No. 2 (Nutrition) of the European Federation of Branches of WPSA. *World's Poult. Sci. J.*, 69: 687–698.
227. Yamaguchi, M., Katayama, K. (1982). Synthetic [Asu 1, 7] eel calcitonin increases phosphorus content in the hepatic bile of intact and nephrectomized rats. *Endocrinologia Japonica*, 29:401-406.
228. Yan, F., Angel, R., Ashwell, C.M., (2007). Characterization of the chicken small intestine type IIb sodium phosphate co transporter. *Poultry Science*, 86:67 – 76.
229. Yang, H., Li, A.K., Yin, Y.L., Li, T.J., Wang, Z.R., Wu, G., Huang, R.L., Kong, X.F., Yang, C.B., Kang, P., Deng, J., Wang, S.X., Tan, B.E., Hu, Q., Xing, F.F., Wu, X., He, Q.H., Yao, K., Liu, Z.J., Tang, Z.R., Yin, F.G., Deng, Z.Y., Xie, M.Y., Fan, M.Z. (2007). True phosphorus digestibility and the endogenous phosphorus outputs associated with brown rice for weanling pigs measured by the simple linear regression analysis technique. *Animal*, 1:213-220.
230. Yin, Q.Q., Zheng, Q.H., Kang, X.T. (2007). Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. *Animal Feed Science and Technology*, 132:341–350.
231. Yoshida, M., Ishikawa, M., Nakajima, H., Hotta, S. (1979). Solubility of phosphorus in citric acid solution as an index of biological availability. *Jpn. Poult. Sci*, 16:290-292.
232. Yoshida, M., Hoshii H. (1983). Relationship between ash contents of the tibia bone and the toe of chicks. *Jpn. Poult. Sci*, 20:51-54.

233. Zebrowska, T., Low, A., Zebrowska, H. (1983). Studies on gastric digestion of protein and carbohydrate, gastric secretion and exocrine pancreatic secretion in the growing pig. *British Journal of Nutrition*, 49:401-410.
234. Zeller, E., Schollenberger, M., Witzig, M., Shastak, Y., Kuhn, I., Hoelzle, LE., Rodehutschord, M. (2015). Interactions between supplemented mineral phosphorus and phytase on phytate hydrolysis and inositol phosphates in the small intestine of broilers. *Poultry Science*, 94:1018-1029.
235. Zhang, W., Aggrey, S.E., Pesti, G.M., Edwards, H.M.J., Bakalli, R.I. (2003). Genetics of phytate phosphorus bioavailability: Heritability and genetic correlation with growth and feed utilization traits in a randombred chicken population. *Poultry Science*, 82:1075-1079.
236. Zhang, F., Adeola, O. (2017). Techniques for evaluating digestibility of energy, amino acids, phosphorus, and calcium in feed ingredients for pigs. *Animal Nutrition* 3:344 -352.
237. Zyla, K., Koreleski, J., Swiatkiewicz, S., Wikiera, A., Kujawski, M., Piironen, J., Ledoux, D.R. (2000). Effects of phosphorolytic and cell wall degrading enzymes on the performance of growing broilers fed wheat-based diets containing different calcium levels. *Poultry Science*, 79:66-76.

9. PRILOG

Prilog 1 - Telesna masa piladi tokom ogleda, (n=100), [g]

Period ogleda	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv	Iv
1. dan	K	100	47,26	0,26	2,62	5,54%	43,00 - 53,00
	O - I	100	47,62	0,36	3,61	7,59%	37,00 - 61,00
	O - II	100	47,56	0,30	2,99	6,31%	40,00 - 53,00
7. dan	K	100	146,83	1,72	17,21	11,72%	72,00 - 179,00
	O - I	100	154,12	1,54	15,37	9,97%	113,00 - 190,00
	O - II	100	163,81	1,69	16,86	10,29%	111,00 - 203,00
21. dan	K	100	505,16	13,91	131,94	26,12%	195,00 - 821,00
	O - I	100	824,26	7,72	77,22	9,37%	673,00 - 958,00
	O - II	100	853,74	9,68	96,77	11,34%	650,00 - 1021,00
35. dan	K	97	1161,39	34,68	341,55	29,41%	280,00 - 1855,00
	O - I	100	1830,25	21,20	211,96	11,58%	1480,00 - 2525,00
	O - II	99	1873,18	26,38	262,46	14,01%	1430,00 - 2685,00
42. dan	K	96	1741,20	46,39	454,55	26,11%	385,00 - 2550,00
	O - I	100	2519,00	24,91	249,10	9,89%	2100,00 - 3285,00
	O - II	97	2443,25	27,77	273,54	11,20%	2000,00 - 3095,00

