

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav výživy zvířat a pícninářství



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Vliv skladování krmných surovin na výskyt mykotoxinů
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Doc. Ing. Pavel Horký, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Kateřina Mrvová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv skladování krmných surovin na rozvoj mykotoxinů vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Pavlovi Horkému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, kterými přispěl k vypracování diplomové práce. Další poděkování pak patří mé rodině a přátelům za pomoc, ochotu a podporu.

Abstrakt

Mrvová K.: Vliv skladování krmných surovin na rozvoj mykotoxinů. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2017.

Tato diplomová práce se zabývá vysvětlením pojmů týkajících se plísní, mykotoxinů a jejich vlivu na skladování krmných surovin. Dále je pak v práci zahrnut účinek těchto patogenů na zdraví zvířat a možnosti jejich eliminace.

Experimentální část je zaměřena na inokulaci plodiny plísní druhu *Fusarium culmorum* a následnou analýzu mykotoxinů v roce výsevu a po roce skladování. Nejvíce zastoupeným toxinem byl deoxynivalenol, který se ve vzorcích vyskytoval z 57 %, dalšími hlavními zástupci byly DON-3-glukosid (maskovaný mykotoxin) a zearalenon, taktéž jeden z nejčastěji figurujících mykotoxinů v krmivech.

Na základě zjištěných dat, byl vyvozen závěr, že až na některé výjimky, jakými byly např. 15-acetyl-DON, beta-zearalenon a enniatin A1, se i při optimálních skladovacích podmínkách obsah většiny mykotoxinů zvýšil, a to i přes předešlou aplikaci fungicidních prostředků.

Klíčová slova: mykotoxiny, plísně, skladování, krmné suroviny, ječmen

Abstract

Mrvová K.: Storage of feed materials impact on the development of mykotoxins. Brno: Mendel university in Brno, 2017.

The thesis deals with the explanation of the concepts related to mold, mycotoxins and their influence on the storage of feed materials. Furthermore, the effect of these pathogens on the animals health and the possibility of their elimination is also included. The experimental part focuses on the inoculation of the *Fusarium culmorum* fungus and the subsequent analysis of mycotoxins in the year of sowing and the year after the storage. The most represented toxin was deoxynivalenol, which was present in the 57 % of all samples. Other major representatives were DON-3-glucoside (masked mycotoxin) and zearalenone, also one of the most common mycotoxins in feed.

Based on the data found it was concluded that, with some exceptions such as 15-acetyl-DON, beta-zearalenone and enniatin A1, most of mycotoxins increased despite the previous application of fungicides and despite the optimal conditions of storage.

Key words: mycotoxins, molds, storage, feed materials, barley

Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL PRÁCE.....	11
3	KRMNÉ SUROVINY	12
3.1	Seznam krmných surovin a jejich příklady dle vyhlášky č. 356/2008 o krmivech (příloha č. 4, část B).....	12
3.2	Obiloviny.....	13
3.2.1	Pšenice (<i>Triticum</i>).....	14
3.2.2	Ječmen (<i>Hordeum</i>).....	16
3.2.3	Oves (<i>Avena</i>)	17
3.2.4	Žito (<i>Secale</i>).....	18
3.2.5	Kukuřice (<i>Zea</i>).....	19
4	SKLADOVÁNÍ KRMNÝCH SUROVIN.....	21
4.1	Skladování obilovin (zrnin).....	21
4.1.1	Faktory ovlivňující proces skladování.....	22
4.1.2	Požadavky na skladování.....	23
4.2	Typy skladů obilí.....	23
4.2.1	Skladování na podlahách (horizontální typy obilních skladů).....	23
4.2.2	Skladování v obilních silech (vertikální typy obilních skladů)	24
4.3	Mykotoxiny v průběhu skladování.....	25
5	MYKOTOXINY.....	27
5.1	Historie.....	27
5.2	Plísně jako producenti mykotoxinů.....	28
5.2.1	Rod <i>Apergillus</i>	29
5.2.2	Rod <i>Penicillium</i>	29
5.2.3	Rod <i>Fusarium</i>	30
5.3	Rozdělení mykotoxinů	31
5.4	Nejvýznamnější mykotoxiny	32
5.4.1	Aflatoxiny	32
5.4.2	Ochratoxin A.....	33
5.4.3	Patulin	34
5.4.4	Fumonisiný	34
5.4.5	Deoxynivalenol.....	35
5.4.6	Zearalenon	35

5.4.7	T-2 toxin	35
5.4.8	Alternariové toxiny	36
5.4.9	Enniatiny	36
5.5	Maskované mykotoxiny	36
5.6	Degradace mykotoxinů	37
5.7	Účinky mykotoxinů obecně – vliv na zvířata	39
5.8	Hygienické limity mykotoxinů v krmivech	40
5.8.1	Směrné hodnoty pro deoxynivalenol a zearalenon dle Doporučení Komise č. 2006/576/ES	41
6	MATERIÁL A METODIKA	43
6.1	Charakteristika místa pokusu – obec Libčany	43
6.2	Popis metodiky inokulace fuzaria dle Tvarůžka a kol., 2012:	43
6.2.1	Příprava inokula	43
6.2.2	Aplikace inokula	44
6.3	Vlastní metodika	44
6.3.1	Aplikace	44
6.3.2	Odběr vzorků a skladování	45
6.3.3	Analýza mykotoxinů (metoda LC-MS)	45
6.4	Statistika – zpracování výsledků	48
7	VÝSLEDKY	49
7.1	Výsledky analýzy	49
7.1.1	Deoxynivalenol	49
7.1.2	DON-3-glukosid	49
7.1.3	3-acetyl-DON	50
7.1.4	15-acetyl-DON	51
7.1.5	Zearalenon	51
7.1.6	β -zearalenon	52
7.1.7	Enniatin A	53
7.1.8	Enniatin A1	53
7.1.9	Enniatin B	54
7.1.10	Enniatin B1	55
7.1.11	Alternariol	55
7.1.12	Alternariol-methylether	56
8	DISKUZE	58

9	ZÁVĚR.....	61
10	LITERÁRNÍ ZDROJE	62
11	SEZNAM TABULEK	67
12	SEZNAM ZKRATEK	68

1 ÚVOD

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity některých druhů vláknitých hub a setkáváme se s nimi bohužel častěji, než bychom si přáli. Vyskytují se v surovinách, ze kterých dále mohou přecházet do potravin, či krmiv a často představují vysoké zdravotní riziko jak pro zvířata, tak pro samotného člověka. U hospodářských zvířat způsobují závažné problémy s reprodukci, snižují užitkovost a v těch nejhorších případech dochází k úhynům. Dále je prokázáno, že vlivem znehodnocení krmiv, potravin, či surovin toxiny, dochází každoročně k obrovským ztrátám. Podle FAO (Food and Agriculture Organization) je kontaminováno mykotoxiny až 25 % světových zásob obilovin. Je tedy nutné zabezpečit naprostou eliminaci tohoto rizika a to i přes to, že existují metody tzv. „vyvazování mykotoxinů“, které dokážou množství těchto toxických metabolitů v krmivech snížit na minimum, nebo je dokonce úplně odstranit. V tomto případě se jedná o poměrně nákladnou a často ne příliš účinnou možnost.

Krmné suroviny mohou být plísněmi napadeny již na poli, nebo dojde k jejich vzniku a produkci mykotoxinů až při skladování v nevhodných podmínkách, popřípadě se tak děje v obou situacích. Dojde-li k napadení a rozvoji mykotoxinů ve vegetační fázi dané plodiny, potom se při následném skladování může hladina toxických látek zvyšovat. Z tohoto důvodu je skladování v optimálních podmínkách jednou z nejdůležitějších fází celého procesu.

Mykotoxiny v krmivech a potravinách jsou čím dál více diskutovaným tématem a tato práce je zacílena zejména na problematiku jejich výskytu v krmných surovinách a vlivu skladování na jejich rozvoj.

2 CÍL PRÁCE

Dílčí cíl této diplomové práce se zaměřuje na vypracování literární rešerše na téma Vliv skladování krmných surovin na rozvoj mykotoxinů. Hlavním cílem je pak pomocí inokulace plodiny a následné analýzy zjistit, jak extrémní výskyt fuzárií dokáže ovlivnit rozvoj mykotoxinů při skladování krmných surovin a to konkrétně ječmene jarního odrůdy Aksamit. A zda je ošetření porostu fungicidy dostatečným opatřením před výskytem plísní a jejich sekundárních metabolitů a to zejména v době skladování.

3 KRMNÉ SUROVINY

Dle zákona č. 91/1996 Sb., o krmivech rozumíme krmnou surovinou krmivo pro přímé krmení zvířat v původním stavu nebo po úpravě, anebo krmivo, které je určeno k výrobě krmných směsí nebo jako nosič pro výrobu premixů [čl. II., § 2, odstavec c)].

Vyhláška č. 356/2008 o krmivech (příloha č. 4, část A) rozděluje krmné suroviny podle:

- a) původu výrobku nebo vedlejšího výrobku - rostlinný, živočišný, minerální,
- b) použité části výrobku nebo vedlejšího výrobku - celá rostlina, bulva, hlíza, semeno,
- c) způsobu úpravy – extrakce, loupání, tepelná úprava, nebo také výsledného vedlejšího výrobku (vločky, tuk, otruby),
- d) stupně zralosti nebo jakosti výrobku (vedlejšího výrobku) – vysoký obsah tuku, nízký obsah cukru.

3.1 Seznam krmných surovin a jejich příklady dle vyhlášky č. 356/2008 o krmivech (příloha č. 4, část B)

- Zrna obilovin, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.
 - oves setý, ovesné vločky a otruby, ječmen setý, ječný lepek, rýže zlomková, rýžové otruby, žito seté, proso seté, pšenice, pšeničná mouka, kukuřice...
- Olejnaté plody, olejnatá semena, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.
 - řepkové semeno, řepkový extrahovaný šrot, sojový extrahovaný šrot, sojové slupky, rostlinný olej, bavlníkové semeno, lněné semeno, kakaové slupky...
- Semena luskovin, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.
 - cizrna, čočka, vikev, hrachové otruby, bob koňský...
- Kořeny, hlízy, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.
 - cukrovarské řízky sušené, melasa řepná, batáty, bramborová dřev, bramborový škrob, bramborové vločky...
- Ostatní plody a semena, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.
 - výlisky dřeně z ovoce, výlisky dřeně z citrusů, jádra z hroznového vína...
- Pícniny a objemná krmiva, např.

- vojtěšková moučka, výlisky vojtěšky, jetelová moučka, sláma z obilovin...
- Ostatní rostliny, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.
 - melasa třtinová, cukr třtinový, výpalky třtinové...
- Mléčné výrobky, např.
 - sušené mléko odtučněné, sušené podmásli, sušená syrovátka, laktóza (prášek)...
- Výrobky ze suchozemských zvířat, např.
 - masová moučka, masokostní moučka, škvarky, drůbeží moučka...
- Ryby a ostatní mořští živočichové, jejich výrobky a vedlejší výrobky z nich, např.:
 - rybí moučka, rybí tuk, rybí vývar zahuštěný...
- Minerální látky, např.
 - uhličitan vápenatý, oxid hořečnatý, síran hořečnatý, chlorid sodný, propionát hořečnatý, mastné kyseliny...

Vzhledem k tématu diplomové práce bude v další kapitole podrobněji popsán výčet našich nejrozšířenějších obilovin, kterými jsou pšenice, ječmen, oves, žito a v posledních letech samozřejmě kukuřice.

3.2 Obiloviny

Botanicky řadíme obiloviny mezi trávy (*Gramineae*) a téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Každá z obilovin má řadu odrůd a několik botanických druhů (Taufarová, 2014).

Prakticky od začátku naší historie jsou obiloviny jedním z nejdůležitějších zdrojů potravy. Využívají se jak k přímé výživě lidí a zvířat, tak pro další průmyslové zpracování, popřípadě ke šlechtění – zachování a zlepšování produkce. Jedná se o skupinu, která je hlavním zdrojem energie ve výživě, ale i dalších vysoce prospěšných látek.

Obiloviny mají hned několik předností a to například možnosti skladování, kdy je lze dlouhodobě skladovat, za předpokladu dodržení vhodných podmínek a lze je také dobře přepravovat. Další předností mohou být právě nutriční hodnoty a možnosti jejich dalšího zpracování – průmyslové využití.

Podle Situační a výhledové zprávy z roku 2015 se v témže roce dostala celková sklizeň obilovin na množství 8 412,3 tis. tun, což je považováno za vysoce nadprůměrné číslo. Lze tedy konstatovat, že takto vysoká produkce obilovin dostatečně pokrývá domácí poptávku.

3.2.1 Pšenice (*Triticum*)

V roce 2015 tvořila sklizeň pšenice množství 5 328,5 tis. tun. Z tohoto množství bylo 5 097,1 tis. tun pšenice ozimé a 231,4 tun pšenice jarní. Oproti loňskému roku byl zaznamenán pokles v celkové výrobě této komodity. A to zejména kvůli nižšímu, ale přesto nadprůměrnému hektarovému výnosu ozimé pšenice, ale především díky poklesu osevních ploch. I přes tyto negativní faktory zůstává pšenice i nadále na našem trhu zcela dominantní surovinou, která tvoří až 63,3 % nabídky všech obilovin (SVZ, 2015).

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) u nás zaujímá cca 30 % plochy na orné půdě. Až 60 % pšenice se zkrmuje a zbytek je využíván pro produkci komodity potravinářské (pekařské) kvality. Popřípadě pro část, která nevyhovuje, se hledá průmyslové využití – výroba biolihu aj. (Prugar a kol., 2008).

Rod pšenice tvoří asi 8 druhů a produkčně využívány jsou:

- pšenice setá (*Triticum aestivum*), jejíž odrůdy se používají především v pekařské výrobě,
- pšenice tvrdá (*Triticum durum*), využívaná zejména pro výrobu těstovin,
- pšenice špalda (*Triticum spelta*), která má pluchaté zrna a využívá se pro speciální výrobky (Taufarová, 2014).

Z pěstitelského hlediska rozdělujeme pšenici na jarní a ozimou formu, ale lze ji také třídit podle tvrdosti na měkké a tvrdé, což je významné zejména pro zpracovatele mouk (Taufarová, 2014).

Pšenici pečivářské a pekárenské jakosti lze tedy využívat pro lidskou výživu, krmná pšenice je vhodná jako krmivo pro hospodářská zvířata a další možností je využití suroviny pro výrobu bioethanolu a škrobu.

Látkové složení pšeničného zrna

Pšeničné zrna obsahuje:

- *Sacharidy* – které tvoří nejpodstatnější podíl zrna. Řadíme sem polysacharidy (škrob, celulosu, hemicelulosu, pentozany, slizy). Dále pak oligosacharidy,

monosacharidy a také sacharidy jsou součástí komplexů s lipidy a bílkovinami (glykolipidy, glykoproteiny). Obsah škrobu v zrně se pohybuje v rozpětí od 50 do 70 % v závislosti na agroekologických podmínkách a na odrůdě (Prugar a kol., 2008).

- *Lipidy* (1,5–3 %) – jsou tvořeny vlastními tuky (kyselina linolová a olejová), fosfatidy, obsahujícími kyselinu fosforečnou a dusíkatou bázi. Lipidy mají zásadní roli při skladování obilí a mouk. Oxidační změny lipidů mohou způsobovat znehodnocení zrna, respektive zhoršení senzorických vlastností – žluknutí. Dále jsou lipidy důležitými činiteli v průběhu kynutí a pečení (Prugar a kol., 2008).
- *Vitamíny* – jsou důležité pro výživu člověka i hospodářských zvířat. Všechny vitamíny jsou většinou obsaženy v klíčku a aleuronové vrstvě zrna. Je tedy jasné, že světlé mouky jsou při zpracování o tento vitaminový podíl ochuzeny. Úbytek může představovat i více než polovinu. V pšeničném zrně se nachází thiamin, riboflavin, pyridoxin, niacin, kyselina pantothenová, kyselina listová, biotin, karoten a tokoferol (Prugar a kol., 2008).
- *Minerální látky* – jejich obsah se pohybuje od 1,4 do 3 % a to v závislosti na odrůdě, podmínkách v průběhu vegetace a půdě. Hlavními minerálními látkami jsou fosfor, draslík, síra, vápník, hořčík, sodík, železo, mangan, zinek, bór a měď. Minerální látky se také soustřeďují zejména v klíčku a v obalech pšeničného zrna (Prugar a kol., 2008).
- *Bílkoviny* – mají největší význam ze všech látek obsažených v zrně. A to zejména pro nutriční a krmnou hodnotu, ale také z technologického hlediska. Množství bílkovin v zrně kolísá v rozpětí od 8 do 20 % v sušině. Takovou standardní hodnotou je 12–13 %. Zastoupení osmi esenciálních aminokyselin: lysin (0,4 %), valin (0,5 %), leucin (0,8 %), isoleucin (0,4 %), fenylalanin (0,5 %), threonin (0,3 %), methionin (0,2 %) a tryptofan (0,2 %). Nejvyšší obsah bílkovin je opět v klíčku a aleuronové vrstvě, v endospermu ubývá obsah směrem do středu. Důležitými bílkovinami jsou lepkové bílkoviny, které tvoří asi 80 % z veškerých bílkovin v zrně (Prugar a kol., 2008).

