

**Mendelova Univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav výživy zvířat a pícninářství**

---



**Mykotoxiny v obilovinách a jejich vliv na zdraví  
hospodářských zvířat**

Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*

Ing. Pavel Horký, Ph. D.

*Vypracovala:*

Izabela Černá

---

Brno 2015

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Mykotoxiny v obilovinách a jejich vliv na zdraví hospodářských zvířat vypracovala 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 ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, 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**

Touto formou poděkování bych chtěla poděkovat panu Ing. Pavlu Horkému, Ph. D. především za jeho trpělivost. Dále také za jeho náležité a časně dodávání případných poznámek k práci, ochotu poradit a odpovědět na jakoukoli tematickou otázku. Obrovské poděkování patří také mé nejbližší rodině, která mě po celou dobu studia podporovala a povzbuzovala.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce se zabývá problematikou vlivu mykotoxinu na organismus zvířat, která je dnes velmi úzce probádaná, a vědecké výzkumy jsou zatím stále na začátku. Do nedávna byl vliv plísní a jejich derivátů přehlížen. Touto prací jsem se zaměřila na vliv derivátů plísní přijímaných obilnými a směsnými krmivy na organismus hospodářských zvířat, ale i domácích (zdomácnělých) zvířat. Cílem této výzkumné práce byl získání vědeckých informací založených na konkrétních výzkumech a pozorováních. S následným cílem pokračovat již v konkrétním výzkumu v navazujícím Magisterském studiu.

Klíčová slova: plísně, mykotoxiny, mykotoxiny v krmivech, efekt mykotoxinů, degradace, analýzy, legislativa

## **Abstract**

The thesis deals with the impact of mycotoxins on animal organism is today very closely explored and scientific researches are still at the beginning. Until recently, it was the influence of mold and their derivatives overlooked. This work is focused on the impact of derivatives of the fungi on the body of livestock, but also domestic (domesticated) animals. The aim of this research work was to gain scientific information based on specific research and observations. With the subsequent order to continue research in particular in the follow-up master study.

Key words: mold, mycotoxins, mycotoxins in the feed, the effect of mycotoxins, degradation of mycotoxins, analysis of mycotoxins, legislation

## Obsah

1 ÚVOD .....	7
2 CÍL PRÁCE.....	8
3 SOUČASNÝ STAV POZNATKŮ .....	9
3. 1 Vláknité mikroskopické houby (plísně).....	9
3. 1. 1 Obecná charakteristika.....	9
3. 1. 2 Ekologie a výskyt vláknitých mikroskopických hub .....	10
3. 1. 3 Morfologie a cytologie plísni.....	12
3. 1. 4 Rozmnožování a růst (v závislosti na podmínkách prostředí).....	13
3. 1. 5 Faktory ovlivňující růst plísni a tvorbu mykotoxinů v prostředí.....	15
3. 1. 6 Využití a studie mikroskopických vláknitých organismů a jejich metabolitů .....	16
3. 2 Mykotoxiny.....	16
3. 3 Mykotoxiny z hlediska kontaminace obilovin a krmiv .....	17
3. 3. 1 Negativní efekt mykotoxinů – obecně .....	17
3. 3. 2 Základní příčiny výskytu mykotoxinů u rostlin a v krmivech.....	18
3. 4 Krmivářsky nejvýznamnější mykotoxiny .....	18
3. 4. 1 Aflatoxiny (B1, B2, G1, G2) – kukuřice, sója.....	18
3. 4. 2 Ochratoxin A - obiloviny .....	19
3. 4. 3 Citrinin – krmiva, potraviny .....	20
3. 4. 4 Patulin – obiloviny, pečivo, sýry, ovoce.....	20
3. 4. 5 Zearalenon – kukuřice, obiloviny, sója, siláže.....	20
3. 4. 6 Deoxynivalenol (vomitoxin) DON – kukuřice, obiloviny.....	21
3. 4. 7 T- 2 toxin (trichoteceny) – ječmen, pšenice, proso, saflor .....	21
3. 4. 8 Kyselina cyklopiazonová – obiloviny, sýry, maso, vejce.....	21
3. 4. 9 Fumonisin – kukuřice, potraviny .....	21

3. 4. 10 Alternariové mykotoxiny – ovoce, obiloviny .....	22
3. 5 Maskované mykotoxiny .....	22
3.6 Základní metody analýzy výskytu mykotoxinů v krmivech.....	23
3. 6. 1 Metoda analýzy HPLC.....	23
3. 6. 2 Metoda analýzy ELISA .....	24
3. 7 Možnosti omezení přítomnosti mykotoxinů v produkci/krmivech.....	25
3. 8 Biologický vliv mykotoxinů na organismus hospodářských zvířat.....	25
3. 8. 1 Vliv mykotoxinů na hospodářská zvířata – přežvýkavci.....	26
3. 8. 2 Vliv mykotoxinů na koně .....	28
3. 8. 3 Vliv mykotoxinů na prasata .....	31
3. 8. 4 Vliv mykotoxinů u drůbeže .....	32
3. 8. 5 Vlivy mykotoxinu na domestikovaná (zdomácnělá) zvířata .....	33
3. 9 Degradace mykotoxinů .....	34
3. 9. 1 Fyzikální degradace mykotoxinů.....	34
3. 9. 2 Biologické degradace mykotoxinů .....	37
3. 10 Mykotoxiny v krmivech legislativa .....	39
3. 11 Limity.....	40
Limity v krmivech pro Aflatoxin B1 v ČR.....	40
Směrné hodnoty v krmivech pro Deoxynivalenol v ČR.....	40
Směrné hodnoty v krmivech pro Zearalenon v ČR .....	41
Směrné hodnoty v krmivech pro Ochratoxin A v ČR .....	41
Směrné hodnoty v krmivech pro Fumonisin B1 + B2 v ČR.....	42
4 ZÁVĚR.....	43
5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	44

## 1 ÚVOD

V současné době je známo více než 300 mykotoxinů, které se vyznačují větší či nižší toxicitou. V některých případech jsou mykotoxiny i součástí léčiv. Pro pochopení vzniku mykotoxinů je zapotřebí mít znalosti o vláknitých houbách – plísních. Stáří plísní se odhaduje na 300 milionů let a předpokládá se, že při zrodu života na zemi byl jejich význam zásadní. Mikroskopické houby jsou jednou z důležitých funkčních složek podílející se na fungování všech ekosystémů. Dnes hrají významnou roli ve farmaceutickém, potravinářském, krmivářském a jiném průmyslu. Několik druhů slouží jako modelové organismy k získávání vědeckých znalostí v oblasti genetiky, fyziologie, biochemie a molekulární biologie.