Prilog 2 - Ukupni prirast piladi tokom ogleđa, (n=100), [g]

Period ogleđa	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
1. - 7. dan	K	100	99,57	1,68	16,79	16,87	28,00 - 133,00
	O - I	100	106,50	1,64	16,36	15,36	64,00 - 148,00
	O - II	100	116,25	1,69	16,92	14,56	66,00 - 157,00
7. - 21. dan	K	100	358,33	12,92	129,17	36,05	47,00 - 667,00
	O - I	100	670,14	7,70	76,97	11,48	505,00 - 814,00
	O - II	100	689,93	9,74	97,38	14,11	473,00 - 874,00
21. - 35. dan	K	97	652,95	32,69	322,00	49,32	34,00 - 1502,00
	O - I	100	1005,99	23,23	232,30	23,09	561,00 - 1608,00
	O - II	99	1017,87	27,80	276,60	27,17	468,00 - 1664,00
1. - 42. dan	K	96	1693,98	46,38	454,40	26,82	336,00 - 2506,00
	O - I	100	2471,38	24,91	249,13	10,08	2050,00 - 3239,00
	O - II	97	2395,68	27,74	273,20	11,40	1954,00 - 3043,00

Prilog 3 - Dnevni prirast piladi tokom ogleđa, (n=100), [g]

Period ogleđa	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
1. - 7. dan	K	100	14,22	0,24	2,40	16,87	4,00 - 19,00
	O - I	100	15,21	0,23	2,34	15,36	9,14 - 21,14
	O - II	100	16,61	0,24	2,42	14,56	9,43 - 22,43
7. - 21. dan	K	100	25,60	0,92	9,23	36,05	3,36 - 47,64
	O - I	100	47,87	0,55	5,50	11,48	36,07 - 58,14
	O - II	100	49,28	0,69	6,95	14,11	33,79 - 62,43
21. - 35. dan	K	97	46,64	2,33	23,00	49,32	2,43 - 107,30
	O - I	100	71,86	1,66	16,59	23,09	40,07 - 114,90
	O - II	99	72,70	1,99	19,76	27,17	33,43 - 118,90
1. - 42. dan	K	96	40,33	1,10	10,82	26,82	8,00 - 59,67
	O - I	100	58,84	0,59	5,93	10,08	48,81 - 77,12
	O - II	97	57,04	0,66	6,50	11,40	46,52 - 72,45

Prilog 4 - Dnevni unos fosfora i kalcijuma hranom u I uzrasnom periodu, (n=10), [mg/dan]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	246,00	13,25	41,89	17,03	176,00 - 297,00
	O - I	10	598,00	14,50	45,86	7,67	548,00 - 690,00
	O - II	10	595,00	28,98	91,64	15,40	500,00 - 778,00
Kalcijum	K	10	399,00	31,82	100,60	25,22	270,00 - 606,00
	O - I	10	855,00	19,32	61,10	7,15	760,00 - 940,00
	O - II	10	818,00	24,49	77,44	9,47	680,00 - 920,00

Prilog 5 - Dnevni unos fosfora i kalcijuma hranom u II uzrasnom periodu, (n=10), [mg/dan]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	497,00	11,73	37,09	7,46	430,00 - 555,00
	O - I	10	939,00	8,55	27,04	2,88	880,00 - 975,00
	O - II	10	906,00	10,04	31,75	3,50	869,00 - 965,00
Kalcijum	K	10	868,00	11,22	35,49	4,09	815,00 - 920,00
	O - I	10	1471,00	84,53	267,30	18,17	980,00 - 1800,00
	O - II	10	1181,00	55,52	175,60	14,87	950,00 - 1460,00