3.2.2 Ječmen (*Hordeum*)

Celková sklizeň ječmene k 15. 9. 2015 se dle ČSÚ odhadovala na 2 030,6 tis. tun. Z tohoto celkového množství je 28,6 % ječmene ozimého a 71,4 % ječmene jarního. Oproti předchozímu roku byl zaznamenán pokles v produkci ječmene ozimého, ale naopak mírné zvýšení produkce jarní formy (SVZ, 2015).

Celková osevní plocha ječmene pro rok 2015 byla 336 tis. ha. Z toho 261,4 tis. ha ječmene jarního. Plochy jarní formy ječmene se mírně zvýšily i díky poklesu osevních ploch ozimých pšenic (SVZ, 2015).

V České republice se ječmen využívá zejména pro výrobu:

- krup,
- ječných vloček, které jsou součástí mnoha výrobků typu müsli apod.,
- kávovin,
- nápojů ze zeleného zrna
- ječného šrotu k pivovarskému zpracování,
- bioethanolu a lihových nápojů (Taufarová, 2014).

Kromě potravinářského a průmyslového využití se s ječmenem setkáváme i v krmivářské oblasti (Taufarová, 2014). Ke krmným účelům se využívá převážná část produkce sladovnických odrůd, které se v tomto oboru nespoteřebují. Jednotlivé odrůdy a jejich vhodnost pro sladovnické využití se liší zejména v obsahu dusíkatých látek, v zastoupení esenciálních aminokyselin, neškrobových polysacharidů (β -glukanů, pentosanů), v obsahu hrubé vlákniny a rezistentního škrobu. Vyšší obsah N-látek (nad 12 %) je pro sladaře nepřijatelný, naopak pro krmné, ale i potravinářské účely je žádoucí. Pro mláďata je lepší vyšší podíl esenciálních aminokyselin (vývoj). Obsah β -glukanů a pentosanů by měl být pro krmné účely monogastrů nízký, vzhledem k tomu, že mohou způsobovat zažívací potíže a snižovat konverzi krmiva. Biologická hodnota bílkovin ječmene je oproti pšenici a kukuřici vyšší. Ječmen má vysoký podíl zejména ve výkrmu prasat (Prugar a kol., 2008).

Ječmen se vyznačuje vysokým obsahem rozpustné vlákniny a nízkým obsahem tuku. Jsou u něj ceněny zejména jeho antioxidační vlastnosti a to díky obsahu tokoferolů, tokotrienolů a kyseliny ferulové (Taufarová, 2014), (Prugar a kol., 2008). Ječná mouka má vyšší obsah popelovin, než je tomu třeba u mouky pšenice a vyznačuje se téměř

dvojnásobnou absorpcí vody a to díky obsahu neškrobových polysacharidů, β -glukanů a arabinoxylanů. Ječmen také obsahuje tzv. rezistentní škrob, který má pozitivní účinky v prevenci onemocnění tlustého střeva (Taufarová, 2014).

3.2.3 Oves (*Avena*)

Podle Situační a výhledové zprávy z roku 2015, činila osevní plocha ovsa 42,4 tis. ha. Tato výměra představuje pouze 3 % celkové plochy obilovin.

Oves řadíme mezi tzv. funkční potraviny, které poskytují konzumentům živiny a zlepšují jejich zdravotní stav, jedná se o multifunkční potravinu (Prugar a kol., 2008). Je tedy vhodný jak pro lidskou výživu (ovesné vločky, ovesná mouka, ovesné otruby, ovesná krupice), tak i pro krmivářské účely (zrno, plevy). Ovesná sláma je považována za nejhodnotnější obilní slámu (Moudrý, 1993).

Postavení ovsa v našich podmínkách bohužel neodpovídá jeho významu. Hlavní příčinou v poklesu pěstebních ploch je fakt, že přednost dnes dostávají obilniny s lepší výnosovou reakcí. Další příčinou je snížení stavu koní jako tažné síly v zemědělských podnicích. Ačkoli dnes se trend jezdeckví opět zvyšuje, je oves často nahrazován ječmenem a v krmných směsích pro dobytek také kukuřicí a to i přes to, že u mladých a plemenných zvířat i dojnic je oves nenahraditelnou složkou krmivové bilance (Moudrý, 1993).

Látkové složení ovesného zrna

Oves má velmi pozoruhodnou nutriční hodnotu, která spočívá v poměrně vysokém obsahu bílkovin. Zrno obsahuje větší množství oleje bohatého na kyselinu linolovou, palmitovou a olejovou, dále pak nadprůměrný obsah vitamínu B₁ a rozpustnou vlákninu sestavenou převážně z β -glukanů. Obsah dusíkatých látek v zrně pluchatého ovsa je mezi 12,1–16,3 %, u nahého se obsah pohybuje mezi 15,2–23,6 % (Prugar a kol., 2008).

Sacharidy – mezi jednoduché sacharidy obsažené v zrně ovsa patří sacharosa, maltosa, rafinosa, fruktosa, glukosa, stachyosa a verbaskosa, které jsou v zrně zastoupeny pouze v množství kolem 1 %. Sacharidová frakce je tvořena zejména polysacharidy, kam patří např. škrob (66 %), který je hlavní energetickou složkou ovsa (Prugar a kol., 2008).

Důležitou složkou je také vláknina, jejíž obsah je limitujícím faktorem využití pluchatého ovsa v krmivu monogastričních zvířat i v lidské stravě. Ovesná vláknina

usnadňuje funkci střev. Vedle ječmene je oves nejlepším zdrojem lehce rozpustné vlákniny. Dále je oves nositelem antioxidantů, které mohou mít příznivé fyziologické vlivy (Prugar a kol., 2008).

3.2.4 Žito (*Secale*)

Podle Situační a výhledové zprávy z roku 2015 bylo k 31. 5. 2015 pěstováno žito v ČR na ploše 22 tis. ha, což je ve srovnání s předchozím rokem o 3, tis. ha méně. Jedná se tedy o další mírný pokles zájmu zemědělců o pěstování této komodity a to zejména z důvodu nestabilní ceny, dále pak díky špatnému odbytu, pokud se surovina neuplatní v potravinářství, kdy často nejsou splněny kvalitativní požadavky, nenachází další uplatnění ani v krmném užití. I přes to je žito velmi ceněnou surovinou a to především pro její nenáročnost a možnost pěstování i v méně úrodných oblastech, na písčitých půdách a také odolnosti vůči zimním podmínkám a mrazu (SVZ, 2015). Do počátku 20. století bylo žito nejrozšířenější obilovinou na našem území (Prugar a kol., 2008).

V pekařské výrobě se žito využívá zejména v podobě tmavé mouky chlebové k výrobě chleba (Taufarová, 2014). Ovšem příprava chleba z žitné mouky je pro velkopekárný náročnější, než příprava z mouky pšeničné. Dokonce i mletí žita je ekonomicky méně výhodné v porovnání s pšeničkou moukou, to způsobuje právě jeho menší využití (Petr, 1995).

Je možné jej také uplatnit jako krmnou surovinu, ovšem v České republice se k takovému účelu využívá minimálně, vzhledem k nepříznivým dietetickým účinkům (Taufarová, 2014). Tyto účinky se projevují zejména u mladých zvířat a drůbeže. Mohou snižovat chutnost a mohou být částečně i toxické. Mezi antinutriční látky řadíme např. alkylnesorcinoly, kyselinu fytovou nebo kyselinu ferulovou (Prugar a kol., 2008).

Díky obsahu škrobu je další možností využití žita k výrobě lihu, dnes označovaného jako bioethanol. V ČR se při výrobě lihu počítá spíše s pšenicí a triticales, vzhledem k jejich většímu množství a k vyššímu obsahu škrobu (Taufarová, 2014).

Dříve se ze žita vyráběly také náhražky kávy, tzv. obilné kávoviny, ale dnes už se s těmito výrobky setkáváme pouze v omezené míře (Taufarová, 2014).

Dále je také možnost užívat žito ve farmaceutickém průmyslu, kdy se umělou infekcí (naočkováním) paličkovicí nachovou v době kvetení žita získává náměl, obsahující v lékařství využitelné alkaloidy (Pokorná, Petrášová, 2014). Paličkovice nachová je vřeckovýtrusná houba, která napadá zejména právě žito, ale i jiné druhy trav. Pro

potravinářské využití žita je námel nežádoucí a nebezpečný. Vedle takto naočkovaných porostů by se potravinářské žito nemělo nikdy pěstovat (Petr, 1995).

Látkové složení žitného zrna

Sacharidy - představující nejdůležitější skupiny zásobních látek. Spolu s enzymy jako tzv. sacharido-amylasový komplex nebo škrobo-amylasový komplex tvoří pekařskou jakost žita. Největší podíl ze sacharidů má škrob (52–59 %), který se vyznačuje snazší enzymatickou degradací, než je tomu u jiných obilných škrobů. Dále má v žitném zrně větší význam také maltóza. Technologicky nejvýznamnějšími neškrobovými polysacharidy jsou tzv. arabinoxylany, označovány také jako pentosany (7–9 %), které mají vysokou schopnost vázat vodu. Pentosany dělíme na rozpustné (slizy) a nerozpustné (hemicelulosity) a ovlivňují reologické vlastnosti těsta. Rozpustné pentosany dále zlepšují vlastnosti žitné mouky, prodlužují životnost pekařského výrobku a mají příznivý vliv na senzorické vlastnosti kůrky (Prugar a kol., 2008).

Bílkoviny – mají technologicky menší význam, než je tomu u bílkovin pšeničných. Množství bílkovin je závislé zejména na agroekologických podmínkách během vegetace. Bílkoviny zvyšují schopnost žitné mouky vázat vodu a přispívají k lepší konzistenci těsta. Žitné bílkoviny obsahují větší množství albuminů a globulinů, bohatých na esenciální aminokyseliny, můžeme tedy konstatovat, že výživová hodnota žitných bílkovin je vyšší než u pšenice. Ovšem vlivem některých antinutričních látek v žitě je stravitelnost a tedy i využitelnost žitných bílkovin nižší (Prugar a kol., 2008).

Žitné zrně obsahuje hodně vlákniny a celou řadu bioaktivních látek jakými jsou např. maltodextriny, β -glukany, flavonoidy, fytoestrogeny (lignany), saponiny atd. Jsou prokázána pozitivní působení žita na snížení rizika onemocnění kardiovaskulárními onemocněními, snižování hladiny cholesterolu v krvi, snižování krevního tlaku atp. (Prugar a kol., 2008).

3.2.5 Kukuřice (*Zea*)

V současné době se jedná o naši nejvýznamnější jednoletou píceň. Velká většina je v ČR využívána pro produkci siláží, která tvoří základ krmné dávky pro skot. Důvody vysoké oblíbenosti silážní kukuřice jsou např. dobrá snášenlivost po sobě, vysoký výnos živin v jedné sklizni, snadná silážovatelnost a vysoká koncentrace energie v píci (Skládanka a kol., 2014).

V roce 2015 zaznamenala výrazný pokles produkce na úroveň 555,2 tis. tun, což je o 277,1 tis. tun méně, než v roce předchozím. Hlavními důvody poklesu jsou nižší osevní plochy a především nepříznivé klimatické podmínky v průběhu kvetení (květen 2015), kdy kukuřice špatně odkvetly, což mělo za následek nižší hektarový výnos (SVZ, 2015).

Kukuřice pro výživu zvířat

Zkrmuje se ve formě zrna či siláže. Jedná se o krmivo glycidového charakteru s nedostatkem bílkovin. Kukuřičná siláž představuje u vysokoprodukčních dojníc základ celoroční krmné dávky. Ve srovnání s ostatními pícejinami má vysoký obsah škrobu a tím i vysokou koncentraci energie. Stravitelnost sušiny postupně klesá během vývoje kukuřice. Stravitelnost škrobu v silážní kukuřici se považuje za velmi vysokou a to až nad 99 %, ale pohybuje se v širokém rozmezí (Skládanka a kol., 2014).

Kukuřice pro produkci bioplynu

Pro produkci bioplynu je kukuřice využívána zejména díky vysoké produkci sušiny z jednotky plochy a díky relativně jednoduché technologii pěstování a sklizně. Bioplyn vzniká anaerobní fermentací organické hmoty a jedná se o směs metanu, oxidu uhličitého a dusíku (Skládanka a kol., 2014).

Kukuřice v lidské výživě

Přímá spotřeba kukuřice jako potraviny je více méně pouze okrajová, ale kukuřici cukrovou lze pěstovat i doma a u zahrádkářů je stále oblíbenější díky chutnosti a také díky prospěšným látkám obsaženým v jejím zrna (sacharidy, bílkoviny, vláknina a vitaminy), (Prugar a kol., 2008).

Nejběžnějšími produkty z kukuřice jsou kukuřičné lupínky, expandovaná pufrovaná zrna (pop-corn), kukuřičná mouka, která je vhodná pro bezlepkovou dietu.

V potravinářském průmyslu slouží kukuřice jako zdroj kukuřičného klíčkového oleje, který obsahuje kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a linolovou a je vhodný pro všestranné využití v kuchyni. Dále pak pro výrobu corn sirupu a škrobového cukru (Prugar a kol., 2008).

Lze tedy konstatovat, že obiloviny tvoří, tvořily a snad i nadále budou tvořit základnu potravinářského i krmivářského průmyslu.

4 SKLADOVÁNÍ KRMNÝCH SUROVIN

Uskladnění krmných směsí podléhá, stejně jako výroba krmiv, mezinárodní legislativě – např. nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 183/2005/ES, které stanovuje požadavky na hygienu krmiv, nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 882/2004/ES o úředních kontrolách dodržování předpisů v krmivech a potravinách (Balabánová, 2014).

Typy skladů:

- silová
- hangárová
- podlahová
- kombinované
- silážní žlaby nebo věže
- skladovací tanky nebo nádrže
- haly
- seníky
- zpevněné skládky (Balabánová, 2014).

Sklady lze dále členit na:

- sklady pro skladování suchých krmiv (vlhkost méně než 14 %),
- sklady vybavené aktivním větráním,
- sklady vybavené technologií chlazení skladovaných zásob podchlazeným vzduchem,
- sklady upravené pro skladování chemicky konzervovaných krmiv (Balabánová, 2014).

4.1 Skladování obilovin (zrnin)

Vzhledem k poměrně vysokým výnosům a dlouhé trvanlivosti některých plodin je nutné zařídit jejich úschovu neboli skladování. Díky skladování máme možnost využívat surovinu vícekrát do roka a nejsme tak vázáni na roční období. Aby mohlo dojít k dlouhodobému a správnému uskladnění, je potřeba vytvořit optimální skladovací podmínky. Podmínky se mění s druhem plodiny a s jejím množstvím.

Obecně lze konstatovat, že skladování obilnin probíhá většinou v halách a menších silech. Ukládá se zde pouze obilí suché s 13% až 15% vlhkostí a vyčištěné, popřípadě je zde umístěno zařízení na aktivní větrání studeným nebo přehřátým vzduchem. Velmi důležitá je pravidelná kontrola skladování, při níž se sleduje teplota (tyčový teploměr) a vlhkost, ale také pach skladovaného obilí a to ve všech částech skladu (Pokorná, Petrášková, 2014).