Mikroskopické vláknité houby mají však i negativní význam svého působení a tou je mimo jiné jejich produkce sekundárních metabolitů (mykotoxinů) v obilovinách. Mají ze všech původců chorob rostlin největší význam. Ve středoevropských podmínkách je jimi vyvoláno 82-84 % všech ekonomicky závažných chorob rostlin. Odhaduje se kolem 10 000 producentů mykotoxinů znehodnocujících potraviny a krmiva. Počátky studie vlivu mykotoxinů na zdraví zvířat začaly ve spojitosti s vypuknutím neznámého onemocnění u krůt ve velké Británii v roce 1960. Současnou řešenou problematikou se také čím dál tím víc stávají maskované mykotoxiny, nebo také „skryté mykotoxiny“, či „konjugované mykotoxiny, byly objeveny v 80. letech minulého století. Celý výzkum maskovaných mykotoxinů stojí prakticky na počátku cesty. Vliv mykotoxinů na hospodářská zvířata je spojen s významnými ekonomickými ztrátami jak produkčními, tak i reprodukčními. Ne všechny druhy hospodářských zvířat se vyznačují stejnou citlivostí k působení mykotoxinů. Nejcitlivější jsou prasata a drůbež, zatímco vyšší toleranci lze hledat u přežvýkavců.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem bakalářské práce je shrnout poznatky z dosavadních významných výzkumů z pohledu působení mykotoxinů u hospodářských zvířat. Dále si bakalářská práce dává za cíl popsat hospodářsky významné mykotoxiny.



## 3 SOUČASNÝ STAV POZNATKŮ

### 3. 1 Vlákňité mikroskopické houby (plísňě)

#### 3. 1. 1 Obecná charakteristika

Vlákňité mikroskopické houby jsou definovány jako eukaryotické organismy vytvářející vlákňité mycelium na různém druhu substrátu. Patří do velké skupiny (Fungi, dříve Mycophyta) živých organismů s původním zařazením k rostlinné říši (FASSATIOVÁ, 1986).

Zažitý český název pro vlákňité mikroskopické houby „plísňě“ mají ekvivalent v anglickém jazyce „moulds“ a v německém „Die Schimmelpilze“. Zjednodušený název „plísňě“ zavedl botanik Karel Bořivoj Presl v první polovině 19. století u plísňě hlavičkové (*Mucor* spp. Presl); (OSTRÝ, 1998).

#### 3. 1. 1.1 Systematika klasifikace a charakteristické znaky

Dnes jsou pravé houby (Fungi) spolu s živočichy (Animalia) a dalšími heterotrofními skupinami organismů považovány za součást větší skupiny nazývané Opistoconta. Příbuznost a společenské znaky hub se ve větší míře shodují s živočichy než s rostlinami. Mezi společné znaky živočichů a hub patří chitinová struktura v buněčných stěnách, ukládání glykogenu, kódování tryptofanu, a postrádání asimilačních barviv (KOBLÍŽEK, 2007). Obě skupiny obsahují aktivní látku serotonin. Serotonin slouží jako přenašeč vzruchů v nervové tkáni (OSTRÝ, 1998).

Skupina Animalia i Fungi se rozmnožují buď pomocí výtrusů, nebo gamet s jediným hladkým bičíkem. Pravé houby (Fungi) nemají bičíkatá stádia. Pouze houby buněnkové (Chytridiomycota) si zachovaly tento primitivní znak gamety s hladkým bičíkem (BARR, 1992).

Systematika hub je značně složitá. Jedná se o heterogenní skupinu, nejen z hlediska fylogenetického vývoje a taxonomického řazení, ale i po stránce morfologických a ekologických nároků. Systematika organismů této linie zahrnuje houby, rzi, sněti, plísňě, kvasinky a mnoho dalších méně známých organismů. Bylo popsáno více než 70 000 druhů, odhadovaný počet je však okolo 1,5 milionů (AINSWORTH, 1995).

### **3. 1. 1. 2 Klasifikace (KOBLÍŽEK, 2007)**

Doména – Eukaria

Říše – Opistoconta

Animalia – živočichové

Choanoglagellata – trubénky

Ichtyosporea – parazité

Fungi – houby

Oddělení

Chytridiomycota – houby buněnkové

Zygomycota – houby spájkivé

Ascomycota – houby vřeckovýtrusé

Basidiomycota – houby stopkovýtrusé

Deuteromycota – houby nedokonale známé

Lichenomycota – lišejníky

### **3. 1. 2 Ekologie a výskyt vláknitých mikroskopických hub**

Stáří mikroskopických hub se odhaduje na 300 milionů let a považujeme je za pionýrské organismy. Houby a obzvláště mikroskopické houby, jsou životně důležité pro fungování všech ekosystémů.

Jsou velice adaptabilními organismy díky svému enzymatickému vybavení. Vyznačují se schopností uchytit se na jakémkoliv živném substrátu, všude tam kde jsou adekvátní vlhkostní a teplotní podmínky.

Běžná představa výskytu plísní je v místě vysoké vlhkosti a teploty. Je však nutné si uvědomit, že optimální podmínky mohou být pro jednotlivé druhy zcela rozlišné. Proto není překvapující, že časté místo jejich výskytu je na chladných, periodicky vyprahlých nebo jinak zdánlivě nehostinných místech (OSTRÝ, 1998).