Prilog 6 - Količina dnevno izlučenog fosfora i kalcijuma fecesom, I period, (n=10), [mg/dan]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	53,20	5,02	15,88	29,85	33,20 - 81,80
	O - I	10	186,30	16,04	50,72	27,23	110,00 - 273,00
	O - II	10	205,20	9,56	30,23	14,73	150,00 - 259,00
Kalcijum	K	10	118,20	13,70	43,32	36,65	77,00 - 217,00
	O - I	10	304,10	23,97	75,78	24,92	174,00 - 405,00
	O - II	10	290,80	19,95	63,07	21,69	234,00 - 442,00

Prilog 7 - Količina dnevno izlučenog fosfora i kalcijuma fecesom, II period, (n=10) [mg/dan]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	99,60	10,91	34,51	34,65	62,00 - 156,00
	O - I	10	283,00	28,71	90,79	32,08	152,00 - 420,00
	O - II	10	298,00	25,26	79,87	26,80	210,00 - 450,00
Kalcijum	K	10	209,74	22,85	72,26	34,46	144,00 - 335,00
	O - I	10	442,50	55,42	175,30	39,61	180,00 - 774,00
	O - II	10	463,00	45,25	143,10	30,90	280,00 - 684,00

Prilog 8 - Količina dnevno apsorbovanog fosfora i kalcijuma, I period, (n=10), [mg/dan]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	192,80	5,08	16,08	8,34	164,00 - 213,00
	O - I	10	411,70	16,04	50,72	12,32	325,00 - 488,00
	O - II	10	389,80	9,56	30,23	7,75	336,00 - 445,00
Kalcijum	K	10	280,80	13,70	43,32	15,43	182,00 - 322,00
	O - I	10	550,90	23,97	75,78	13,76	450,00 - 681,00
	O - II	10	527,20	19,95	63,07	11,96	376,00 - 584,00

Prilog 9 - Količina dnevno apsorbovanog fosfora i kalcijuma, II period, (n=10), [mg/dan]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	395,60	10,36	32,76	8,28	341,00 - 429,00
	O - I	10	656,00	28,71	90,79	13,84	519,00 - 787,00
	O - II	10	608,00	25,26	79,87	13,14	456,00 - 696,00
Kalcijum	K	10	658,30	22,85	72,26	10,98	533,00 - 724,00
	O - I	10	1028,50	55,42	175,30	17,04	697,00 - 1291,00
	O - II	10	718,00	45,25	143,10	19,93	497,00 - 901,00

Prilog 10 – Prividna svarljivost fosfora i kalcijuma, I period, (n=10), [%]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	78,37	2,04	6,45	8,23	66,75 – 86,50
	O – I	10	68,85	2,68	8,48	12,32	54,35 – 81,60
	O – II	10	65,51	1,61	5,08	7,76	56,47 – 74,79
Kalcijum	K	10	70,38	3,43	10,86	15,43	45,61 – 80,70
	O – I	10	64,43	2,80	8,86	13,76	52,63 – 79,65
	O – II	10	64,45	2,44	7,71	11,96	45,97 – 71,39

Prilog 11 - Prividna svarljivost fosfora i kalcijuma, II period, (n=10), [%]

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	10	79,96	2,19	6,94	8,68	68,81 – 87,52
	O – I	10	69,86	3,06	9,67	13,84	55,27 – 83,81
	O – II	10	67,11	2,79	8,82	13,14	50,33 – 76,82
Kalcijum	K	10	75,84	2,63	8,32	10,98	61,40 – 83,41
	O – I	10	69,92	3,77	11,91	17,04	47,38 – 87,76
	O – II	10	60,79	3,83	12,11	19,93	42,08 – 76,29

Prilog 12 - Koncentracija kalcijuma i fosfora i aktivnost alkalne fosfataze u krvnom serumu, (n=12)