4.1.1 Faktory ovlivňující proces skladování

Teplota – Zrniny se lépe skladují zchlazené, zejména pokud obsahují větší množství vody. Nejpriznivější skladovací teploty pro obilniny jsou teploty od 5 °C do 10 °C (Kalinová, 2007). Teplotu skladovaného zrna ovlivňuje přístup kyslíku a lze říci, že volný přístup kyslíku podporuje dýchání zrna. U zrnin může docházet k tzv. samozáhřevu, kdy množství tepla, které vzniká při dýchání je vyšší než množství tepla odváděného. Problémem je, že při provzdušňování zrnin, u kterých dochází k tomuto jevu, může nastat místo předpokládaného efektu efekt opačný a dojde ke stimulaci dýchání a zpočátku ještě silnějšímu zahřívání. Provzdušňování je úspěšné pouze tehdy, pokud používáme vzduch s nízkou relativní vlhkostí. Zrna poškozená samozáhřevem jsou matná (ztrácejí přírodní lesk), mohou vydávat kyselý, popřípadě plísni podobný zápach (Dvořák, 2002).

Mikrofóra – Mikroflórou rozumíme zejména bakterie, kvasinky a mikroskopické vláknité houby. Ti využívají zrniny jako svoji živnou půdu a mění svým působením jejich vlastnosti. Aktivita mikroflóry je závislá především na teplotě a obsahu vody v zrnech. Působením mikroskopických vláknitých hub mohou vznikat jedovaté mykotoxiny (Dvořák, 2002).

Vlhkost – Snížením vlhkosti u obilovin lze významně omezit mikrobiologickou aktivitu a to tak, že je obsah vody snížen např. právě u obilí na 14 %. Pro zrniny je však určitý obsah vody nezbytný k uchování života (obilniny minimálně – 8 až 10 %), přílišné snížení obsahu vody může mít za následek biologické znehodnocení (Dvořák, 2002).

Poškození zrna – Poškození zrna je pro dobrou skladovatelnost nežádoucí a měli bychom ho udržovat na minimální úrovni. Snížit poškození, a to zejména to mechanické, můžeme volbou vhodného technologického postupu sklizně, dopravy i posklizňového ošetřování. Poškozená zrna jsou daleko náchylnější k napadení mikroflórou, než je tomu u zrn zdravých (Dvořák, 2002).

4.1.2 Požadavky na skladování

- skladovací prostory by měly umožnit rychlý příjem zrna tak, aby nedošlo ke snížení výkonnosti vlastní sklizně,
- uskladněné zrna nesmí ztrácet kvalitu požadovanou ČSN,
- skladovací prostory musí zajistit plynulý příjem zrna,
- při stavbě skladovacích prostorů je potřeba respektovat podíl jednotlivých partií a podle toho je třeba stanovit jednotkovou kapacitu zásobníků,
- expediční část posklizňové linky musí respektovat požadavky na expedici ošetřeného zrna (čištění, třídění),
- počet expedičních zásobníků by měl být volen tak, aby jejich celková skladovací kapacita odpovídala minimálně dvoudenní výkonnosti třídících a čistících strojů,
- příjmová linka na zrna musí zajistit příjem, předčištění a ošetření přímo ve skladovacím prostoru nebo příjem a předčištění s možností přímé expedice (Skalický a kol., 2008).

4.2 Typy skladů obilí

4.2.1 Skladování na podlahách (horizontální typy obilních skladů)

Tento typ skladování je využíván především menšími hospodářstvími. Spočívá v uskladnění obilí v podlahových sýpkách nebo v půdních prostorách (Zimolka a kol., 2005).

Vícepodlažní sýpky mají v přízemním podlaží příjmové rampy, expediční rampy a manipulační prostory. Z příjmové násypky situované v suterénu se obilí dopravuje kolečkovými dopravníky do nejvyššího podlaží, odkud je pak samospádem dopravováno k čištění a následně do boxových hrádí (Zimolka a kol., 2005).

Pro menší skladovací kapacitu se využívají také přízemní halové podlahové sklady, a to zejména v zemědělských podnicích zaměřených na prvovýrobu. Podlahové sklady zrnin jsou u nás i na celém světě značně rozšířeny (Skalický a kol., 2008). Obilí je zde uloženo na hromadách a ve 3 až 5-metrových vrstvách, které mohou být označeny fošnovými nebo železobetonovými přepážkami, sloužícími k oddělení obilí podle druhů, odrůd, popřípadě k zachycení bočních tlaků vrstvy zrna u obvodových stěn (Zimolka a kol., 2005). Podlaha skladu by měla být dostatečně izolována proti spodní vodě (Skalický a kol., 2008).

Pomocí soustavy pásových nebo pneumatických dopravníků, jeřábových nakladačů nebo mobilních nakladačů či shrnovačů se provádí plnění a vyprazdňování. Dosoušení či provětrávání zrna aktivní ventilací (Zimolka a kol., 2005) je umožněno provzdušňovacími zařízeními:

- s nadúrovňovými kanály,
- s podúrovňovými kanály (Skalický a kol., 2008).

Předností podlahových skladů je zejména jejich univerzálnost. Lze na nich např. dosoušet vlhké balíky sena a slámy, mohou sloužit k provzdušňování kukuřičných palic či tobolek lnu. Dají se využít také při dosoušení (sušení) semen trav, píceňin či jiných plodin. Takto univerzální podlahové sklady umožňují zvládnout problémy sklizně v nepříznivých povětrnostních podmínkách (Skalický a kol., 2008).

Nevýhody podlahových skladů:

- obtížná manipulace se skladovanými partiemi,
- problematické vzájemné oddělení jednotlivých zrnin,
- vyšší poškození při manipulaci,
- riziko kontaminace mobilní nakládací technikou
- nižší jednotková skladovací kapacita (Dvořák, 2002).

4.2.2 Skladování v obilních silech (vertikální typy obilních skladů)

Obilní silo je vertikální šachta kruhového, čtvercového nebo polygonálního půdorysu o průměru 4–9 m a výšce 15–80 m (Zimolka a kol., 2005). Tyto zásobníky mohou být s jehlanovou či kuželovou výsypkou nebo mohou být postaveny na rovnou betonovou základovou desku (Skalický a kol., 2008), což je konstrukčně i stavebně jednodušší, ale pro vyskladňování musí být použit mechanický dopravník (Zimolka a kol., 2005). Kapacita obilních sil je obvykle odstupňována od 45 t, přes 1 000 t, 3 000 t, 7 000 t, až na 10 000 t uskladněného zrna. Plášť věžových zásobníků bývá tvořen ocelovými segmenty, nebo z podélně stočeného ocelového pásu o šířce 495 mm (Skalický a kol., 2008).

Pro dlouhodobé skladování zrna jsou obilní sila opatřena tepelnou izolací a vnějším reflexním pásem (Zimolka a kol., 2005).

Moderní obilní sila jsou vybavena systémem provzdušňování, teplotní stabilizace a dosoušení zrna aktivní ventilací. Ventilátory mohou být radiální, středotlaké nebo vysokotlaké (Zimolka a kol., 2006).

Výhody využití věžových zásobníků:

- úplně mechanizovaná manipulace,
- vysoká skladovací kapacita na jednotku plochy,
- dokonalé oddělení skladovaných zrnin – jejich partií,
- nízké poškození zrna při manipulaci (Dvořák, 2002).

Při skladování vždy dochází k určitým ztrátám. U podlahových skladů se jedná o 2–3 %, u skladů věžových o 0,5–1 %. Lze tedy říci, že vertikální typy skladů jsou z hlediska ztráty výhodnější než sklady horizontální (Skalický a kol., 2008).

4.3 Mykotoxiny v průběhu skladování

Hlavním zdrojem mykotoxinů v potravním řetězci lidí i zvířat jsou zejména obiloviny a olejniny (Slonek, 2008). Růst samotných hub a následná produkce mykotoxinů se děje na plodinách buď přímo na poli, nebo v době uskladnění, popřípadě v obou případech. Některé druhy hub napadají plodiny na poli a k produkci mykotoxinů pak dochází až v době jejich uskladnění, např. aflatoxiny B₁, B₂, G₁, G₂, které se vyskytují především při nevhodném skladování. Ochratoxiny patří k mykotoxinům, které se vyskytují jak při skladování, tak přímo na poli a ostatní sekundární metabolity vláknitých hub jako je např. zearalenon, fumonisiny, T-2 a HT-2 toxiny, deoxynivalenol a další se vyskytují pouze na poli (Sanders, 2012).

Abychom se vyhnuli problémům již na polním pozemku, je důležitá správná technologie pěstování. Mezi základní principy patří zejména střídání plodin, volba odrůdy, zpracování půdy, vyvážená výživa a další. V rámci skladování se jedná o včasné a kvalitní sušení a dosoušení a zejména o správné vnitřní prostředí skladu (teplota, vlhkost, atmosféra). Pro inhibici růstu se využívají také chemické metody – organické kyseliny: kyselina propionová, v kombinaci s kyselinou mravenčí či octovou (Slonek, 2008).

Častým problémem bývá právě prostředí skladu, kdy je tamější atmosféra vhodná pro růst vláknitých hub. Každému druhu vyhovuje jiné prostředí, ale existují podmínky,

ve kterých se daří téměř každé vláknité houbě, a to je zejména větší vlhkost a vyšší teplota.

Je velmi důležité, aby byly sklady chráněny před vnějšími vlivy, jako je např. sluneční záření, které může taktéž znehodnocovat skladovaný produkt, dále pak déšť, další povětrnostní vlivy, škůdci aj. A jedním z nejdůležitějších úkonů, kterým lze omezit rozvoj plísní je dostatečné větrání úložných prostor

5 MYKOTOXINY

Mykotoxiny obecně řadíme do nežádoucích látek v rostlinných produktech, stejně jako např. těžké kovy, glykoalkaloidy, dusitany, dusičnany a další.

V případě mykotoxinů se jedná o látky, které produkují některé druhy mikroskopických vláknitých hub, laicky se tyto houby nazývají plísně. Jedná se o produkty jejich sekundárního metabolismu (Prugar a kol., 2008), které produkují z důvodu zachování svojí konkurenceschopnosti (Lillard-Roberts, 2016). Houby vytvářející mykotoxiny jsou přirozenou součástí životního prostředí a díky jejich enzymatickému vybavení mohou kontaminovat jakýkoliv substrát s rozdílnou vlhkostí (Skládanka a kol., 2014). Ke kontaminaci může dojít jak v průběhu vegetace, tak i po sklizni, popřípadě právě během skladování či zpracování rostlinných produktů (Prugar a kol., 2008). Některé kmeny hub mohou produkovat dokonce i více druhů toxických sekundárních metabolitů, takových hub je známo asi kolem 150 druhů (Šimůnek, 2004). Mykotoxiny představují závažné riziko z hlediska potravinářské bezpečnosti – škodí při vdechování, požití nebo kontaktu s kůží (Lillard-Roberts, 2016), a na celém světě znamenají poměrně vysoký ekonomický dopad na zemědělství a zpracovatelský průmysl (Prugar a kol., 2008).

5.1 Historie

První doložené zprávy o toxicitě plesnivých potravin pocházejí z Japonska z konce minulého století. Většina z nich navazuje na lidové zkušenosti tradované ve východní Asii po staletí. Z jedné takové lidové zkušenosti vychází i pěstování žluté rýže, která by se měla vystavit na několik hodin prudkému slunci, aby pozbyla svoji toxicitu (Šimůnek, 2004).

Ve 30. a 40. letech byly na území tehdejšího SSSR zkoumány vzorky obilí, které byly napadeny plísněmi rodu *Fusarium* – vykazovaly toxicitu pro pokusná zvířata a v praxi byly spojovány s onemocněním zvaným v tehdejší době jako „septická angína“, dnes je toto onemocnění označováno jako ATA – alimentární toxická aleukie (Šimůnek, 2004).

Ve 40. letech se na trhu objevil „zázrak“ s názvem penicilin, který zachraňoval životy dříve naprosto beznadějným pacientům s infekcemi. K jeho rozšíření významně přispěla 2. sv. válka. Po nějaké době nadšení z penicilinu opadlo, když se zjistili další skutečnosti a o toxicitě plísní. Přírodní penicilin nelze podávat ústy jako lék, neboť se

rozkládá v žaludku a může vyvolávat závažné alergické obtíže a nepříznivě ovlivňovat mikroflóru trávicího ústrojí. Sir Alexander Flemming měl obrovské štěstí, že našel kmen produkující penicilin, který současně neprodukoval mykotoxiny, což je velmi vzácné. Jeho pozdější američtí spolupracovníci pak našli ještě další takový kmen. Originální československý penicilin byl Mykoin B. Jednalo se o preparát z originálního produkčního kmenu nalezeného československými vědci, kteří jej vyvíjeli na konci 2. sv. války (Šimůnek, 2004).

V roce 1960 opět stoupl zájem o toxické látky z plísní, když v témže roce uhynulo na farmách Nové Anglie několik desítek tisíc krů'at na chorobu, která se tehdy označovala jako Turkey-X disease. Po krátké době bylo pak objeveno několik toxických látek a také se zjistilo, že látky pochází z arašídů, které tvořili součást krmné dávky pro krů'ata. Vzhledem k tomu, že se jednalo o látky, které produkovala plíseň *Aspergillus flavus*, byly nalezené toxické látky popsány jako aflatoxiny (Šimůnek, 2004).

Poměrně rychle byla práce zavedena i do tehdejší ČSSR, kdy k zahájení došlo na základě kauzy v závodu tehdejší Fruty, kde došlo k zaplísnění rajčat. To mělo za následek výrazné zhoršení sensorických vlastností výrobků – silně hořkou chuť. Dalším problémem bylo, že hygieničtí pracovníci, kteří tehdy prováděli sensorické zkoušky, onemocněli s příznaky poškození jater. Řešením této situace byl tehdy pověřen doc. RNDr. Miroslav Polster, CSc., který se spojil s řadou zahraničních pracovišť a postupem času pak přešel k výzkumu problematiky mykotoxinů. Referenční laboratoř pro výzkum mykotoxinů byla zřízena při KHS Plzeň. Na Slovensku byl výzkum plísní a mykotoxinů soustředěn ve Výzkumném ústavu preventivního lékařstva v Bratislavě (Šimůnek, 2004).

V současné době je jedním z vrcholových pracovišť pro mykotoxiny v potravinách a potravinových surovinách Centrum hygieny potravinových řetězců na Státním zdravotním ústavu v Brně (Šimůnek, 2004).

5.2 Plísně jako producenti mykotoxinů

Nejvýznamnějšími producenty mykotoxinů jsou houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Dalšími producenty mohou být např. rod *Cladosporium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Stachybotrys* a další.

5.2.1 Rod *Aspergillus*

Botanik toskánského vévody Pier Antonio Micheli popsal v roce 1729 mikromycety, které dostaly rodové označení *Aspergillus*. Českým názvem tohoto rodu je kropidlák, vzhledem k průřezu rozmnožovacím orgánem, který připomínal našim botanikům kropítko. Z fylogenetického hlediska se jedná o velmi starý rod (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

V tabulce č. 1 jsou vypsáni někteří zástupci rodu *Aspergillus*, jako například *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. candidus* a další, kteří se nacházejí ve velkém množství potravin i krmných surovin, např. v obilovinách, zelenině a ovoci, dále také v různých druzích ořechů, koření nebo také v masných produktech (Malíř, Ostrý a kol., 2003). Pro růst hub tohoto rodu jsou ideální teplé podmínky s nižší vlhkostí (Prugar a kol., 2008).