Diverzita většiny skupin hub má tendenci se rozšiřovat v tropických oblastech. Detailní studie jsou však pořád ještě na začátku (WAITLING, 2002).

#### **3. 1. 2. 1 Sporulace, výskyt spor a jejich význam**

V životním prostředí jsou aktivně nebo pasivně uvolňované spory mikroskopických hub rozptýleny v ovzduší, vodě, půdě, na povrchu i uvnitř živých a odumřelých organismů, předmětech, plochách, v potravinových surovinách rostlinného původu, potravinách i krmivech (OSTRÝ, 1998).

Primární funkcí některých spor není rozptýlení, ale přežití rezistentní buňky v nepříznivých podmínkách prostředí. Životní formy tohoto taxonu se rozlišují podle způsobu zisku energie na saprofyty, obligátní parazity, mykorrhizní a lichenizující houby (KOBLÍŽEK, 2007).

**Tabulka č. 1: Základní ekologické skupiny mikroskopických hub a jejich výskyt (OSTRÝ, 1998)**

SKUPINA	PODSKUPINA	ZÁSTUPCI
<b>Půdní</b>	-	Setkáváme se zde se zástupci oomycet, kvasinek a s anamorfami a telemorfami zástupců třídy Ascomycetes a Basidiomycetes.
<b>Na rostlinných zbytcích</b>	<i>Dřevní</i>	Většina dřevních hub patří k zástupcům třídy Basidiomycetes a Ascomycetes.
	<i>Na bylinných zbytcích</i>	Celulozovorní houby, ze zástupců třídy Basidiomycetes a Ascomycetes.
<b>Se zvláštními ekologickými nároky</b>	<i>Anthrakofilní</i>	V našich podmínkách je známo několik desítek druhů hub, které rostou výhradně na spáleništích.
	<i>Keratofilní</i>	Houby rozkládají keratin z živočišné kůže a jejich derivátů (např. vlasy). Patří k nim především zástupci třídy Ascomycetes čeledi Gymnoascaceae (Ctenomyces, Arthroderma) s konidiálními stádii Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton, jež souhrnně nazýváme Dermatophyta.
	<i>Koprofilní</i>	Výtrusy hub se dostávají na exkrementy vzduchem a pouze na nich jsou schopny vyklíčit, či musí projít trávicím traktem živočichů a pak na exkrementech vyklíčí. Existuje řada druhů především zástupci ze třídy Zygomycetes, Ascomycetes.
	<i>Na potravinách a krmivech</i>	Potraviny a krmiva jsou vhodným substrátem pro růst mikroskopických hub. Na potravinách, potravinových surovinách se nejčastěji vyskytují typické saprofytické houby z řádu Moniliales (Deuteromycetes), např. druhy Aspergillus, Penicillium, Paecilomyces, Fusarium, Botrytis, Cladosporium, Alternaria, a z řádu Mucorales (Zygomycetes), např. rod <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> . Na potravinách se vyskytují hojně kvasinky z čeledi Saccharomycetaceae a Torulopsidaceae (Endomycetes).
	<i>Vzdušné</i>	Název se vztahuje na spory hub všech skupin, které se dostávají do ovzduší a tvoří stálou nebo sezonně ovlivněnou složku aero planktonu. V ovzduší se nejčastěji vyskytují

		spory mikroskopických hub z řádu Moniliales (Deuteromycetes), např. druhy <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , a spory dalších významných druhů - rzi, sněti (Basidiomycetes). Zjišťování spor mikroskopických hub v ovzduší je důležité pro fytopatologii (zjišťování kvantity spor fytopatogenních druhů), ve zdravotnictví (alergické projevy obyvatelstva po jejich expozici sporamí) a při hodnocení hygieny prostředí (výskyt mikroskopických hub v prostředí potravinářského provozu a sledování účinnosti provádění sanitace).
<b>Parazitické</b>	<i>Fytopatogenní</i>	Způsobují choroby kulturních i planě rostoucích rostlin. Jednu z největších skupin tvoří listovní paraziti. Fytopatogenní houby vyvolávají též choroby podzemních a přizemních částí rostliny.
	Zoopatogenní (antropopatogenní)	Houby parazitují na živém hmyzu a jsou patogenní pro člověka a teplotně závislé živočichy. Působí dermatomykózy - převážně působené dermatofyty (anamorfami některých zástupců čeledi Gymnoascaceae), orgánové mykózy (např. <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> ), dále alergická onemocnění po expozici spórami zástupců rodu <i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> .
<b>Žijící ve vodě</b>	-	Mezi vodní houby patří zástupci různých taxonomických skupin houbových organismů (vodní hlenky, chytridiomycety, oomycety, zástupci třídy Ascomycetes), jejichž část vývojového cyklu probíhá ve vodním prostředí.

### 3. 1. 3 Morfologie a cytologie plísní

#### 3. 1. 3. 1 Stélka

Základem těla mikromycet (vláknitých mikroskopických hub) je vegetativní vláknitý útvar stélka (thallus). Houbové vlákno se nazývá hyfa. Hyfy jsou buď tvořené mnohjadernými protoplasty, které nejsou rozlišeny v jednotlivé buňky. Tento coenocytický typ hyf tvořící mycelium se objevuje u zástupců třídy Zygomycetes. Nebo jsou hyfy rozdělené příčnými přehrádkami. Hyfy rozdělené příčnými přehrádkami jsou typické u zástupců třídy Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes.

### **3. 1. 3. 2 Mycelium**

Vlákna hyf se větví a splétají v mycelium neboli podhoubí. Mycelium rostoucí v substrátu nazýváme substrátové mycelium (vegetativní). Mycelium rostoucí na povrchu substrátu se nazývá vzdušné mycelium (generativní).

#### Substrátové mycelium

Substrátové mycelium slouží k výživě plísně.

#### Vzdušné mycelium

Vzdušné mycelium roste na povrchu substrátu a plní rozmnožovací funkci.