Element	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Fosfor	K	12	75,17	6,29	15,41	20,50	58,00 - 98,00
	O - I	12	135,30	6,87	16,82	12,43	108,00 - 150,00
	O - II	12	141,00	14,11	34,57	24,51	101,00 - 204,00
Kalcijum	K	12	127,70	10,23	25,05	19,62	98,00 - 161,00
	O - I	12	203,50	8,59	21,04	10,34	187,00 - 240,00
	O - II	12	212,00	5,77	14,14	6,67	198,00 - 235,00
ALP	K	12	7142,33	1098,00	2689,00	37,65	2672,00 - 9840,00
	O - I	12	4097,67	1120,00	2744,00	66,96	1463,00 - 8988,00
	O - II	12	4758,33	915,40	2242,00	48,97	1530,00 - 8227,00

Prilog 13 - Sila loma kostiju, (n=12), [kg]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Tibija	K	12	36,31	2,38	5,84	16,07	31,78 - 47,23
	O - I	12	47,50	3,44	8,42	17,72	38,48 - 63,13
	O - II	12	46,06	3,28	8,02	17,42	37,48 - 55,98
Tarsus	K	12	15,34	1,26	3,09	20,17	10,78 - 19,28
	O - I	12	21,26	1,70	4,17	19,63	15,98 - 28,38
	O - II	12	18,34	1,36	3,32	18,11	14,73 - 22,33

Prilog 14 - Površine poprečnog preseka dijafize tibije, (n=12), [mm²]

	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Ukupna površina poprečnog preseka dijafize	K	12	48,76	6,07	14,88	30,51	34,27 - 70,08
	O - I	12	54,58	4,14	10,14	18,58	43,77 - 69,90
	O - II	12	52,55	4,20	10,30	19,60	40,41 - 70,84
Površina preseka medularne šupljine	K	12	16,42	2,59	6,35	38,66	10,46 - 27,22
	O - I	12	19,02	2,03	4,97	26,13	14,76 - 28,64
	O - II	12	19,59	1,94	4,75	24,26	14,51 - 26,82
Površine preseka korteksa dijafize	K	12	32,35	6,42	15,72	48,59	7,05 - 51,99
	O - I	12	35,56	4,13	10,13	28,48	26,08 - 55,14
	O - II	12	32,96	3,00	7,34	22,27	25,9 - 47,12

Prilog 15 - Mase sirovih kostju, (n=12), [g]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Tibija	K	12	6,85	0,48	1,19	17,31	5,56 - 8,65
	O - I	12	9,00	0,68	1,66	18,43	6,89 - 11,44
	O - II	12	9,32	0,72	1,76	18,88	6,73 - 10,95
Tarsus	K	12	3,48	0,53	1,30	37,36	1,78 - 4,84
	O - I	12	5,09	0,31	0,75	14,73	4,24 - 6,21
	O - II	12	4,51	0,44	1,08	24,04	3,30 - 6,00

Prilog 16 – Dužina dijafiza kostiju, (n=12), [mm]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				Iv
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	
Tibija	K	12	55,83	2,01	4,92	8,80	50,0 – 60,0
	O – I	12	68,00	1,01	2,47	3,64	65,0 – 71,2
	O – II	12	66,12	1,77	4,33	6,56	59,8 – 70,4
Tarsus	K	12	43,67	1,14	2,80	6,42	40,0 – 47,0
	O – I	12	55,83	1,42	3,49	6,25	50,0 – 60,0
	O – II	12	53,17	0,79	1,94	3,65	50,0 – 55,0

Prilog 17 – Širina kompakte, (n=12), [mm]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				Iv
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	
Tibija	K	12	1,833	0,105	0,258	14,08	1,50 – 2,00
	O – I	12	2,333	0,167	0,408	17,50	2,00 – 3,00
	O – II	12	2,250	0,171	0,418	18,59	2,00 – 3,00
Tarsus	K	12	1,667	0,167	0,480	24,49	1,00 – 2,00
	O – I	12	2,583	0,201	0,492	19,03	2,00 – 3,00
	O – II	12	2,250	0,171	0,418	18,59	2,00 – 3,00