V současnosti obsahuje rod *Aspergillus* více než 221 druhů (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Tab. 1 Příklady toxikogenních mikromycetů rodu *Aspergillus* a jejich teleomorf (Malíř, Ostrý a kol., 2003)

Druh	Možná produkce mykotoxinů
<i>Emericella nidulans</i>	emestrin, sterigmatocystin
<i>Eurotium chevalieri</i>	echinulin, neoechinulin
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxin B ₁ , B ₂ , cyklopiazonová kyselina
<i>Aspergillus niger</i>	ochratoxin A
<i>Aspergillus niveus</i>	citirnin
<i>Aspergillus ochraceus</i>	ochratoxin A, B a C, penicilová kyselina
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂

5.2.2 Rod *Penicillium*

Německý botanik Johan H. F. Link v roce 1809 poprvé použil rodové označení *Penicillium* pro kordiální stádium mikroskopické houby. Historie tohoto rodu tedy spadá do začátku 19. století. Poměrně velkým přínosem pro studium rodu *Penicillium* byl přechod od pozorování růstu na herbářových položkách a na přirozeném čerstvém substrátu k využití kultivačních metod čistých kultur, které využívali významní

mykologové jako Dierckx, Brefeld, Bainier, Sopp, Westling a mnoho dalších (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Českým názvem pro rod *Penicillium* je štětičkovec, který vznikl tak, že tvar rozmnožovací nepohlavní struktury připomínal našim botanikům štětičky. Prvním publikovaným nálezem tohoto druhu na našem území je popis *Penicillium expansum* v roce 1823 Opizem na spadlém ovoci (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Norský badatel Sopp a americký badatel Thom se ve svých studiích zabývali některými zástupci rodu *Penicillium*, kteří byli využíváni k výrobě sýrů a při jejich zrání. Laxou byl poprvé popsán *Penicillium nalgiovensis* (1932) na nalžovském sýru, vyrábějícím se v jižních Čechách. Historie tohoto rodu je velmi pestrá a je dobré se s ní před jakýmkoliv výzkumem dobře seznámit (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Rod *Penicillium* řadíme k nejrozšířenějším vláknitým mikromycetům mírného a teplého klimatu. Příklady některých zástupců tohoto rodu lze nalézt v tabulce č. 2. Jedná se o velmi časté kontaminanty potravin, krmných surovin, ale i životního a pracovního prostředí člověka. Nejčastěji se opět vyskytují v obilovinách, ořeších, zelenině, ovoci, v masných výrobcích, sýrech a dalších (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Tab. 2 Příklady toxikogenních mikromycet rodu *Penicillium* (Malíř, Ostrý a kol., 2003)

Druh	Možná produkce mykotoxinů
<i>Penicillium citrinum</i>	citrinin
<i>Penicillium crustosum</i>	Penitrem A
<i>Penicillium expansum</i>	Patulin, citrinin
<i>Penicillium funiculosum</i>	patulin
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxin
<i>Penicillium purpurogenum</i>	rubratoxiny
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxin A, citrinin

5.2.3 Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* řadíme k významným potenciálně toxikogenním „polním“ mikromycetům, vzhledem k tomu, že jsou zástupci tohoto rodu součástí půdního ekosystému, kde se podílejí na rozkladu organické hmoty. Některé druhy se během

vývoje přizpůsobily k parazitismu na rostlinách a část může být za určitých podmínek patogenní i pro živočichy (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Německý botanik Johan H. F. Link je opět spojen s prvním záznamem popisu tohoto druhu mikromycetů. Historie rodu *Fusarium* je známa také u nás a o tom svědčí český název „srpovička“ (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Zástupci rodu *Fusarium*, vyjmenováni v tabulce č. 3, se vyskytují především v obilovinách, zejména v pšenici, ječmeni, žitu a ovsu. Ale můžeme se s nimi setkat také v některých druzích ovoce, zeleniny, dále také v kořeni či ořeších, obdobně jako je tomu u hub rodu *Aspergillus* a *Penicillium* (Malíř, Ostrý a kol., 2003).

Tab. 3 Příklady potencionálně toxigenních zástupců rodu *Fusarium* (Malíř, Ostrý a kol., 2003)

Druh	Významné mykotoxiny
<i>Fusarium acuminatum</i>	T-2 toxin, HT-2 toxin, chlamydosporol
<i>Fusarium avenaceum</i>	MON, FUS C, T-2 toxin
<i>Fusarium culmorum</i>	DON, NIV, ZEA, MON, T-2 toxin,...
<i>Fusarium moniliforme</i>	FUM, FUS C, FUS A, D, E, F
<i>Fusarium proliferatum</i>	MON, FUM, T-2 toxin, NIV, FUS X,...
<i>Fusarium semitectum</i>	ZEA, T-2 toxin, DAS, NIV, FUS X,...
<i>Fusarium solani</i>	Furanoterpenoidy, ipomeanoly a další

* Vysvětlivky: DON – deoxinivalenol, NIV – nivalenol, ZEA – zearalenon, MON – monilifimin, FUS C – fusarin C, FUM – fumonisiny, FUS X – fusarenon X, DAS – diacetoxyscirpenol

Jak tedy souvisí plísně s mykotoxiny? Lze konstatovat, že pro tvorbu mykotoxinů je v daném okamžiku nezbytný výskyt toxikogenní plísně, ale vznik plísně (i toxikogenní) nemá bezpodmínečný vliv na vznik mykotoxinu. Pokud se plíseň nevyskytuje, neznamená to, že by nemohlo dojít ke vzniku mykotoxinu – ten může přetrvávat i delší dobu, přesto, že plíseň (houba) zanikla (Mykotoxiny u zvířat, 2012).

5.3 Rozdělení mykotoxinů

Mykotoxiny lze rozdělit podle několika kritérií. Podle chemické struktury, kdy je výhodou jednoznačné zařazení jakékoliv látky o známé chemické struktuře. Dále podle způsobu biosyntézy nebo podle toxicity, které je znázorněno v tabulkách č. 4 a 5.

Tab. 4 Dělení mykotoxinů podle toxicity (kvantitativní), (Šimůnek, 2004)

Silně toxické	aflatoxiny, patulin, luteoskyrin, sporidesminy, ochratoxin A, cyklochlorotin, zearalenon, T-2 toxin, DAS (diacetoxyscirpenol), citreoviridin, rubratoxiny, penitrem A
Středně toxické	kyselina penicillová, carinin, sterigmatocystin, kyselina cyklopiazonová
Slabě toxické	griseofulvin, kyselina koji, kyselina mykofenolová, chaetomin, trihothecin

Tab. 5 Dělení mykotoxinů podle toxicity (kvalitativní), (Šimůnek, 2004)

Hepatotoxiny	aflatoxiny, sporidesminy, sterigmatocystin aj.
Nefrotoxiny	ochratoxin A, citrinin aj.
Toxiny zažívacího traktu	T-2 toxin další trichotheceny
Neurotoxiny a mytoxiny	tremorgeny (např. penitrem A), citreoviridin
Dermotoxiny	verrucariny, sporidesminy, trichotheceny aj
Toxiny dýchacího traktu	patulin
Genitotoxiny	zearalenony
Imunotoxiny	aflatoxiny, ochratoxin A, trichotheceny aj.

Toxicita některých mykotoxinů může být ovlivněna určitou fází vývoje organismu. Příkladem je aflatoxin B₁, jehož toxicita může být vůči savcům i ptačím mláďatům až desetinásobná v porovnání s dospělými jedinci. Jiné jsou v určitém množství netoxické vůči dospělým, ale mohou způsobit úhyn a resorpci plodu (Šimůnek, 2004).

5.4 Nejvýznamnější mykotoxiny

5.4.1 Aflatoxiny

Tyto látky kontaminují rostlinné produkty převážně až po sklizni, tedy nevhodným skladováním nebo v průběhu zpracování. Dnes jsou známy asi dvě desítky různých aflatoxinů, přičemž se v rostlinných produktech přirozeně vyskytují aflatoxiny B₁, B₂, G₁, G₂ (Prugar a kol., 2008), které označujeme jako aflatoxiny základní a dále existují

aflatoxiny odvozené – M1, M2, vznikající konverzí v procesu trávení krmiv kontaminovaných právě základními aflatoxiny (Horký, Skládanka, 2015).

Aflatoxiny produkují některé dluhy rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*) a kontaminovány jsou zejména ořechy, kukuřice, koření a sušené ovoce. Obiloviny jako pšenice, žito, ječmen, oves a rýže nejsou příliš náchylné ke kontaminaci aflatoxiny, ale za předpokladu dobrých skladovacích podmínek. Nejsilnějším známým přírodním karcinogenem je právě aflatoxin B₁ (Prugar a kol., 2008).

Negativní účinky

Hlavními toxickými účinky aflatoxinů jsou karcinogenita a hepatotoxicita, mutagenita, teratogenita (Prugar a kol., 2008). Aflatoxin B₁ patří k nejvýznamnějším imunosupresivně působícím mykotoxinům, potlačuje všechny významné funkce imunitního systému (Horký, Skládanka, 2015).

Aflatoxiny patří k chemicky poměrně stabilním látkám a dokážou odolávat i teplotám do 250 °C. K jejich destrukci pak dochází při použití silných oxidačních činidel (Horký, Skládanka, 2015).

5.4.2 Ochratoxin A

Dalšími druhy ochratoxinů jsou ochratoxin B, C a celá řada jejich derivátů, ale z toxikologického hlediska má největší význam ochratoxin A (Horký, Skládanka, 2015).

V tropických a subtropických oblastech je produkován rodem *Aspergillus* a v chladnějších oblastech houbami rodu *Penicillium*. Hlavními zdroji tohoto druhu toxických sekundárních metabolitů jsou obilniny, sušené ovoce, káva, rozinky, koření a víno (Prugar a kol., 2008).

Hromadění ochratoxinu A se sleduje především v krvi, játrech a ledvinách zvířat, která požíla kontaminované krmivo (Horký, Skládanka, 2015).

Negativní účinky

Při ochratoxinóze dochází k podráždění sliznic trávicího ústrojí a k rozvoji akutní gastroenteritidy. Postižená zvířata jsou apatická, ochablá. Resorbované mykotoxiny mohou vést ke vzniku neuropatie, kterou provázejí symptomy deprese, průjmů, nechutenství, horečky apod. (Horký, Skládanka, 2015).

5.4.3 Patulin

Penicillium expansum, která produkuje tento druh toxinu, se běžně vyskytuje na povrchu ovoce a k jejímu růstu a produkci patulinu dochází až při porušení povrchu ovoce (hmyzem, mechanicky). Patulin se vyskytuje zejména v jablcích a ve výrobcích z nich. (Prugar a kol., 2008). Dále se může nacházet také v obilovinách a sýrech.

Řada studií byla v minulosti zaměřena na výzkum a využití patulinu jako antibiotika. Byl například testován jako nosní a krční sprej na nachlazení a ve formě mastí pro léčbu houbových kožních infekcí. V dalších letech (1950–1960) se ovšem zjistilo, že kromě antibakteriální a antivirové aktivity je patulin toxický pro rostliny i živočichy a to bránilo jeho klinickému využití jako antibiotika. Po roce 1960 byl patulin překlasifikován na mykotoxin (Bennett, Klich 2003).

Negativní účinky

Patulin může způsobit poškození gastrointestinárního traktu, je neurotoxický, imunosupresivní a mutagenní (Horký, Skládanka, 2015).

V našich klimatických podmínkách jsou hlavními producenty mykotoxinů v obilovinách houby rodu *Fusarium*, způsobující onemocnění obiloviny jako jsou např. klasové fuzariózy. Nejvýznamnější producenti jsou zejména *F. graminearum*, *F. culmorum*, a *F. verticillioides*. Nejsledovanějšími toxickými produkty těchto druhů jsou především **deoxynivalenol**, **nivalenol**, **zearalenon**, **T-2** a **HT-2 toxin** a **fumonisin**. Přičemž účinky těchto toxinů jsou velmi rozmanité.

5.4.4 Fumonisin

Jsou považovány za karcinogenní a jde o relativně nedávno objevenou skupinu mykotoxinů. Je známa celá řada Fumonisinů – A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1, C2, P1, P2 a další. Za nejtoxičtější je považován Fumonisin B1 (Horký, Skládanka, 2015).

Fumonisin se nacházejí u obilovin, a to zejména v kukuřici a produktech z ní, ale také u rýže (Skládanka, Nedělník a kol., 2011).

Negativní účinky

Kromě rakovinného bujení způsobují také leukoencefalopatie u koní a pulmonální edém u prasat (Horký, Skládanka, 2015).

5.4.5 Deoxynivalenol

Jeho přítomnost byla prokázána v pšenici, ječmeni, žitě, pohance, ovsu, kukuřici, pивě a dalších. Jedná se pravděpodobně o nejznámější a nejběžnější kontaminant obilí a jeho následných produktů. Jeho výskyt v potravinách a krmivech představuje více než 90 % z celkového počtu vzorků a je to potencionální indikátor výskytu dalších mykotoxinů (Skládanka, Nedělník a kol., 2011). Na tento toxin jsou opět velmi citlivá prasata, která kontaminované krmivo většinou odmítají (Horký, Skládanka, 2015).

Negativní účinky

Pokud je krmivo zvířetem přijato, dochází k průjmům, ke zvracení a k poruchám koordinace pohybu (Horký, Skládanka, 2015). Dále způsobuje hematologické a kožní změny a byl prokázán i teratogenní efekt (Prugar a kol., 2008).

5.4.6 Zearalenon

Jedná se o produkt plísni rodu *Fusarium*. Je známý také jako RAL a F-2 mykotoxin (Skládanka, Nedělník a kol., 2011). Tento druh mykotoxinů se tvoří v obilovinách především během vegetace. Hlavním faktorem, který jejich tvorbu ovlivňuje na např. průběh počasí, ale také způsob zpracování půdy, předplodina, odolnost pěstované odrůdy a správnou chemickou ochranou můžeme kontaminaci výrazně snížit (Prugar a kol., 2008). Klinické případy bývají nejčastěji způsobeny kontaminací kukuřice. Zearalenon se vyskytuje dále i na pšenici, ovsu, ječmeni a čiroku. K růstu plísni dochází zejména ve vlhkém obilí (22–25 %), které je skladované při nízkých teplotách (Horký, Skládanka, 2015). Jeho metabolity se označují jako α -zearalenon a β -zearalenon.

Negativní účinky

Způsobuje zhoršenou plodnost, opožděný nástup říje po odstavu a obecně problémy při reprodukci (Skládanka a kol., 2014). Zearalenon má tzv. estrogení aktivitu – způsobuje permanentní říji (nebo naopak opožděný nástup říje), zhoršenou plodnost a zabřezávání (Skládanka a kol., 2014).

5.4.7 T-2 toxin

Patří k velmi toxickým mykotoxinům vzhledem k jeho vysoké akutní toxicitě. Způsobuje výskyt krvácení v oblasti reprodukčních orgánů a vředy na sliznici. U prasat

dochází k poruchám reprodukce. Dále se může u zvířat projevovat netečností, sníženým příjmem krmiva, objevuje se průjem, záněty kůže, střevní krvácení a další. T-2 toxin je asi stokrát toxičtější než deoxynivalenol. V krmivu by neměla být překročena koncentrace 1,0 mg/kg (Horký, Skládanka, 2015).

5.4.8 Alternariové toxiny

Produkují houby rodu *Alternaria*, které patří k posklizňovým patogenům a svojí rozmanitostí připomínají fusariové mykotoxiny. Vyskytují se především v cereáliích, ale také v ovoci (jablka, citrusy), semenech řepky či slunečnice a v zelenině (rajčata, zelená paprika). Významnými zástupci jsou např. alternariol a alternariol-methylether – jedná se o dibenopyrozinové deriváty rozpustné ve většině rozpouštědel, dále pak také altenuen, tenuazová kyselina a další (Hajšlová a kol., 2009). Toxicita alternariových mykotoxinů je prokázána zejména u kuřat.

5.4.9 Enniatiny

Jedná se o nově se vyskytující (emerging) fusariové mykotoxiny, jejichž existence nebyla dříve známa. Doposud existují pouze omezené informace o těchto látkách, přesto však bylo zjištěno, že se nacházejí v obilovinách a to v poměrně vysokých koncentracích. Existuje několik druhů těchto toxinů – enniatin A, A1, B, B1. Enniatiny jsou popisovány jako rostlinné toxiny s insekticidní a antibiotickou aktivitou a jejich případná chronická ani akutní toxicita nebyla zatím potvrzena. V současné době pobíhá výzkum a sledování těchto látek v různých surovinách (Benešová a kol., 2015).

5.5 Maskované mykotoxiny

Maskované mykotoxiny lze označovat také jako tzv. „skryté mykotoxiny“ nebo „konjugované mykotoxiny“ a byly objeveny v 80. letech minulého století. Takto označované mykotoxiny jsou látky, které vznikají jako obranná reakce rostlin na napadení plísněmi rodu *Fusarium* a jejich výzkum je teprve na začátku. O jejich vzniku, biologické aktivitě a metabolismu v napadených rostlinách nebo plísních je zatím známo velice málo. Také o vlivu maskovaných mykotoxinů na organismus při požití kontaminovaného krmiva, či potravin není příliš mnoho informací (Horký, Skládanka, 2015).