#### Sklerocium

Někdy se vytváří tvrdý polokulovitý útvar tvořený spleť hyf tzv. sklerocium. Sklerocium bývá tmavé, až několik mm velké, je odolné vůči nepříznivým podmínkám. Vyskytuje se u plísni, u nichž neznáme tvorbu pohlavních ani nepohlavních spor.

#### Stroma

Stroma je kožovitá spleť hyf vyskytující se u plísni parazitujících na ovoci a rostlinných materiálech (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

### **3. 1. 3. 3 Stavba buňky mikroskopických vláknitých hub**

Buněčná stěna je z 80 % tvořena polysacharidy a to chitiny, chitosany, manany a glukany (DIAZ, 2005). Někdy se vyskytuje i celulóza a látky podobné ligninu, které dodávají buněčné stěně pevnost. Buněčná stěna obsahuje i bílkoviny, lipidy a vosky. Ty způsobují nízkou smáčivost hyf a konidií (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

### **3. 1. 4 Rozmnožování a růst (v závislosti na podmínkách prostředí)**

V životním cyklu se střídá pohlavní a nepohlavní reprodukce. Rozmnožovací struktury jsou odlišné od somatických struktur. Rozmnožování plísni se děje buď rozrůstáním hyf, nebo pomocí spor. Vytváří se pohlavní spory spájením nebo vegetativním způsobem vznikají nepohlavní spory. Jsou dva základní způsoby vzniku spor, a to je thalický a blastický.

#### Thalický vznik spor

Thalický vznik spory je spojen s již existující strukturou hyf. Spory vznikají rozpadem hyf. Vzniklá spora se nazývá artrospora.

### Blastický vznik spory

Blastický je takový způsob nepohlavního rozmnožování, kdy se spory tvoří *de novo*. To znamená, že se spory netvoří př. rozpadem z již existujících částí orgánů, ale tvoří se nové rozmnožovací komponenty neboli spory. Existuje několik způsobů tohoto typu nepohlavního rozmnožování (KALHOTKA, 2014).

#### **3. 1. 4. 1 Dimorfismus**

U některých mikroskopických hub se objevuje dimorfismus. Dimorfismus je schopnost organismů měnit své morfologické vlastnosti v závislosti na podmínkách prostředí. Například rod *Mucor* se za přístupu vzduchu vyskytuje ve formě vláknité a při zaplynování CO<sub>2</sub> na Petriho misce ve formě kvasinkové. Kvasinková forma je typická pro patogenní mikroskopické houby.

#### **3. 1. 4. 2 Polymorfismus**

U některých druhů hub se v jejich životním cyklu střídají dvě odlišná pohlavní stádia neboli formy. Tento proces se nazývá polymorfismus. Jedná se o rozlišení životních stádií plísni podle způsobu jejich rozmnožování. U plísni se rozlišuje pohlavní stádium teleomorfa a nepohlavní stádium anamorfa.

### Teleomorfa

Teleomorfa je životní stádium schopné pohlavního rozmnožování. V životním stádiu teleomorfy se pohlavní spory neboli meiospory tvoří uvnitř nebo vně mateřské buňky. V případě že spora vzniká uvnitř mateřské buňky, mluvíme o endospoře. V případě že spora vzniká vně mateřské buňky, mluvíme o exospoře. U plísni se vyskytují různé typy pohlavního způsobu rozmnožování např. hologamie, gametogamie a somatogamie.

### Anamorfa

Anamorfa je životní stadium mikroskopických vláknitých hub, které se rozmnožuje pouze nepohlavně. Životní stádium anamorfy se objevuje u hub spájivých (Zygomycota). Příkladem nepohlavního způsobu rozmnožování je fragmentace mycelií (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Každý druh, který je schopen polymorfismu nese svůj specifický název právě podle životního stádia, v kterém se zrovna vyskytuje př. *Byssochlamys fulva* (Teleomorfa) – *Peecilomyces fulvus* (Anamorfa), *Neosartorya fisheri* (Teleomorfa) – *Aspergillus fisheri*

(Anamorfa). Spory, které vznikly nepohlavním způsobem rozmnožování, se nazývají konidie. Stěny konidií, obsahují různá barviva např. bílé, krémové, zelené, modré, žluté, fialové a hnědočerné. Tyto pigmenty působí jako ochrana před UV zářením. Některé pigmenty mohou difundovat do okolní živné půdy (OSTRÝ, 1998).

### 3. 1. 5 Faktory ovlivňující růst plísní a tvorbu mykotoxinů v prostředí

Spory mikroskopických vláknitých hub jsou běžnou složkou vzduchu v životním prostředí. Hlavními faktory osídlení prostředí mikroskopickými houbami jsou teplota, pH, vlhkost vzduchu a chemické vlastnosti prostředí. Dalšími zásadními faktory vývoje plísní jsou vzájemné interakce mezi plísní a rostlinou a plísní a mikroorganismy. Tyto základní činitele jsou předpokladem růstu, průběhu biosyntetických reakcí a syntézy mykotoxinů (SMITH, 1991).

Výskyt zástupců plísní neboli také vláknitých mikromycet tvořících mykotoxiny může být cyklický, anebo sezónní v závislosti na podmínkách prostředí.