Prilog 18 – Gustina koštanog tkiva tibije, (n=12), [HU]

Gustina koštanog tkiva	Grupa	n	Mere varijacije				Iv
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	
Proksimalna epifiza	K	12	395,20	34,23	83,85	21,22	308,40 – 530,10
	O – I	12	431,20	12,04	29,49	6,84	395,00 – 468,40
	O – II	12	423,90	22,66	55,50	13,09	345,00 – 480,90
½ dužine dijafize	K	12	833,40	67,76	166,00	19,92	658,00 – 1124,00
	O – I	12	1019,00	73,85	180,90	17,76	770,50 – 1307,00
	O – II	12	864,40	33,19	81,33	9,41	755,10 – 981,30
Distalna epifiza	K	12	589,30	29,03	71,11	12,07	506,10 – 692,00
	O – I	12	659,50	43,31	138,50	17,03	481,90 – 777,50
	O – II	12	622,90	56,53	106,10	21,00	490,10 – 875,30

Prilog 19 – Gustina koštanog tkiva tarzusa, (n=12), [HU]

Gustina koštanog tkiva	Grupa	n	Mere varijacije				Iv
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	
Proksimalna epifiza	K	12	300,00	13,85	33,94	11,31	251,50 – 340,60
	O – I	12	397,00	22,90	56,09	14,13	332,50 – 500,10
	O – II	12	376,70	19,82	48,54	12,89	295,30 – 437,80
½ dužine dijafize	K	12	474,00	33,07	81,01	17,09	390,90 – 600,80
	O – I	12	662,50	61,03	149,50	22,56	501,60 – 830,30
	O – II	12	533,00	21,31	52,20	9,79	455,80 – 597,50
Distalna epifiza	K	12	412,40	14,53	35,60	8,63	361,60 – 455,40
	O – I	12	480,30	6,55	16,03	3,34	458,70 – 504,30
	O – II	12	468,20	27,21	66,66	14,24	340,30 – 531,00

Prilog 20 – Dužine kostiju, (n=12),[cm]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Tibija	K	12	9,25	0,35	0,85	9,19	8,08 – 10,44
	O – I	12	11,19	0,19	0,66	4,29	10,03 – 11,18
	O – II	12	10,65	0,27	0,46	5,91	10,42 – 11,94
Tarsus	K	12	6,07	0,15	0,36	5,94	5,57 – 6,49
	O – I	12	6,99	0,17	0,43	6,11	6,50 – 7,46
	O – II	12	6,74	0,23	0,56	8,28	6,01 – 7,43

Prilog 21 – Površine poprečnih preseka tibije, (n=12),[mm²]

	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Ukupna površina poprečnog preseka dijafize	K	12	53,29	2,69	6,59	12,37	42,03 – 60,52
	O – I	12	62,26	1,68	4,10	6,59	57,32 – 67,58
	O – II	12	60,67	2,19	5,36	8,84	52,10 – 67,03
Površina preseka medularne šupljine	K	12	16,37	2,45	6,01	36,73	9,69 – 27,28
	O – I	12	18,26	2,55	6,25	34,23	11,04 – 29,55
	O – II	12	21,19	3,11	7,62	35,95	9,04 – 29,02
Površine preseka korteksa dijafize	K	12	36,93	3,76	9,22	24,96	23,09 – 47,07
	O – I	12	44,00	2,17	5,33	12,10	36,22 – 49,95
	O – II	12	39,47	4,21	10,30	26,10	25,47 – 51,66

Prilog 22 – Površine poprečnih preseka tarzusa, (n=12), [mm²]

	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Ukupna površina poprečnog preseka dijafize	K	12	42,40	1,44	3,52	8,31	38,80 – 48,34
	O – I	12	53,51	1,54	3,77	7,04	48,90 – 58,43
	O – II	12	52,99	1,41	3,45	6,54	48,80 – 57,90
Površina preseka medularne šupljine	K	12	18,37	2,58	6,32	34,39	8,70 – 26,21
	O – I	12	19,28	4,09	10,03	52,03	7,64 – 37,18
	O – II	12	19,43	3,27	8,00	41,19	9,89 – 30,57
Površine preseka korteksa dijafize	K	12	24,03	3,35	8,20	34,10	13,46 – 35,66
	O – I	12	34,23	4,50	11,03	32,23	15,22 – 47,16
	O – II	12	33,56	2,34	5,73	17,08	25,28 – 38,91