Příkladem takového mykotoxinu je D-3-Glc (DON → deoxinivalenol-3-glukosid). Jedná se o látku velmi stabilní a odolnou vůči působení žaludečních šťáv, umělých střevních šťáv a lidské β -glukosidáze. Schopnost zpřístupňovat D-3-Glc mají nejspíš střevní mikroorganismy a příslušné glukosidázy. V rámci výzkumu různých druhů byla zjištěna schopnost štěpit D-3-Glc u zástupců rodu *Enterococcus* a *Lactobacillus* (*L. plantarum*), (Horký, Skládanka, 2015). Mezi další maskované mykotoxiny patří také 3-acetyl-deoxynivalenol nebo 15-acetyl-deoxynivalenol.

5.6 Degradace mykotoxinů

Mykotoxiny jsou látky značně stabilní, přesto je lze neutralizovat, i když často velmi obtížně. Degradaci není možno využít v potravinářství, neboť se pro výrobu potravin nesmí používat zplesnivělých surovin. Dalším problémem je, že některé produkty degradace mohou být také toxické. Degradace se tedy využívá zejména u krmiv. K neutralizaci již kontaminovaného krmiva se využívají fyzikální, chemické i biologické metody (Horký, Skládanka, 2015).

Degradace mykotoxinů je poměrně ekonomicky náročný úkon, vzhledem k tomu, že ve většině případů se jedná o dekontaminaci obrovského množství kontaminovaných krmiv (Doležal, 2012). Lze konstatovat, že neselektivní vyvazovače jsou sice poměrně levné na pořízení, ale o to nákladnější je pak doplňování vitamínů a minerálních látek.

Fyzikální metody – neselektivní vyvazovače mykotoxinů

V laboratorních podmínkách lze efektivně absorbovat většinu mykotoxinů pomocí aktivního uhlí, ale v případě podmínek v organismu zvířete není tento efekt pozorován.

Adsorbenty – Silikátové minerály

Jedná se o nejkomplexnější a nejrozsáhlejší třídu adsorbentů mykotoxinů. Ve výživě zvířat se jako adsorbenty využívají kaolinit, bentonit nebo zeolit, což jsou velmi porézní horniny (Horký, Skládanka, 2015) a ve své podstatě se jedná o jílovité částice, které mají schopnost vázat do své krystalické mřížky některé mykotoxiny. V tomto případě jde ovšem o tzv. neselektivní vyvazovače, což znamená, že mohou zároveň s daným mykotoxinem odstranit např. vitamíny, či minerální látky, které je pak nutné do krmné dávky doplnit (Skládanka a kol., 2014). Účinnost těchto látek je dána absorpční

kapacitou, jejich molekulární strukturou, čistotou, druhem mykotoxinu a další (Doležal, 2012).

- Kaolinit – vodnatý křemičitan hlinitý, ve velké míře je zastoupen v horninách kaolínu.
- Bentonit – v závislosti na složení rozlišujeme tzv. silně bobtnavé a méně bobtnavé bentonity. Silně bobtnavé jsou považovány za kvalitnější (Horký, Skládanka, 2015). Dají se jim odstranit aflatoxiny a patulin (Slonek, 2008).
- Zeolit (organojíl) – patří do rozsáhlé skupiny silikátových hornin. Limitem jílových vyvazovačů je jejich specifický účinek pouze k aflatoxinům a velmi malý účinek k ostatním mykotoxinům, což ale může být překonáno chemickými modifikacemi. Takto modifikované zeolity (organozeolity) efektivně adsorbují zearalenon, ochratoxin A, fumonisin B1, aflatoxin B1. Jedná se o studie testované *in vitro*. Na základě těchto studií lze konstatovat, že organozeolity mohou být využívány jako krmná aditiva adsorbující mykotoxiny za předpokladu, že bude jejich účinnost prokázána také *in vivo* (Horký, Skládanka, 2015).

Biologické metody - selektivní vyvazovače mykotoxinů

Toxický účinek může být snižován také pomocí mikroorganismů a to několika způsoby:

- Adsorbce mikroorganismů – jedná se o interakci mezi toxinem a funkčními skupinami na povrchu buňky. Tyto interakce nejsou závislé na metabolismu dané buňky.
- Enzymatická detoxikace – konkrétním příkladem může být degradace aflatoxinu vlastním myceliem pomocí enzymu peroxidáza. U některých mykotoxinů může docházet k degradaci mikroflórou batoru také pomocí enzymatických reakcí.
- Kvasinky a bakterie mléčného kvašení (BMK) – poměrně zajímavé výsledky vykazovaly bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) a kvasinky. Velké množství pokusů tak potvrdilo schopnost BMK a kvasinek vázat některé molekuly (toxiny, ionty kovů) prostřednictvím vazebných struktur na povrchu buněčných stěn. Hlavní výhodou je, že se tyto mikroorganismy vyskytují přirozeně v traktu zvířat, ale i ve fermentovaných potravinách a krmivech (siláž), (Horký, Skládanka, 2015).

5.7 Účinky mykotoxinů obecně – vliv na zvířata

Projevy negativních účinků mykotoxinů je možno rozdělit na akutní a chronické. Akutní intoxikace znamená rychlou negativní odezvu organismu na větší příjem potravy kontaminovanou mykotoxiny. Tyto případy jsou dnes známy pouze z různých oblastí Asie či Afriky. Pozdní účinky těchto látek závisí zejména na druhu mykotoxinu a patří mezi ně např. mutagenita, teratogenita, karcinogenita, imunotoxicita a neurotoxicita. Účinky mykotoxinů závisí také na zdraví zvířat, popřípadě na prostředí, ve kterém se daná zvířata vyskytují (Rodrigues, 2014). V přirozených podmínkách se často setkáváme s více druhy mykotoxinů současně a díky tomu může dojít k synergickému efektu, kdy se toxické účinky jednotlivých látek zesilují (Prugar a kol., 2008). Je tedy prostě nemožné zjistit přesné příčiny a následky vztahů mezi určitou koncentrací toxinu a jeho symptomy u zvířat (Rodrigues, 2014).

Chronické, neboli subklinické, projevy jsou spojené s méně výrazným zhoršením užitkovosti a reprodukčních parametrů, ale jsou velmi časté a způsobené ztráty jsou v součtu pak poměrně vysoké (Florian, 2013).

Počet mykotoxinů dnes není přesně znám. Neustále se objevují další a další látky tohoto typu. Lze ale odhadnout, že se jejich počet dnes pohybuje okolo 500 druhů (Šimůnek, 2004).

Symptomy působení mykotoxinů:

- snížený příjem krmiva,
- poruchy trávení,
- zhoršení užitkovosti spolu s konverzí krmiva,
- poruchy reprodukce,
- zhoršená kvalita srsti (opeření),
- zhoršení imunity – větší výskyt infekčních chorob.

Přesná diagnóza mykotoxikózy je velmi obtížná vzhledem k vysoké variabilitě toxinů a jejich účinků (Florian, 2013).

Dalším velmi závažným problémem je interakce mezi jednotlivými mykotoxiny. Což znamená, že se mohou jednotlivé toxické látky vzájemně ovlivňovat a může pak docházet ke zhoršení jejich negativních účinků, což ztěžuje určení správné diagnózy (Florian, 2013).

Charakter vzniklých onemocnění se rozlišuje podle:

- fyziologického stavu – o jaké zvíře se jedná, zda je to mládě či dospělec,

- požité dávky – čím větší množství, tím bude průběh horší,
- doby působení mykotoxinů – zda se jedná o akutní nebo chronickou otravu,
- působení dalších mykotoxinů,
- dalších faktorů – infekce, jiné toxické látky, stres atd. (Mykotoxiny u zvířat, 2012)

Prevence

Základem prevence výskytu mykotoxinů v rostlinných produktech je správná zemědělská a zpracovatelská práce. V první fázi je důležité zamezit vytvoření optimálních podmínek pro růst a vývoj hub (plísni) a produkci jejich toxinů. Takové podmínky jsou dány zejména teplotou, vlhkostí, ale i dalšími faktory jako je třeba odolnost hostitele. Pro zamezení vstupu kontaminované suroviny do potravního řetězce je nutný kvalitní systém kontrol. Pokud jsou mykotoxiny v surovině zjištěny, je snížení jejich obsahu značně omezené. Mezi některé možnosti patří čištění a separace, a to zejména u ovoce, kdy třídíme nahnilé a poškozené plody, nebo u obilovin separací zlomků a nečistot (Prugar a kol., 2008). Další možností, jak snížit kontaminaci u některých krmiv je vymývání kapalným čpavkem, kyselinou octovou, kapalným oxidem uhličitým apod. Problémem je snížení nutriční hodnoty a sensorické znehodnocení (Šimůnek, 2004). Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, lze také využít tzv. vyvazovače mykotoxinů. A to jak fyzikální (bentonit, kaolinit, zeolit), tak i biologické (např. kvasinky a bakterie mléčného kvašení).

5.8 Hygienické limity mykotoxinů v krmivech

Na rozdíl od potravin, chybí ve většině evropských států maximálně přípustné koncentrace pro jednotlivé mykotoxiny a jednotlivé kategorie zvířat a krmiv. Jediným dnes limitovaným mykotoxinem je aflatoxin B₁, jehož nejvyšší přípustné obsahy jsou uvedeny v tabulce č. 6. Ve Spojených státech je doporučený limit pro zearalenon pro všechna krmiva a kategorie zvířat 0,5 mg/kg, pro T-2 toxin je limit podobný, pro fumonisiny je maximálně přípustná hranice 5 mg/kg, u deoxynivalenolu je specifikováno několik kategorií: pro skot je hranice 10 ppm v méně než 50 % krmiva, pro prasata 5 ppm (Nedělník a spol., 2006).

Tab. 6 Nejvyšší přípustné obsahy aflatoxinu B1 dle vyhlášky o krmivech (vyhláška č. 194/1996 Sb.)

Krmivo	Nejvyšší přípustný obsah v mg/kg
doplňková krmiva pro prasata a drůbež (mimo mláďata)	0,03
kompletní krmiva pro prasata a drůbež (mimo mláďata)	0,02
kompletní a doplňková krmiva pro skot, ovce, kozy, s výjimkou telat, jehňat a dojnic	0,05
doplňková krmiva pro dojnice v laktaci, ovce v laktaci a kozy v laktaci	0,005

5.8.1 Směrné hodnoty pro deoxynivalenol a zearalenon dle Doporučení Komise č. 2006/576/ES

Tab. 7 Směrné hodnoty pro deoxynivalenol

Krmivo	Nejvyšší přípustný obsah v mg/kg
Obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice	8,00
Vedlejší produkty kukuřice	12,00
Doplňková a kompletní krmiva pro prasata	0,90
Doplňková a kompletní krmiva pro telata (< 4 měsíce), jehňata a kůzlata	2,00
Doplňková a kompletní krmiva	5,00

Tab. 8 Směrné hodnoty pro zearalenon

Krmivo	Nejvyšší přípustný obsah v mg/kg
Obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice	2,00
Vedlejší produkty kukuřice	3,00
Doplňková a kompletní krmiva pro selata a prasničky (mladé prasnice)	0,10
Doplňková a kompletní krmiva pro prasnice a výkrm prasat	0,25
Doplňková a kompletní krmiva pro telata, dojnice, ovce (včetně jehňat) a kozy (včetně kůzlat)	0,50

6 MATERIÁL A METODIKA

Pokus je zaměřen na inokulaci ječmene jarního, sladovnické odrůdy Aksamit, plísni druhu *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. - patotyp KM16902 (DON chemotyp). Na obrázku č. 1 lze vidět, jak plíseň prostupuje celým klasem.

Aplikace suspenze proběhla v roce 2015 a ve stejném roce byla po sklizni změřena první hladina mykotoxinů. Měření bylo zopakováno u uskladněného materiálu cca po jednom roce skladování.



Obr. 1 Porost po inokulaci *F. culmorum*

6.1 Charakteristika místa pokusu – obec Libčany

Obec se nachází v Královéhradeckém kraji cca 10 km od Hradce Králové, v nadmořské výšce 264 m. n. m. Zemědělská plocha obce je tvořena 327 ha z této plochy připadá 185 ha na ornou půdu, 120 ha na ovocné sady a trvalé travní porosty tvoří pouze 3 ha z celkové zemědělské plochy obce. (RIS, 2015).

Průměrná roční teplota vzduchu za rok 2015 se pohybovala od 10,1 do 11,0 °C. Roční úhrn srážek v okolí obce Libčany byl v roce 2015 450–500 mm (ČHMÚ, 2016).

* ČHMÚ – Český hydrometeorologický ústav

* RIS – Regionální informační servis

6.2 Popis metodiky inokulace fuzaria dle Tvarůžka a kol., 2012:

6.2.1 Příprava inokula

Jedná se o suspenzi konidií, kterou připravíme namnožením kmene fuzária kultivační metodou na sterilovaných zrnech testovaného druhu obilniny v Erlenmayerových baňkách. Po té se substrát obsahující zárodky patogena namočí na 30 minut do vody

a následně se mikroskopicky stanoví počet konidií na 1 ml zásobní suspenze. Stanovení počtu konidií se provádí nejméně ve 4 opakováních. Suspenze, kterou je možno aplikovat musí obsahovat alespoň 500 000 konidií na 1 ml, což znamená, že na 1 m² plochy je aplikováno 10 milionů konidií (Tvarůžek a kol., 2012).

6.2.2 Aplikace inokula

Inokulace porostů obilnin suspenzí konidií fuzárií je provedena ve vývojovém stádiu, kdy je polovina rostlin v počátku květu. Pro vyšší úspěšnost je možné inokulaci opakovat týden po první aplikaci, tím dojde k infikování také klasů, které při první inokulaci ještě nekvetly.

Aplikace se provádí postřikem a objem postřikové suspenze na plochu porostu je 0,2 l/10 m², což odpovídá množství 200 l suspenze/ha. Inokulace se provádí zejména navečer nebo ve dnech, kdy není silné sluneční záření (Tvarůžek a kol., 2012).

6.3 Vlastní metodika

6.3.1 Aplikace

V době před vlastní inokulací byla vegetace ošetřena čistou vodou za suchého a slunečního počasí, po té následovalo chemické ošetření fungicidy. Porost byl rozdělen do tří skupin – první skupina ječmene byla neošetřena a sloužila tak jako skupina kontrolní, na druhou skupinu (varianta 2) byl aplikován fungicidní přípravek Hutton + Zantara v množství 0,8 l/ha a 1,5 l/ha. Třetí skupina ječmene (varianta 3) se ošetřila kombinací přípravku Hutton (0,8 l/ha) + Prosaro 250 EC (0,75 l/ha). V další fázi proběhla samotná aplikace postřikové suspenze konidií fuzárií dle metodiky Tvarůžka a kol., 2012.

Hutton

Jedná se o fungicidní přípravek ve formě emulgovatelného koncentrátu k ochraně ječmene, pšenice, ovsa, žita a tritikale proti houbovým chorobám. Účinnými látkami jsou spiroxamine 250 g/l, tebuconazole 100 g/l, prothioconazole 100 g/l (Kruliš a kol., 2014).

Zantara

Zantara je fungicidní postřikový přípravek ve formě emulgovatelného koncentrátu k ochraně obilnin proti klasovým a listovým chorobám. Obsahuje účinné látky jako bixafen 50 g/l a tebuconazole 166 g/l (Kruliš a kol., 2014).

Prosaro 250 EC

V případě tohoto přípravku se taktéž jedná o fungicid ve formě emulgovatelného koncentrátu k ochraně ječmene, žita, pšenice, tritikale, řepky olejky, slunečnice, hořčice, máku a kukuřice proti širokému spektru chorob. Účinné látky tohoto fungicidu jsou tebuconazole 125 g/l a prothioconazole 125 g/l (Kruliš a kol., 2014).