**Tabulka č. 2 : Obecné charakteristiky pro růst mikromycetů a produkci mykotoxinů v potravinách a krmivech (OSTRÝ, 1998).**

Faktor	Růst	Produkce mykotoxinů
<b>Teplota</b>	(-)12 - (+)55 °C	(-)4 - (+)40 °C
<b>pH</b>	1. 7. 2010	2,5 - 8 ; optimum 5 – 7
<b>a<sub>w</sub></b>	Min. 0,62	Min. 0,8 – 0,85
<b>Eh</b>	aerobní podmínky	aerobní podmínky
<b>Vliv solí</b>	do 20 % NaCl	do 14 % NaCl
<b>Vliv cukrů</b>	do 50 % sacharózy ( <i>Aspergillus flavus</i> )	do 50 % sacharózy ( <i>Aspergillus flavus</i> )
<b>Vliv fytoalexinů</b>	Inhibice	Inhibice
<b>Vliv látek v kořeni</b>	inhibice (eugenol, anetol, tymol)	inhibice (eugenol, anetol, tymol)
<b>Vliv jiných mikromycet</b>	?	inhibice (výskyt <i>Aspergillus niger</i> )
<b>Infekce viry</b>	?	inhibice (RNA mykoviry)

### **3. 1. 5. 1 Produkce rozdílných druhů mykotoxinů stejným druhem**

Často dochází k produkci několika rozdílných mykotoxinů stejným druhem. K produkci rozdílných mykotoxinů jedním druhem dochází vlivem nestabilních a různých podmínek vymykajících se optimu. Například produkce mykotoxinu deoxynivalenolu (DON) a zearalenonu (ZEA), které vznikají za rozdílných teplotních podmínek biosyntézou druhu *Fusarium graminearum*. K produkci ZEA dochází za maximální teploty 25 °C. Zatímco produkce DON je závislá na rostoucí teplotě pohybující se nad 25 °C. Při teplotě 28 °C je produkce deoxynivalenolu dvojnásobná než při teplotě 25 °C. V polních podmínkách může souběžně nastat syntéza mykotoxinů ZEA a DON, při propuknutí infekce kukuřice (*Zea mays*) a pšenice (*Triticum aestivum*) zástupcem *Fusarium graminearum* (DIAZ, 2005).

### **3. 1. 6 Využití a studie mikroskopických vláknitých organismů a jejich metabolitů**

Řada mikroskopických vláknitých hub a jejich metabolitů (mykotoxiny) se využívá ve farmaceutickém, potravinářském, krmivářském, konzervářském a jiném průmyslu. Několik druhů slouží jako modelové organismy k získávání vědeckých znalostí v oblasti genetiky, fyziologie, biochemie a molekulární biologie. Mezi obecně nejlépe probádané mikroskopické houby patří *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* a *Ustilago maydis* (DIAZ, 2005).

Mykotoxiny jsou nejvíce produkovány rody kropidlák (*Aspergillus*), štětičkovec (*Penicillium*) a srpovničky (*Fusarium*). Proto jsou toxiny těchto rodů, s velkým zastoupením druhů a největším rozšířením, nejlépe prozkoumány (FLORIÁN, 2013).

## **3. 2 Mykotoxiny**

Název mykotoxiny pochází z řeckého slova „MYKO-MYKES“ tj. houba a z latinského pojmenování „TOXICUM“ tj. jed nebo otrava (HONZLOVÁ, 2015).

Mykotoxiny jsou sekundárními metabolity mikromycet. Jsou to toxické látky produkované všemi hlavními taxonomickými skupinami hub. Prozkoumáno je více než 300 druhů mykotoxinů a nadále jsou objevovány a charakterizovány další a další mykotoxiny. Zajímavostí je, že některé druhy mykotoxinů mohou být produkovány zcela taxonomicky odlišnými druhy hub. Příkladem je citrinin, který byl izolován jako metabolit několika druhů rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phytium*, *Clavariopsis* a byl



taktéž izolován z trichomu rostliny čeledi (Fabaceae) *Crotolaria crispata* pocházející z Austrálie (CHELKOWSKI, 1989).

### **3. 3 Mykotoxiny z hlediska kontaminace obilovin a krmiv**

Houby mají ze všech původců chorob rostlin největší význam. Ve středoevropských podmínkách je jimi vyvoláno 82 – 84 % všech ekonomicky závažných chorob rostlin. Odhaduje se kolem 10 000 producentů mykotoxinů znehodnocujících potraviny a krmiva (JESENSKÁ, 1993).

Počátky studie vlivu sekundárních metabolitů plísní (mykotoxinů) na zdraví zvířat začaly ve spojitosti s vypuknutím neznámého onemocnění u krůt ve velké Británii v roce 1960. Původcem onemocnění byl Aflatoxin, který byl obsažen v podzemnicovém extrahovaném šrotu přivezeném z Brazílie používaném jako krmná surovina (FLORIAN, 2013).

#### **3. 3. 1 Negativní efekt mykotoxinů – obecně**

##### **3. 3. 1. 1 Biokoroze**

Biokoroze je proces negativní přeměny (deformace) původního materiálu, který je způsoben životními pochody organismů. Organismus, který způsobuje změny původního materiálu v procesu biokoroze se nazývá „biodeteriogen“. Při biokorozi se uplatňují různé formy interakce. Nejjednodušší interakce spočívá v prostém osídlení materiálu společenstvem mikroorganismů:

##### Negativní přeměny původního materiálu

- Funkční biokoroze - mechanické, optické, chemické
- Morfologická biokoroze - barevné skvrny, důlková koroze (pitting), fibrilace (rozvlákňování).

##### Biokoroze se u materiálu projevuje mechanicky (fyzikálně) nebo chemicky.

- Mechanicky je materiál poškozován v důsledku přímé aktivity organismů.
- Chemické poškození je možné rozdělit na asimilační a disimilační. Chemické asimilační poškození je asi nejběžnějším druhem biodeteriorace. Materiál je pro biodeteriogeny zdrojem živin. Chemické disimilační poškození nastává, když je materiál poškozován produkty metabolismu, např. organickými kyselinami, či oxidem uhličitým (PLAŠKOVÁ, 2008).

### **3. 3. 2 Základní příčiny výskytu mykotoxinů u rostlin a v krmivech**

Napadené rostliny pěstované pro krmivářské a potravinářské využití mají sníženou produktivnost nebo úplně hynou. To má samozřejmě sekundárně dopad na produkci potravin a krmiv (ŠILHÁNKOVÁ, 2008).