Prilog 23 – Sadržaj pepela u kostima, (n=12), [%]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Tibija	K	12	42,41	0,77	1,88	4,43	40,21 – 44,61
	O – I	12	44,74	0,93	2,27	5,07	41,14 – 47,64
	O – II	12	44,13	1,04	2,54	5,75	39,72 – 47,07
Tarsus	K	12	39,49	0,68	1,67	4,24	37,56 – 41,53
	O – I	12	40,60	0,95	2,32	5,72	38,56 – 44,25
	O – II	12	40,16	0,99	2,42	6,03	36,75 – 42,80

Prilog 24 - Sadržaj fosofora u kostima, (n=12), [%]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Tibija	K	12	7,458	0,178	0,436	5,85	6,800 – 8,080
	O – I	12	7,915	0,109	0,268	3,39	7,440 – 8,260
	O – II	12	7,588	0,201	0,492	6,48	7,030 – 8,280
Tarsus	K	12	7,055	0,200	0,489	6,94	6,460 – 7,940
	O – I	12	6,873	0,282	0,692	10,07	5,990 – 7,770
	O – II	12	6,817	0,174	0,426	6,25	6,370 – 7,600

Prilog 25 - Sadržaj kalcijuma u kostima, (n=12), [%]

Kost	Grupa	n	Mere varijacije				
			\bar{x}	Sx	Sd	Cv%	Iv
Tibija	K	6	14,59	0,33	0,80	5,50	13,74 – 15,43
	O – I	6	15,18	0,27	0,65	4,31	14,160 – 15,92
	O – II	6	15,17	0,28	0,68	4,46	14,02 – 15,89
Tarsus	K	6	13,66	0,27	0,66	4,84	12,74 – 14,59
	O – I	6	13,84	0,35	0,86	6,19	13,22 – 15,14
	O – II	6	14,05	0,35	0,87	6,18	13,06 – 15,32

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Pavlović rođena je 19.06.1985. godine u Sremskoj Mitrovici. Završila je osnovnu školu „Jovan Jovanović Zmaj“ u Smederevu i prirodno – matemtički smer Gimnazije „Smederevo“. Diplomirala na Fakultetu Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu 2012. godine, sa prosečom ocenom 9,07. Dobitnik je nagrade Fakulteta Veterinarske medicine za potignut izuzetan uspeh u školskoj 2005/2006. godini. Školske 2012/2013. godine upisala Doktorske akademske studije, na istom fakultetu. Položila sve ispite predviđene studijskim programom sa prosečnom ocenom 9,6.

Školske 2017/2018. upisala specijalističke akademske studije na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla Fakulteta Veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 10.

Radila je pri Ministarstvu poljoprivrede i zaštite životne sredine, Upravi za Veterinu, na poslovima republičkog veterinarskog inspektora za Podunavski Okrug, opštinu Smederevo.

Objavila 8 naučno-istraživačkih radova, dva u časopisima međunarodnog značaja.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај додавања неорганског фосфора различитог порекла у исхрани бројлера на производне резултате и степен минерализације коштаног система“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 19.04. 2018 год.

М. Павловић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Марија Павловић
Број уписа	16/11
Студијски програм	докторске академске студије
Наслов рада	„Утицај додавања неорганског фосфора различитог порекла у исхрани бројлера на производне резултате и степен минерализације коштаног система“
Ментор	Др Радмила Марковић, ванредни професор

Потписана Марија Павловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2018 год.

М Павловић

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Марија Павловић _____

број уписа 16/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај додавања неорганског фосфора различитог порекла у исхрани бројлера на производне резултате и степен минерализације коштаног система“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 19.04.2018 г.

М.Павловић