6.3.2 Odběr vzorků a skladování

Z každé supiny se odebraly tři vzorky, které byly analyzovány na obsah jednotlivých mykotoxinů. Došlo tedy k odebrání 9 různých vzorků z různých částí sklizně, které byly po té uskladněny v laboratorních podmínkách při relativní vlhkosti 75 %, teplotě cca 20 °C a při světelném režimu 12/12 o intenzitě světla 200 lx. Ječmen byl skladován na hromádkách o hmotnosti 1 kg po dobu jednoho roku. Po roce byly opět změřeny hladiny mykotoxinů a hodnoty jednotlivých měření porovnány.

6.3.3 Analýza mykotoxinů (metoda LC-MS)

Princip metody

Jedná se o stanovení homogenizace a extrakce pevných vzorků ječmene s předčištěním ječných extraktů následované měřením předčištěného extraktu s využitím ultra-účinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC® System (Waters) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® (AB Sciex).

Pracovní postup

Vzorek ječmene (2 g) byl navážen do PTFE centrifugační kyvety (50 ml), následoval přídavek 10 ml okyseleného destilované vody (0,2% kyselina mravenčí), vzorek byl protřepán, uzavřen a nechal se 30 min stát z důvodu důkladného smočení matrice. Ke vzorku s vodou se poté přidalo 10 ml acetonitrilu následovaná extrakcí na laboratorní třepačce po dobu 30 min (240 RPM). Do kyvety byly přidány 4 g MgSO₄ a 1 g NaCl byl intenzivně třepán v ruce po dobu 1 minuty. Takový vzorek byl pak centrifugován po dobu 5 minut (10 000 RPM). Po odstředění byl odebrán vzorek (cca 1,5 ml) pro přečištění pomocí mikrofiltru s pórovitostí 0,2 μm (centrifugace 2 min, 5 000 RPM). Takto připravený vzorek byl převeden do vialky a připraven k analýze.

Vzorky ve skleněných vialkách byly před analýzou skladovány při teplotě -18°C. Pro identifikaci a kvantitativní stanovení stanovovaných mykotoxinů bylo využito

instrumentace ultra-účinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC® System (Waters, Milford, MS, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® (AB Sciex, Toronto, ON, Kanada). Ke zpracování naměřených dat byl využíván program Analyst® (Thermo Fisher Scientific).

Stanovované mykotoxiny

Celkem bylo stanovováno 57 mykotoxinů mikroskopických vláknitých plísní rodu *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, a *Stachybotrys*: Fusarenon X, nivalenol, deoxynivalenol, alfa-zearalenol, beta-zearalenol, zearalenon, 3-acetyl-deoxynivalenol, patulin, alternariol, alternariol-methylether, deoxynivalenol-3-glukoside, enniatin A, enniatin A1, enniatin B, enniatin B1, ergokornin, ergokorninin, ergokristin, ergokristinin, ergokryptin, ergokryptinin, ergosin, ergosinin, ergometrin, ergotamin, ergotaminin, agroklavin, neosolaniol, diacetoxyscirpenol, fumonisin B1, fumonisin B2, fumonisin B3, 15-acetyl-deoxynivalenol, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G2, aflatoxin G1, HT-2 toxin, T-2 toxin, sterigmatocystin, ochratoxin A, citrinin, beauvericin, cyklopiazonová kyselina, mykofenolová kyselina, peniciliová kyselina, rokfortin C, tentoxin, tenuazonová kyselina, verrucarol, verruculogen, penitrem A, stachybotrylaktam, phomopsin A, gliotoxin, meleagrin, paxillin. Práce se dále zabývá pouze některými z nich.

Příprava kalibračních standardů - Elisa

Standardy jednotlivých mykotoxinů byly od výrobců dodávány buď v roztoku acetonitrilu, nebo jako pevné látky. Pevné standardy byly před použitím rozpuštěny v acetonitrilu či methanolu a spolu s kapalnými standardy skladovány při teplotě -18 °C. Ze zásobních standardů byl připraven pracovní roztok o koncentraci 1000 ng/ml, který byl dále použit k přípravě kalibrační řady matričních standardů. Jednotlivé kalibrační roztoky (body kalibrační křivky) o koncentracích 0,1 až 1000 ng/ml byly připraveny odebráním vypočítaných objemů z pracovního standardu obsahujícího všechny mykotoxiny do vialek, od foukáním acetonitrilu jemným proudem dusíku a rozpuštěním v 1 ml extraktu vzorku prostého kontaminace (blank). Kalibrační roztoky matričních standardů byly uchovány v mrazáku při teplotě -18 °C.

Instrumentální analýza

Identifikace sledovaných analytů se prováděla na základě sledování hmot (m/z) specifických přechodů mateřského iontu na dceřiné a také porovnáním retenčních časů s příslušnými standardy analytů. Kvantitativní vyhodnocení bylo založeno na metodě vnějšího standardu porovnáním odezvových charakteristik kvantifikačních iontů analytů s příslušnými standardy pomocí kalibrační závislosti. K vyhodnocení chromatogramů se používá program Analyst® (Applied Biosystems).

Hmotnostní spektrometrie

Použitá technika MS/MS byla spojení dvou hmotnostně-spektrometrických principů - kvadrupólu a iontové pasti. Sledované analyty byly identifikovány na základě charakteristických fragmentačních přechodů mateřských iontů na ionty dceřiné (jednotlivé MS přechody byly při vývoji metody naladěny pomocí základních standardů mykotoxinů). Jednotlivé MS přechody spolu s optimálními detekčními podmínkami jsou uvedeny v tabulce č. 9. Pro každou sloučeninu byl sledován jeden kvantifikační a jeden konfirmační iont.

Tab. 9 Sledované fragmentační přechody analyzovaných mykotoxinů

Analyt	t_R^a [min]	Prekursový iont [m/z]	Produktový iont kvantifikační/konfirmační
3-Acetyldeoxynivalenol	2,3	397,1 [$M+CH_3COO$] ⁻	336,9/306,9
15-Acetyldeoxynivalenol	2,3	356,1 [$M+NH_4$] ⁺	321,0/137,1
Alternariol	3,8	257,0 [$M-H$] ⁻	214,9/213,0
Alternariol-methylether	5,4	271,0 [$M-H$] ⁻	255,9/228,0
Deoxynivalenol	1,8	355,1 [$M+CH_3COO$] ⁻	295,1/265,1
Deoxynivalenol-3-glucoside	1,7	517,1 [$M+CH_3COO$] ⁻	456,9/426,9
Enniatin A	8,2	699,3 [$M+NH_4$] ⁺	228,2/210,1
Enniatin A1	8,1	685,3 [$M+NH_4$] ⁺	214,1/210,1
Enniatin B	7,9	657,3 [$M+NH_4$] ⁺	213,9/196,1
Enniatin B1	8,0	671,2 [$M+NH_4$] ⁺	228,1/214,1
Zearalenone	5,1	317,1 [$M-H$] ⁻	175,1/131,0
β -Zearalenon	4,3	319,1 [$M-H$] ⁻	275,0/174,0

6.4 Statistika – zpracování výsledků

Data byla statisticky analyzována pomocí programu STATISTIKA.CZ verze 10.0 (StatSoft CR s.r.o., Česká republika). Výsledky jsou vyjádřené jako průměr +/- směrodatná odchylka. Statistická průkaznost byla sledována mezi jednotlivými variantami zprůměrovaných vzorků mezi lety 2015 a 2016 za použití ANOVA a Scheffého testu – jednofaktorová analýza pro jednotlivé mykotoxiny. Rozdíl mezi průměry při $P < 0,05$ byl považován za průkazný.

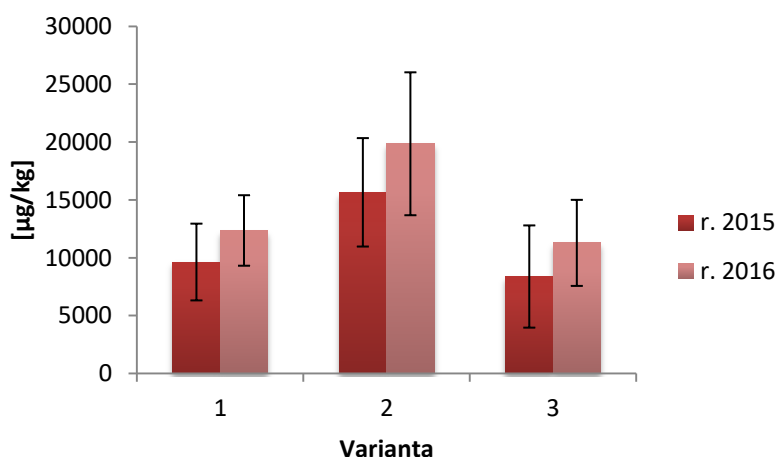
7 VÝSLEDKY

7.1 Výsledky analýzy

Grafy č. 1–12 znázorňují výsledky analýzy obsahu mykotoxinů v ječmeni jarním a to průměry jednotlivých variant pro dané mykotoxiny. Jedná se o porovnání koncentrace mykotoxinů v roce založení a po roce skladování v laboratorních podmínkách.

7.1.1 Deoxynivalenol

V největším množství je jasně zastoupen deoxynivalenol – až 57 % a to ve všech devíti analyzovaných vzorcích. Tento výsledek má své opodstatnění, vzhledem k faktu, že je deoxynivalenol pravděpodobně nejznámějším a nejběžnějším kontaminantem obilí a jeho produktů a výskyt tohoto toxinu v krmivech a potravinách představuje více než 90 %. Nejvyšší průměrný obsah deoxynivalenolu byl až 21 041 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u neošetřené, tzv. kontrolní varianty, naopak nejnižší průměrné množství tohoto toxinu bylo 5 746 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u ošetřené varianty ječmene (varianty č. 3). Z grafu č. 1 lze vyčíst, že se zvýšil obsah tohoto mykotoxinu o zhruba stejný podíl u každé z variant. Co se týče průkaznosti, jsou ve všech třech variantách výsledky statisticky neprůkazné.

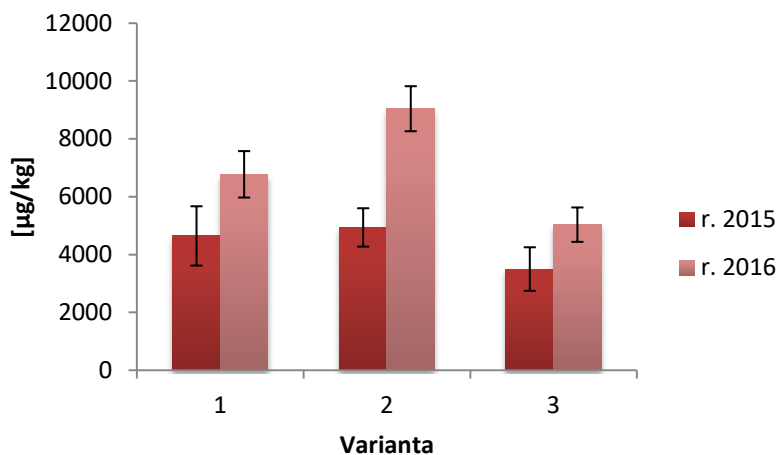


Graf 1 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro deoxynivalenol

7.1.2 DON-3-glukosid

Hojně zastoupený byl také deoxynivalenol-3-glukosid (22 %) který patří k tzv. maskovaným mykotoxinům, jimiž se zabývá kapitola Mykotoxiny. Jeho koncentrace se dle grafu č. 2 v roce 2016 zvýšila u varianty 2, tedy varianty ošetřené fungicidními

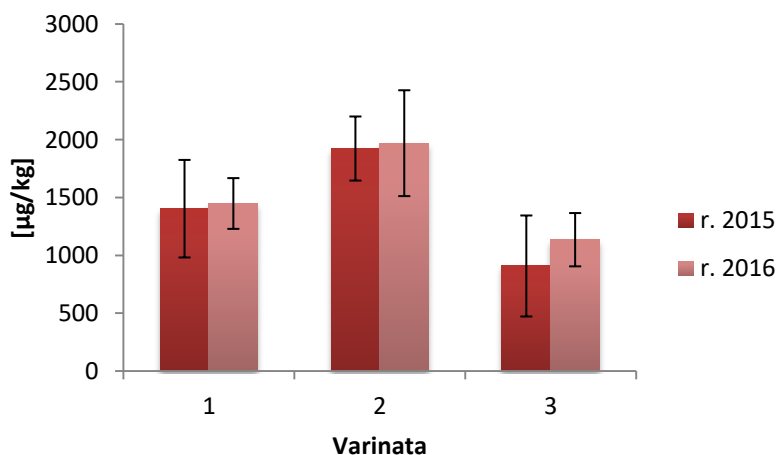
prostředky, průměrně až o 45 %. Zároveň jsou rozdíly průměru této varianty považovány za jednoznačně statisticky průkazné.



Graf 2 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro deoxynivalenol-3-glukosid

7.1.3 3-acetyl-DON

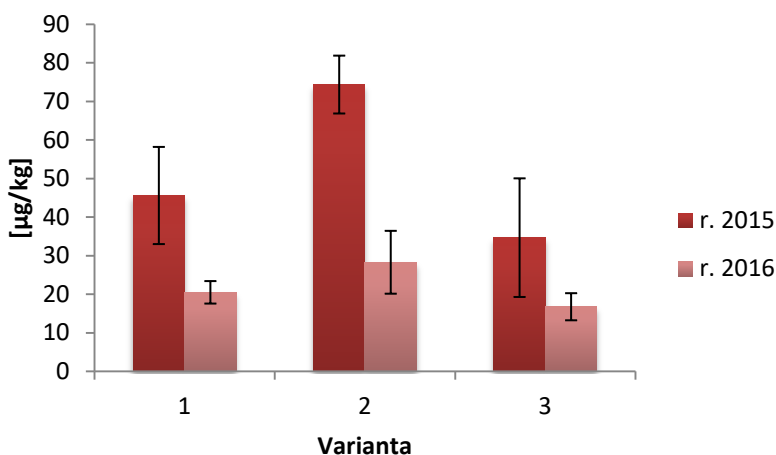
Dalším měřeným maskovaným mykotoxinem je 3-acetyl-deoxynivalenol, jehož průměrná koncentrace se ve vzorcích pohybovala kolem 7 %. Graf č. 3 znázorňuje, že kromě varianty 3, kdy došlo k průměrnému zvýšení tohoto toxinu ve vzorcích o 227 µg/kg, se v ostatních variantách množství zvýšilo pouze nepatrně. U 3-acetyl-DONu je nutné počítat se statistickou neprůkazností.



Graf 3 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro 3-acetyl-deoxynivalenol

7.1.4 15-acetyl-DON

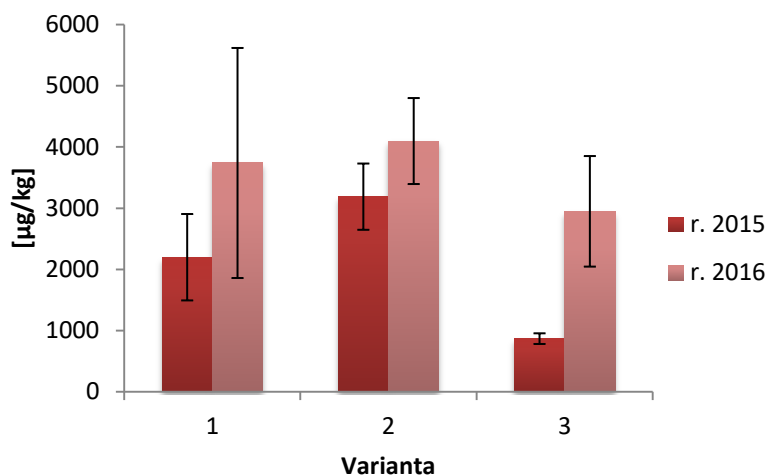
Graf č. 4 ukazuje, že u 15-acetyl-deoxynivalenolu došlo po roce skladování k jeho snížení a stalo se tak v průměru téměř o 50 %. 15-acetyl-DON patří taktéž do skupiny maskovaných mykotoxinů, o nichž ještě není příliš známo, a proto je obtížné zjistit z jakého důvodu vlastně došlo k tak rapidnímu snížení koncentrace tohoto toxinu po skladování. Jednou z možností je, že se tomuto mykotoxinu příliš nedaří v laboratorních podmínkách a při delším skladování suroviny dochází k jeho degradaci. Dalším a zároveň více akceptovatelným východiskem je jeho přechod do deoxynivalenolu, což také vysvětluje jeho poměrně vysoké množství ve vzorcích. Statistická průkaznost u tohoto toxinu se ukázala u variant 1 a 2.