Kontaminace mykotoxiny probíhá před sklizní v průběhu vegetace, během skladování, přepravy a zpracování rostlinných produktů a krmení zvířat. Růst plísní a tvorba mykotoxinů přímo souvisí se stresovými podmínkami, které jsou vyvolány povětrnostními extrémy, poškozením rostlin patogenními organismy, nevhodným způsobem skladování, či špatnou technikou krmení zvířat (FLORIÁN, 2013).

Základními příčinami výskytu plísní v krmivech jsou především technologické postupy prováděné za nevhodných hygienických podmínek při manipulaci se zemědělskými plodinami. Řada plísní se může v napadených surovinách rozvíjet ještě při 15 % obsahu vody. Zatímco většina bakterií a kvasinek potřebují pro svůj rozvoj minimálně 30 % vody. Do substrátu jsou mykotoxiny vylučovány zejména při teplotách -4 až 40 °C s optimem 20-30 °C (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Technologické procesy konzervace mokřých krmiv, jako jsou siláže a senáže, byly vyvinuty v posledním období 20 – 30 let. Mnoho zemědělských a potravinářských zbytků se využívá jako krmivo, např. ovocná dřevina, řepné řízky, sladový květ (pivovarský odpad) a staré pečivo. Jejich zpracování však často probíhá ve vlhké podobě a to je živnou půdou pro rozrůstání plísní v průběhu zpracování, skladování a v průběhu přepravy. Není zcela možné zabránit růstu a vývoji mikromycet v zemědělských a potravinářských produktech. Lze však eliminovat jejich koncentrace. Je však nutné brát na vědomí, že jestliže je v krmivu detekována přítomnost jednoho druhu mykotoxinu, tak přítomnost dalších druhů je téměř jistá. Některé toxiny se však nemusí podařit identifikovat (DIAZ, 2005).

## **3. 4 Krmivářsky nejvýznamnější mykotoxiny**

### **3. 4. 1 Aflatoxiny (B1, B2, G1, G2) – kukuřice, sója**

Aflatoxin je mykotoxin produkován primárně kropidlákem žlutým (*Aspergillus flavus*) a kropidlákem parazitickým (*Aspergillus parasiticus*). Vzhledem k schopnosti *A. flavus* a *A. parasiticus* svými sekundárními metabolity (aflatoxiny) kontaminovat

zemědělské plodiny, potraviny a krmiva, jsou pravděpodobně nejprostudovanějšími druhy svého rodu. Vedlejším metabolitem těchto druhů je etanol, vznikající v průběhu celého vývoje jedince. Jsou to polycyklické, nesaturované, vysoce substituované kumariny. Je známo přibližně 20 typů Aflatoxinů. Jsou vysoce termostabilní s prokázanou karcinogenitou. Největší akutní toxicitu má AFB1, pak G1, B2, a G2. Aflatoxiny jsou nejpodrobněji prostudovanými mykotoxiny. Mezi hlavní toxické účinky patří hepatotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita a teratogenita. Působí poškození jater i v nízké koncentraci. Mechanismus spočívá převážně v blokádě syntézy DNA, RNA a proteinů. Citlivá jsou především mláďata. Pro AFB1 ale i AFG1 a G2 jsou dominantním substrátem olejnatá semena (BETINA, 1989).

Rod *Aspergillus* preferuje prostředí vyšší teploty a vlhkosti. Přednostně se vyvíjí v tropickém a subtropickém podnebí. Napadení rostliny druhu rodu *Aspergillus* probíhá během vegetace. Napadají reprodukční orgány rostlin. Mohou se dále vyvíjet a produkovat aflatoxiny během sklizně a dalšího zpracování rostlinného materiálu na krmiva (seno, sláma, krmná směs). Koncem vegetačního období napadá plodiny jako je bavlník (*Glossipium* sp.), podzemnice olejná (*Arachis hypogea*), kukuřice (*Zea mays*) a jiné obiloviny (FINK-GREMMELS, 2012).

### 3. 4. 2 Ochratoxin A - obiloviny

Ochratoxiny jsou obecně charakterizovány jako deriváty izokumarinu. Ochratoxin A (OTA) je velmi dobře fyzikálně i chemicky stabilní a je nejvýznamnější z Ochratoxinů. Dalšími mykotoxiny tohoto typu jsou Ochratoxin B, C, D aj. Ochratoxiny jsou sekundárními metabolity plísní rodu kropidlák (*Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus* aj.) a *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. commune* aj.). Hlavními toxickými účinky Ochratoxinu A jsou nefrotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita, teratogenita a neurotoxicita (KALHOTKA, 2014).

Při intoxikaci dojde k selhání ledvin. U prasat a skotu po intoxikaci ledvin následuje smrt. Projevy intoxikace předchází redukce mléka. První pozorování Ochratoxinu probíhalo v laboratorních podmínkách při zjišťování toxicity krmiva v Jižní Africe roku 1965. Jeho kontaminace v zemědělských produktech je široce rozšířena v Evropě a Severní Americe. Plísně zodpovědné za produkci Ochratoxinu A se vyvíjejí a rostou v obilovinách, které obsahují velké množství škrobu, např. kukuřice a pšenice. V obilovinách se vyvíjejí i při vlhkosti 15-16 % (DIAZ, 2005).

Absorpce Ochratoxinu v zažívacím traktu zvířete je závislá na pH prostředí. V místech nízkého pH je absorpce vyšší. Ochratoxin A vstupuje do oběhu těla skrz žíly lymfatických cév. V lymfatickém systému je vázán na plazmatické bílkoviny, zejména albumin. V přirozených podmínkách se OTA vyskytuje v kombinaci s Citrininem, kyselinou penicilinovou a dalšími mykotoxiny (FINK-GREMMELS, 2012).

V chladných oblastech produkují OTA plísně rodu *Penicillium*, a to od 4 do 30°C, při relativní vlhkosti 22 %. V tropech pak spíše plísně rodu *Aspergillus* (*A. ochraceus*) v rozmezí teplot 15 – 37 °C (KALHOTKA, 2014).