Graf 4 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro 15-acetyl-deoxynivalenol

7.1.5 Zearalenon

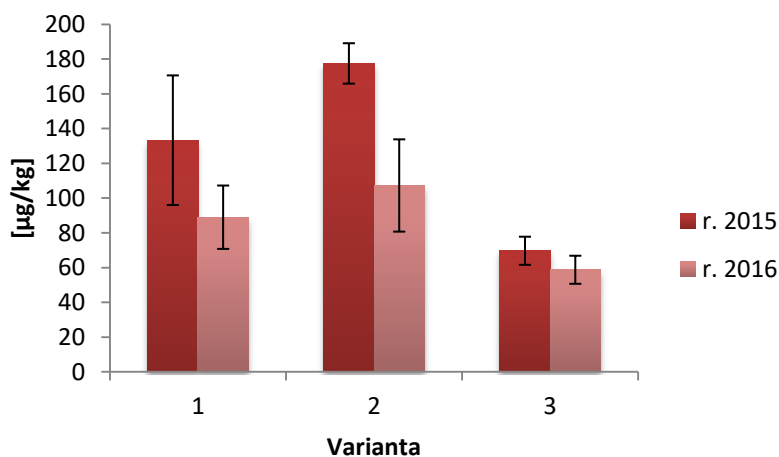
Množství zearalenonu ve vzorcích se pohybovalo průměrně okolo 11 %. Nejvyšší naměřené množství bylo 4 777 µg/kg u vzorku varianty 2 a to v roce 2016. Z grafu č. 5 lze vyčíst, že k nejvyššímu skoku došlo u varianty 3, kdy se po roce skladování zvýšil průměrný obsah zearalenonu až o 71 %. Pouze u této varianty jsou data statisticky průkazná.



Graf 5 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro zearalenon

7.1.6 β -zearalenon

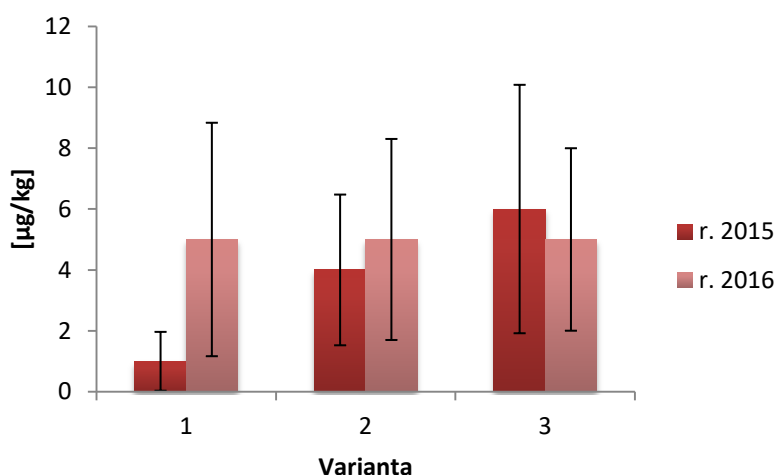
Dalším analyzovaným mykotoxinem, který je spolu s α -zearalenonem klasifikován jako metabolit zearalenonu je beta-zearalenon. Graf č. 6 ukazuje, že na rozdíl od většiny mykotoxinů se po roce skladování jeho obsah snížil a to u všech variant. Může to být způsobeno například tím, že došlo v době skladování k metabolizaci β -zearalenonu na samotný zearalenon, stejně jako tomu bylo u 15-acetyl-DONu. Průkaznost je ověřena jen u varianty 2, kde bylo zjištěno také nejvyšší množství tohoto toxinu.



Graf 6 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro beta-zearalenon

7.1.7 Enniatin A

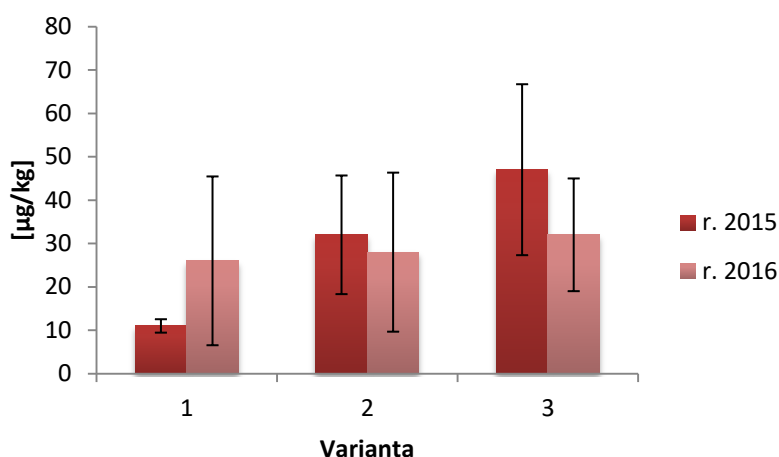
Množství enniatinu A se u ošetřených variant snížilo pouze o jednotku. Graf č. 7 poukazuje na více viditelný rozdíl u kontrolní varianty, kdy se koncentrace enniatinu A v roce 2016 zvýšila v průměru o 80 %. Nejvyšší množství tohoto toxinu představovalo pouhých 10 µg/kg u konkrétního vzorku varianty 3 v roce výsevu. O žádné z variant nelze tvrdit, že se jedná o statistickou průkaznost.



Graf 7 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro enniatin A

7.1.8 Enniatin A1

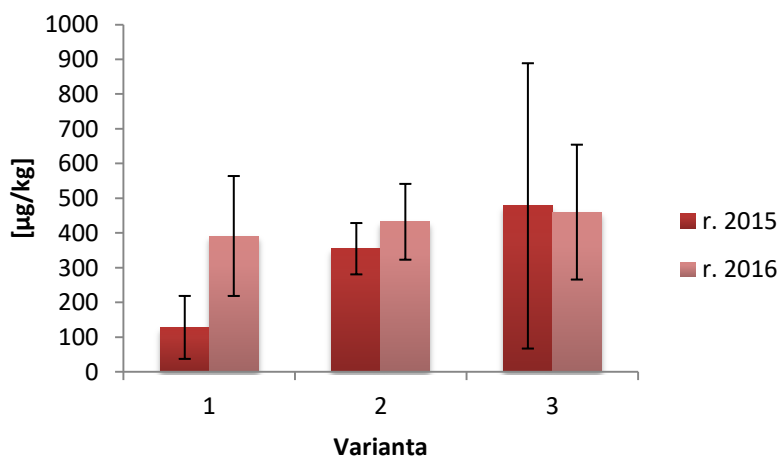
Ke zvýšení enniatinu A1 došlo po roce skladování pouze u neošetřené varianty a to o cca 60 %. Ostatní varianty vykazují dle grafu č. 8 snížení tohoto toxinu. Nejvyšší naměřené množství enniatinu A1 bylo 70 µg/kg u jednoho ze vzorků třetí varianty a to v roce 2015, tedy ještě před skladováním. Toto množství se u stejného vzorku následně snížilo na 40 µg/kg. Průkaznost u variant tohoto toxinu nebyla taktéž potvrzena.



Graf 8 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro enniatin A1

7.1.9 Enniatin B

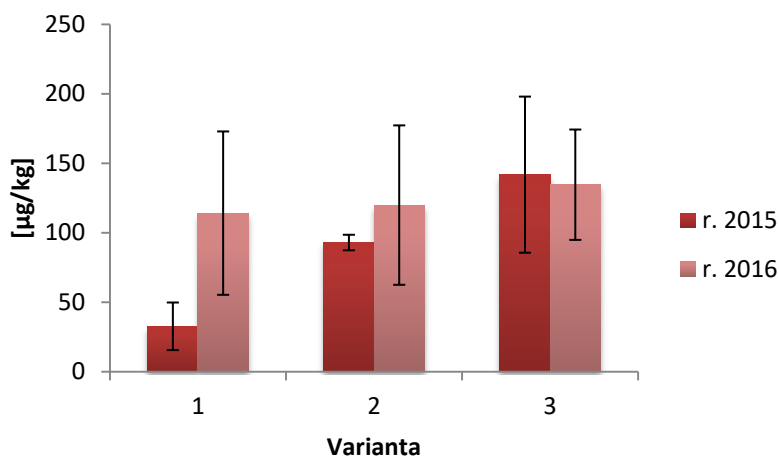
Graf č. 9 znázorňuje výsledky analýzy dalšího mykotoxinu ze skupiny enniatinů. Je patrné, že kontrolní varianta, tedy varianta neošetřená vykazovala v roce 2016 prudký nárůst tohoto toxinu a to o téměř 67 %. U druhé varianty došlo taktéž ke zvýšení, ale ne tak rapidnímu. Varianta 3, taktéž ošetřená fungicidními prostředky, zaznamenala velmi nepatrné snížení a to ze 478 µg/kg na 460 µg/kg. V případě enniatinu B jsou ve všech variantách výsledky statisticky neprůkazné.



Graf 9 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro enniatin B

7.1.10 Enniatin B1

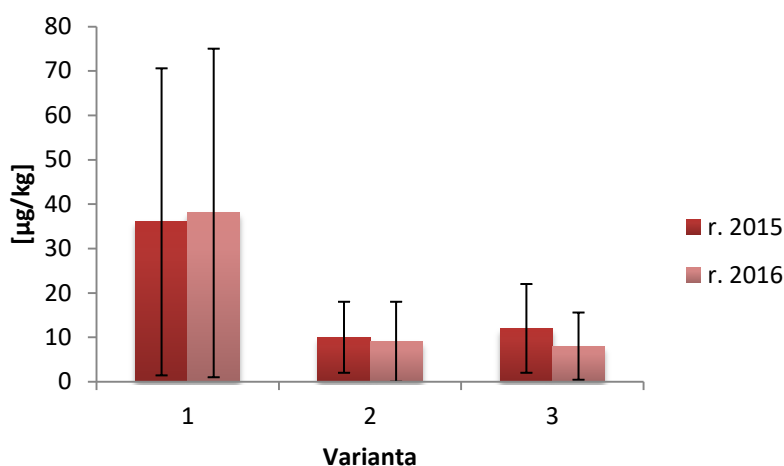
Dle grafu č. 10 lze konstatovat, že stejně jako u enniatinu B došlo po roce skladování k nárůstu enniatinu B1 a to u varianty 1 a 2, kdy byl největší přírůstek taktéž zaznamenán právě u neošetřené varianty. Třetí varianta vykazovala opět jen velmi nepatrný pokles – o pouhých 6 %. U tohoto toxinu se průkaznost také nepotvrdila.



Graf 10 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro enniatin B1

7.1.11 Alternariol

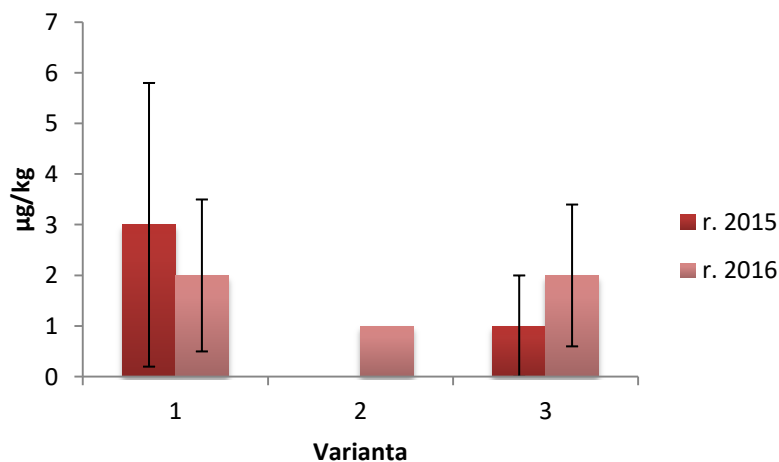
Nejvyšší obsah alternariolu byl změřen u kontrolní varianty v roce 2016 – 38 µg/kg. Ošetřené varianty vykazovaly nízký obsah toxinu, v rozpětí pouhých 8–12 µg/kg. Po roce skladování došlo u variant 2 a 3 k mírnému snížení množství tohoto alternariového mykotoxinu. Graf č. 11 poukazuje na to, že statistická průkaznost nebyla opět potvrzena ani u jedné z variant.



Graf 11 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro alternariol

7.1.12 Alternariol-methylether

U alternariol-methyletheru byl zjištěn nejnižší obsah, kdy se maximum pohybovalo okolo pouhých 3 µg/kg. V roce 2015, tedy v roce výsevu ječmene, nebyl tento mykotoxin detekován u 5 vzorků, po roce skladování, byla nulová hodnota u 4 vzorků. Z grafu č. 12 lze vyčíst, že u druhé varianty se i celkový průměr všech vzorků před skladováním rovnal nule. U kontrolní varianty se obsah alternariol-methyletheru snížil o 1 µg/kg a o stejný díl se množství toxinu u varianty 3 snížilo. Vzhledem k průměrné nulové hodnotě u druhé varianty, byla statistická průkaznost počítána pouze u varianty 1 a 3 a to bez jejího potvrzení.



Graf 12 Výsledky analýzy – průměr jednotlivých variant pro alternariol-methylether

Dle grafů lze konstatovat, že u většiny mykotoxinů došlo po roce skladování ke zvýšení jejich obsahu v surovině, např. množství deoxynivalenolu se průměrně zvýšilo o 23 %, DON-3-glukosid stoupl o 37 % a průměrný obsah zearalenonu se zvýšil až o 42 %.

U některých mykotoxinů se vlivem skladování jejich množství naopak snížilo. Jak již bylo zmíněno, k redukci obsahu dochází nejčastěji díky přechodu metabolitů jednotlivých mykotoxinů do jejich základní podoby. Hlavními takovými příklady byly 15-acetyl-DON, beta-zearalenon a enniatin A1. Snížení ostatních toxinů bylo ve většině případů pouze nepatrné.

8 DISKUZE

Pospíchalová (2013) – Výsledky monitoringu mykotoxinů v krmivech, provedla stanovení mykotoxinů u několika materiálů – ječmen, oves, žito, pšenice, kukuřice, seno, siláž a další. Vzhledem k tématu této diplomové práce jsou pro účely diskuze stěžejní výsledky pro ječmen.

Stejně jako v našem pokusu byl u ječmene nejvíce zastoupen deoxynivalenol, který se vyskytoval ve 30 % vzorků. V našem případě se jednalo o 100 %, čili každý z 9 analyzovaných vzorků obsahoval DON. Zearalenon byl detekován u cca 17 % vzorků. Dalšími zastoupenými mykotoxiny byly T-2 toxin, HT-2 toxin, ochratoxin fumonisin B1 a fumonisin B2, které nebyly v našem pokusu vůbec odhaleny, respektive se jednalo o nulovou hodnotu. Ačkoli se výsledky poměrně liší, je třeba mít na paměti, že v případě Pospíchalové se jednalo o přirozenou kontaminaci materiálu, nikoli o umělou inokulaci, a bylo stanoveno jiné spektrum mykotoxinů. Práce Pospíchalové nezahrnovala např. maskované mykotoxiny, které dokážou s výslednými hodnotami výrazně pohnout. Je také zapotřebí konstatovat, že došlo ke srovnání pouze s rokem výsevu, tedy ještě před uskladněním. M. Pospíchalová se ve své práci věnuje taktéž vlivu doby odběru vzorků na výskyt mykotoxinů, který se nám vzhledem k časové tísní, nepodařilo zrealizovat.

Dalším obdobným pokusem, který byl ovšem zaměřen na ozimou pšenici, se zabývala Horáková (2013) – Fuzáriové mykotoxiny v odrůdách ozimé pšenice.

V práci se jedná o dva odlišné způsoby infekce:

- 1) Přirozená infekce – z předplodiny, kterou byla kukuřice. Na poli se ponechalo definované množství posklizňových zbytků, které mohou být často zdrojem infekce. V tomto případě se stanovovalo množství deoxynivalenolu pomocí metody ELISA.
- 2) Umělá inokulace - pomocí suspenze kolonií *F. culmorum*, která byla využita i v našem pokusu. Infikováno bylo 10 klasů od různých odrůd a opět byl stanoven obsah deoxynivalenolu pomocí ELISA metody. Symptomy se hodnotily na stupnici od 1 do 9 a to 14, 21 a 28 dní po inokulaci.

Z výsledků tohoto pokusu je patrné, že se vyšší obsah DON vyskytoval u druhé varianty, tedy po umělé inokulaci *Fusarium culmorum* – maximální hodnota se

pohybovala okolo 135 mg/kg . Tento výsledek se dal očekávat vzhledem k tomu, jak extrémní výskyt fuzárií v našem pokusu taktéž mnohonásobně zvýšil množství mykotoxinů v ječmeni. Pro srovnání - nejvyšší hodnota deoxynivalenolu u ječmene jarního představovala u jednoho ze vzorků až 210 mg/kg.



Obr. 2 Pšenice ozimá – poškozená zrna po infekci *F. culmorum* (v levo) v porovnání se zdravými zrny (Horáková, 2013)

U přirozené infekce pomocí posklizňových zbytků se maximální množství DON pohybovalo kolem 3,4 mg/kg, což lze považovat za zásadní rozdíl.

Z materiálů se bohužel nebylo možné dozvědět, jaké byly rozdíly obsahu mykotoxinu v jednotlivých etapách měření, tedy po 14, 21 a 28 dnech.

Problematikou mykotoxinů v krmných surovinách se zabývala také Sýkorová a kol. (2004) - Mykotoxiny - stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR, v Evropě a dalších zemích. Kde studovaným materiálem byl soubor vzorků zrna odrůd jarního ječmene, žita a ozimé pšenice z různých okresů ČR. Z každého průměrného vzorku bylo vyčleněno 300 náhodně odebraných zrn, zbytek byl pak rozemlet na laboratorním mlýnku.

Jednalo se o projekt probíhající v letech 2000–2002, kde se kromě reakce různých odrůd daných plodin na umělou infekci definovaným izolátem *Fusarium culmorum*, zjišťovali také hladiny deoxynivalenolu a jaké je u nich druhové zastoupení. Pro naše účely jsou opět důležité zejména výsledky analýzy ječmene jarního

Ze sklizně z roku 2000 analyzováno 33 vzorků ječmene jarního (7 odrůd z 24 okresů) – průměrný obsah DON byl 0,22 mg/kg a množství zearalenonu se pohybovalo v rozsahu 0,02–0,075 mg/kg. V roce 2001 šlo o 32 vzorků ječmene jarního, kde byl průměrný obsah DON 0,136 mg/kg a kde byly identifikovány druhy plísní jako *Fusarium culmorum*, *graminearum*, *oxysporum*, *tricinctum*, *poae*, *avenaceum* a rod *Alternaria*. Ze sklizně 2002 bylo testováno 30 vzorků ječmene jarního (5 odrůd z 24 okresů), kde se průměrný obsah deoxynivalenolu pohyboval okolo 0,237 mg/kg a byly zde nalezeny stejné druhy plísní jako v roce předchozím.

Z výsledků lze konstatovat, že oproti hodnotám zjištěným v této diplomové práci se jedná pouze nepatrné množství, kdy jde o rozdíly v řádech několika tisíc. Průměrný obsah DON v našem pokusu činil 11,224 mg/kg v roce výsevu. Je to dáno opět tím, že nešlo o umělou inokulaci - vzorky byly odebrány z provozních ploch.

9 ZÁVĚR

Z výsledků pokusu je zřejmé, že při skladování není vliv ošetření porostu fungicidy příliš velký. V procesu skladování se obsah mykotoxinů zvýšil jak u variant ošetřených, tak i u těch neošetřených (kontrolních) a to i přes optimální skladovací podmínky. Je důležité si uvědomit, že se jednalo o naprostý extrém, kdy byla využita umělá inokulace a hodnoty byly tedy daleko vyšší, nežli v běžných polních podmínkách a leckdy několikanásobně převyšovaly směrné hodnoty. Umělé naočkování nám ale umožnilo sledovat daleko výraznější rozdíly v hodnotách a tím se lépe orientovat ve výsledcích. Je otázkou, zda by vyšší koncentrace fungicidních prostředků měla vliv na nynější výsledek a došlo tak ke snížení obsahu plísní a jejich toxinů. Lze tedy konstatovat, že aplikace fungicidních preparátů má přímý účinek na porost pouze v době vegetace, kdy se jejich prostřednictvím může snížit vliv napadení rostlin fuzáriemi.

Z pokusu ovšem jasně vyplynula skutečnost, že naprostá většina mykotoxinů objevujících se běžně v obilninách se po určité době skladování zvyšuje. Jednoznačně nejvíce zastoupeným mykotoxinem byl deoxynivalenol s průměrným obsahem až 57 % po roce skladování v laboratorních podmínkách. Jak již bylo řečeno, jedná se o nejznámější a nejběžnější kontaminant obilí a jeho produktů a proto není pochyb o relevantnosti tohoto výsledku. Dalšími hlavními zástupci byly DON-3-glukosid (maskovaný mykotoxin) a zearalenon, který taktéž patří k nejčastěji se vyskytujícím mykotoxinům v krmivech.

Pro průkaznost je velmi důležitý správný odběr vzorků k analýze, vzhledem k tomu, že kontaminace suroviny mykotoxiny není nikdy rovnoměrná. Pro přesvědčivější závěry by bylo vhodné pokus zopakovat a zároveň zvolit i větší množství vzorků. Tyto možnosti jsou bohužel omezeny vysokou cenou.

Výsledky tohoto pokusu by tak měly být impulzem pro každého zemědělce nebo zemědělský podnik, aby se zamyslel nad možnostmi, které má a které může využít zejména v souvislosti se skladováním a ošetřením porostu před vlastním využitím. Dobrá hygienická jakost krmiv je základem zdraví zvířat a také základnou pro zisk každého podniku. Proto je důležité, dbát na správné podmínky pěstování tzn. prvovýroby, ale i následného skladování, aby bylo zabráněno rozvoji producentů toxinů v krmných surovinách, a tak se předešlo možným zdravotním komplikacím, které mohou často souviset s finančním rizikem a ztrátovostí.

10 LITERÁRNÍ ZDROJE

BALABÁNOVÁ, M. Krmné směsi. In: Portál e-learningových prezentací [online]. Mendelova univerzita v Brně, 2014 [cit. 2017-01-06]. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=894

BENEŠOVÁ, K., M. ČUMOVÁ, S. BĚLÁKOVÁ, R. MIKULÍKOVÁ a Z. SVOBODA. Výskyt „emerging“ mykotoxinů v pivovarských surovinách. Kvasný průmysl [online]. VÚPS, a. s., Sladařský ústav Brno, ÚKZÚZ, Národní referenční laboratoř, 2015, 6 s. [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/2015/04/02.pdf>

BENNETT, J. W. a M. KLICH. Mycotoxins. In: The National Center for Biotechnology Information: US National Library of Medicine National Institutes of Health [online]. 2003 [cit. 2017-02-13]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/>

DOLEŽAL, P. Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat. Olomouc: Petr Baštan, 2012, 307 s. ISBN 978-80-87091-33-3.

DVOŘÁK, J. Skladování a ošetřování zrnin. Praha: Výzkumný ústav zemědělské techniky, 2002, 43 s. ISBN 80-238-9953-8.

FLORIÁN, M. Systém kontroly a monitoringu mykotoxinů v krmivářské praxi [online]. ÚKZÚZ Brno, 2013, 29 s. [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: eagri.cz/public/web/file/232491/Florian_Mykotoxiny_2013.pdf

HAJŠLOVÁ, J., M. ZACHARIÁŠOVÁ, A. MALACHOVÁ, M. KOSTELANSKÁ a V. KOCOUREK. Mykotoxiny [online]. In: . Praha 6: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009, 82 s. [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf>

HORÁKOVÁ, V. Fuzáriové mykotoxiny v odrůdách ozimé pšenice [online]. Brno, 2013, 15 s. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/232495/Horakova_Mykotoxiny_2013.pdf

HORKÝ, Pavel a Jiří SKLÁDANKA. Mykotoxiny ve výživě zvířat. V Brně: Mendelova univerzita, 2015. ISBN 978-80-7509-357-8.

KALINOVÁ, J.. Posklizňová úprava, skladování a zpracování rostlinných produktů [online]. 2007, 19 s. [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: <http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/ecologica/kva.pdf>

KRULIŠ, Z., J. BRZOVSKÝ, M. POSPÍŠILOVÁ, V. HLADÍK, J. SAGLENA, P. ŠMÍDA, P. VLAŽNÝ, P. PŘÍKAZSKÝ, H. SLAVÍKOVÁ, P. EGERT, F. ŘEZANINA a V. MICHÁLEK. Přípravky na ochranu rostlin, osiva a prostředky pro DDD činnost. Bayer katalog přípravků 2015 [online]. Praha: Bayer CropScience, 2014, 238 s. [cit. 2017-02-22]. Dostupné z: <file:///C:/Users/katka/Downloads/Bayer%20katalog%20p%C5%99%C3%ADpravk%C5%AF%202015low.pdf>

Libčany. In: Regionální informační servis [online]. Ministerstvo pro místní rozvoj ČR, 2015 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://www.risy.cz/cs/vyhledavace/obce/detail?zuj=570249&zsj=081728>

LILLARD-ROBERTS, S. Mycotoxin List. Micotoxinas online [online]. 2016, 13 s. [cit. 2017-04-21]. Dostupné z: <http://www.micotoxinas.com.br/Boletim46.pdf>

MALÍŘ, F. a V. OSTRÝ. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.

MOUDRÝ, J. Základy pěstování ovsa. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1993, 32 s. ISBN 80-7105-044-X.

Mykotoxiny u zvířat. In: NTG Agri [online]. 2012, 31 s. [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: www.ntgagri.cz/?filename=NTGagri-Mykotoxiny-u-zvirat.pdf

NEDĚLNÍK, J., H. MORAVCOVÁ a A. HONZLOVÁ. Mykotoxiny v krmivech. Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o. Troubsko [online]. 2006, 9 s. [cit. 2017-01-11]. ISSN 1212-9992. Dostupné z: www.vupt.cz/content/files/pub_06/nedel_06_01.pdf.

PETR, J.. Základy pěstování žita. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1995, 30 s. Rostlinná výroba (zelená ř.). ISBN 80-7105-108-X.

POSPÍCHALOVÁ, M.. Výsledky monitoringu mykotoxinů v krmivech (ÚKZÚS) [online]. Brno, 2013, 14 s. [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/232493/Pospichalova_seminar2013.pdf

PRUGAR, J. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008, 327 s. ISBN 978-80-86576-28-2.

Průměrná roční teplota vzduchu v roce 2015. In: Portál ČHMÚ: Historická data [online]. 2016 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mapy-charakteristik-klimatu#>

RODRIGUES, I. To be or not to be...mycotoxicosis. In: Biomin.net [online]. 2014, 4 s. [cit. 2017-02-13]. Dostupné z: <http://temp.biomin.net/knowledge-center/articles/articles-details/article/to-be-or-not-to-be-mycotoxicosis/>

SKALICKÝ, J. Ošetřování a skladování zrnin ve věžových zásobnících a halových skladech: metodická příručka. Praha: Výzkumný ústav zemědělské techniky, 2008, 80 s. [cit. 2017-01-11]. ISBN 978-80-86884-38-7.

SKLÁDANKA, J. Pícninářství. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014, 367 s. [cit. 2017-01-11]. ISBN 978-80-7509-111-6.

SKLÁDANKA J., J. NEDĚLNÍK, V. ADAM, P. DOLEŽAL, H. MORAVCOVÁ a V. DOHNAL. Forage as a Primary Source of Mycotoxins in Animal Diets. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2011, 14 s. [cit. 2017-01-11]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: http://www.mdpi.com/search?q=Forage+as+a+Primary+Source+of+Mycotoxins+in+Animal+Diets&authors=&article_type=&journal=ijerph&ion=&special_issue=&search=Search

SLONEK, Z. Hladina mykotoxinů v průběhu skladování obilovin. Brno, 2008, 88 s. [cit. 2016-12-27]. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. Viera Šottníková, Ph.D.

Situační výhledová zpráva: *Obiloviny* [online]. Praha 1: Ministerstvo zemědělství, 2015, 114 s. [cit. 2016-12-27]. ISSN 1211-7692. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/445783/SVZ_Obiloviny_12_2015.pdf

ŠÝKOROVÁ, S. a E. MATĚJOVÁ. Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě: Výsledky 3-letého monitoringu obsahu fusariových mykotoxinů v zrna obilovin v ČR. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí [online]. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha 6, 2004, 35 s. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-15-03.pdf>

ŠIMŮNEK, J. Plísňe a mykotoxiny [online]. Brno, 2004, 72 s. [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf

TAUFEROVÁ, A. Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 168 s. [cit. 2017-02-20]. ISBN 978-80-7305-692-6.

TAUFEROVÁ, A. Rostlinná produkce. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 140 s. [cit. 2017-04-20]. ISBN 978-80-7305-716-9.

Úhrn srážek v roce 2015. In: Portál ČHMÚ: Historická data [online]. 2016 [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/mapy-charakteristik-klimatu#>

Úřední věstník Evropské unie: Doporučení Komise č. 2006/576/ES o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat. In: Příloha - Směrné hodnoty [online]. Brusel, 2006, 3 s. [cit. 2017-04-05]. Dostupné z: <http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/NL-mykotox-ht2.pdf>

TVARŮŽEK, L., P. MATUŠÍNKSY a M. VYŠOHLÍDOVÁ. Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s umělou inokulací obilnin fuzáriózami klasů [online]. Kroměříž, 2012, 16 s. [cit. 2017-04-20]. ISSN 978-80-87555-09-5. Dostupné z: <http://www.vukrom.cz/vyzkum/patenty-vzory/metodika-inocul-pdf>

ZIMOLKA, J. Ječmen - formy a užitkové směry v České republice. Praha: Profi Press, 2006, 200 s. [cit. 2017-04-20]. ISBN 80-86726-18-5.

ZIMOLKA, J. Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna. Praha: Profi Press, 2005, 179 s. [cit. 2017-04-20]. ISBN 80-86726-09-6.

Zákon č. 91/1996 Sb, o krmivech, příloha č. 3 k vyhlášce č. 194/1996 Sb.: Nežádoucí látky. In: Ministerstvo zemědělství, 1996, částka 58. Dostupné také z: https://www.beck-online.cz/bo/attachments/Priloha_Sb_1996_194-3.pdf

Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, sbírka zákonů č. 45/2008: § 2, odstavec c). In: Ministerstvo zemědělství, 1996, částka 14. Dostupné také z: http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/zakon_91_1996_okrmivech-08.pdf

Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, vyhláška č. 356/2008: příloha č. 4, část A. In: Ministerstvo zemědělství, 1996, částka 116. Dostupné také z: http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/Vyhlaska_356_2008_o_krmivech.pdf

11 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Příklady toxikogenních mikromycetů rodu *Aspergillus* a jejich teleomorf – str. 29

Tab. 2 Příklady toxikogenních mikromycet rodu *Penicillium* – str. 30

Tab. 3 Příklady potencionálně toxigenních zástupců rodu *Fusarium* – str. 31

Tab. 4 Dělení mykotoxinů podle toxicity (kvantitativní) – str. 32

Tab. 5 Dělení mykotoxinů podle toxicity (kvalitativní) – str. 32

Tab. 6 Nejvyšší přípustné obsahy aflatoxinu B1 dle vyhlášky o krmivech – str. 41

Tab. 7 Směrné hodnoty pro deoxynivalenol – str. 41

Tab. 8 Směrné hodnoty pro zearalenon – str. 42

Tab. 9 Sledované fragmentační přechody analyzovaných mykotoxinů – str. 47

12 SEZNAM ZKRATEK

FAO	Food and Agriculture Organization
SVZ	Situační výhledová zpráva
ČSN	Česká technická norma
BMK	Bakterie mléčného kvašení
ČHMÚ	Český hydrometeorologický ústav
RIS	Regionální informační servis
DON	Deoxynivalenol
NIV	Nivalenol
ZEA	Zearalenon
MON	Monilifimin
FUS C	Fusarin C
FUM	Fumonisin
FUS X	Fusarenon X
DAS	Diacetoxyscirpenol