### **3. 4. 3 Citrinin – krmiva, potraviny**

Citrinin je primárně produkován rodem *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. expansum*, *P. viridicatum* aj.) a některými druhy rodu *Aspergillus* (*A. terreus* aj.). Je to silný nefrotoxin. Poškozuje metabolismus jater, je karcinogenní, mutagenní, teratogenní a imunotoxický. Vyskytuje se často v kombinaci s Ochratoxinem A v plesnivých krmivech a potravinách (DIAZ, 2005).

### **3. 4. 4 Patulin – obiloviny, pečivo, sýry, ovoce**

Patulin produkují hlavně plísně rodu *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* a *Paecilomyces*. Nejdůležitějšími producenty jsou *Penicillium expansum*, *P. griseofulvum*, *Aspergillus clavatus* a *Byssochlamys nivea*. Má antibiotické účinky, způsobuje poškození gastrointestinálního traktu, je imunosupresivní, mutagenní a neurotoxický. Karcinogenní a teratogenní účinky jsou diskutabilní. Bývá často detekován v obilovinách, pečivu, sýrech, ovoci a ovocných moštích (KALHOTKA, 2014).

Optimum tvorby Patulinu se předpokládá za teploty 20 – 25 °C a pH 3 a 6,5 (BETINA, 1989).

### **3. 4. 5 Zearalenon – kukuřice, obiloviny, sója, siláže**

Zearalenon není akutně toxický, narušuje však cyklus pohlavních hormonů a způsobuje poruchy plodnosti. Je produkován primárně druhem *Fusarium graminearum* (DIAZ, 2005).

Tvoří ho však řada druhů rodu *Fusarium*. Obiloviny napadá již na poli nebo při jejich skladování. Bývá často detekován v kukuřici, pšenici, žitu, čiroku, ječmeni a výrobcích z nich, jako jsou mouka, pečivo, slad, pivo, sója, siláž aj. (BETINA, 1989).

#### **3. 4. 6 Deoxynivalenol (vomitoxin) DON – kukuřice, obiloviny**

DON patří mezi mykotoxiny trichotecenové skupiny B. Producenty jsou plísňe rodu *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*). Akutní toxicita se projevuje střevními potížemi a zvracením. Může vzniknout akutní DON toxikóza, která způsobuje hemoragie, kožní změny a gastrointestinální onemocnění. Má i teratogenní a imunopresivní účinky. Vyskytuje se v obilovinách a výrobcích z nich (KALHOTKA, 2014).

#### **3. 4. 7 T- 2 toxin (trichoteceny) – ječmen, pšenice, proso, saflor**

Jsou to přirozeně stabilní toxiny produkované rodem *Fusarium*. Patří mezi významné zástupce mykotoxinů trichotecenové skupiny A – *trichotheceny*. Cílovým orgánem toxicity jsou játra, projevuje se inhibicí syntézy proteinů, redukovanou imunitou a nekrózou buněk, nepříznivě ovlivňuje krve tvorbu. T-2 toxin je známý svou vysoko akutní toxicitou. Dlouhodobě je imunotoxický, genotoxický a karcinogenní. Bývá v obilovinách, koření a byl detekován i v pivu. Podmínkou produkce T-2 toxinu je teplota 3 až 8 °C (DIAZ, 2005).

#### **3. 4. 8 Kyselina cyklopiazonová – obiloviny, sýry, maso, vejce**

Producenty jsou plísňe rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. versicolor*, *A. oryzae* aj.) a *Penicillium* (*P. camemberty*, *P. commune*, *P. griseofulvum*, *P. cyclopium*, *P. chrysogenum* aj.). Působí nekrózy vnitřních orgánů jater, ledvin a kosterního svalstva. Je to gastroenterotoxin, hepatotoxin, nefrotoxin, neurotoxin a mutagen. Kyselina cyklopiazonová má i teratogenní účinky a působí embryotoxicky. Vyskytuje se v obilovinách, plísňových sýrech, drůbežím masu a vejcích (KALHOTKA, 2014).

#### **3. 4. 9 Fumonisin – kukuřice, potraviny**

Fumonisin jsou relativně nedávno objevenou skupinou mykotoxinů. Byla izolována celá řada Fumonisinů (A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1, C2, P1, P2, aj.). Nejtoxičtější ze zástupců je Fumonisin B1. Primárními producenty jsou plísňe rodu *Fusarium* (DIAZ, 2005).

Fumonisinu spouštějí proces rakovinného bujení, především u rakoviny jícnu a jater. Způsobují leukoencefalopatie u koní a pulmonální edém u prasat (KŘÍŽOVÁ, 2013).

Působí neurotoxicky, inhibují syntézu lipidů vyskytujících se v nervové tkáni, postihují játra, plíce, ledviny, působí imunotoxicky a teratogenně (DIAZ, 2005)

Optimální podmínky produkce Fumonisinů jsou v tropických a subtropických podmínkách, a také v oblasti mírného klimatického regionu. Napadají především kukuřici. Vyskytují se v potravinách, v pivu, chlebu, či koření (WATLING, 2002).

### **3. 4. 10 Alternariové mykotoxiny – ovoce, obiloviny**

Jde o řadu mykotoxinů produkovaných plísněmi rodu *Alternaria* (*A. citri*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, aj.). Kyselina tenuazonová je nejvýznamnějším alternariovým mykotoxinem. Je akutně toxická a inhibuje syntézu proteinů. Může způsobovat kardiovaskulární kolaps. Vyvolává salivaci, anorexii, erytémy, křeče, zvracení, tachykardii, gastrointestinální hemoragie a smrt. Alternariové mykotoxiny se vyskytují v ovoci, zeleně a výrocích z nich. Vyskytují se také v obilovinách, jako je ječmen, oves, žito a dále v ořeších, slunečnici a řepce. Optimální teplota pro tvorbu alternariových mykotoxinů je 25 °C (KALHOTKA, 2014).

### **3. 5 Maskované mykotoxiny**

Maskované mykotoxiny, nebo také „skryté mykotoxiny“, či „konjugované mykotoxiny, byly objeveny v 80. letech minulého století. Výzkum maskovaných mykotoxinů je teprve na začátku. Zatím je velice málo známo o tom, jak vznikají, o jejich biologické aktivitě a metabolismu v plísních nebo napadených rostlinách. Vliv maskovaných mykotoxinů na trávicí systém a na celý organismus při požití kontaminovaného krmiva, či potraviny prozatím také není příliš objasněn. Maskované mykotoxiny unikají rutinním analytickým stanovením. V současné době nejsou komerčně dostupné standardy maskovaných forem mykotoxinů. Vznikají jako obranná reakce rostlin na napadení plísněmi rodu *Fusarium*. Mykotoxin je navázán na cukernou složku a je uzavřen ve vakuolách buněk.

Př. DON→deoxynivalenol-3-glukosid (D-3-Glc), ZON→ zearalenon-4-O-glukosid

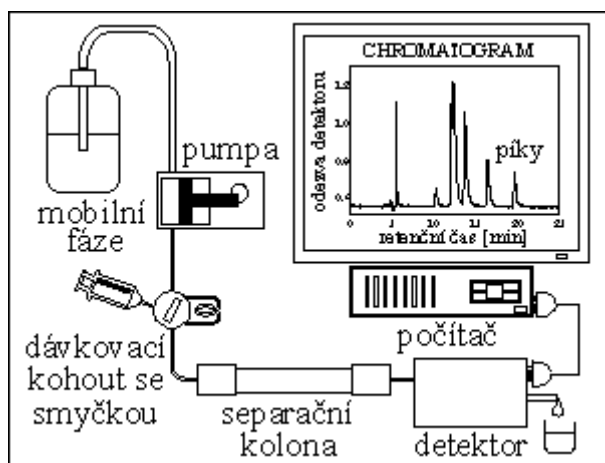
Podle nedávno provedené studie je D-3-Glc velmi stabilní v 0.02M HCl. Je odolný vůči působení žaludečních šťáv, umělých střevních šťáv, vůči mandlové i šnečí glukoronidase a lidské  $\beta$ -glukosidáze. Účinně ho ale štěpila na DON celobióza z *Aspergillus* sp. a o něco méně celobióza z *Trichoderma* sp. Schopnost zpřístupňovat D-3-Glc je zřejmě doménou střevních mikroorganismů a příslušných glukosidáz. Významnou roli tak zřejmě hrají mikroorganismy trávicího traktu. V rámci širokého výzkumu různých druhů byla zjištěna schopnost štěpit D-3-Glc u *Bifidobacterium adolescentis*, zástupců *Enterococcus* sp., a *Lactobacillus plantarum*. Endogenní enzymy produkované buňkami tenkého střeva zřejmě D-3-Glc hydrolyzovat nedokáží. (KŘÍŽOVÁ, 2013; RADA, 2012).

### **3.6 Základní metody analýzy výskytu mykotoxinů v krmivech**

Před samotnou analýzou vzorků krmiva musí dojít k jeho odběru, k následné úpravě (homogenizaci) vzorku a přečištění extraktu. Následně probíhá měření pomocí analytických metod např. ELISA a HPLC. Po té se postupuje zpracováním dat a vyhotovením výstupního protokolu s výsledky analýzy (KŘÍŽOVÁ, 2013).

#### **3. 6. 1 Metoda analýzy HPLC**

HPLC je zkratka, vycházející z anglického názvu vysoko účinné metody kapalinové chromatografie ( High Performance Liquid Chromatography). HPLC metoda měla největší vzestup počátkem 70 let. Dnes patří také mezi nejvíce využívané separační metody. Vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a přesností. Tato metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je vždy kapalná. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. (BAČINA, 2014)



Zdroj:

[https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/welcome.h  
tml](https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/welcome.html)

Obrázek č 1: Kapalinový chromatograf (COUFAL, 2005)

Pro úspěšnou separaci u kapalinové chromatografie je potřeba dosažení krátké doby separace. Čas, který analyt stráví v separační koloně, se nazývá retenční čas. Stanovení množství látky lze přímo vyhodnotit z chromatogramu. Zóně analytu v chromatogramu odpovídá pík neboli eluční křivka, která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně (COUFAL, 2005).

### 3. 6. 2 Metoda analýzy ELISA

ELISA je imunochemická metoda, jejíž zkratka vychází z anglického názvu (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). ELISA je metoda, která slouží ke kvantifikaci malých množství látek vyvolávajících tvorbu protilátek tzv. antigenů. Slouží i k detekci dalších látek např. hormonů, cytokinů, nádorových markerů apod. Využívá enzymů k určení antigenu nebo protilátky a tím následně celého imunokomplexu. Navázání enzymu se pak znázorní reakcí se substrátem za vzniku barevného produktu (BAČINA, 2014).



### **3. 7 Možnosti omezení přítomnosti mykotoxinů v produkci/krmivech**

- Návrh pestrého osevního postupu se zařazováním brambor, řepy, zeleniny, jetelovin.
- Zapracování posklizňových zbytků (pšenice po kukuřici je riziková, při zaorání zbytků kukuřice má následná pšenice nižší obsah DON, než při minimalizaci).
- Volba odrůdy, hustota výsevu.
- Vyvážená výživa (nepřehnojovat dusíkem).
- Potlačování plevelů (řada z nich je hostiteli rodu *Fusarium*).
- Používání fungicidů ve správnou dobu (sledování povětrnostních podmínek).
- Zabránění poléhání porostů (úprava výsevku, vhodné výsevky, aplikace regulátoru růstu).
- Sklizeň při vhodných povětrnostních podmínkách – vhodná vlhkost sklizně, polehlé, mokré či podezřelé partie izolovat.
- U partií s vyšší vlhkostí zkrátit dobu mezi sklizní a sušením na minimum.
- Správné skladování – větrat a udržovat stabilní teplotu v celém skladu, minimalizace výskytu hub a hmyzu ve skladu.
- Správný postup výroby siláže a senáže (hutnění), použití vhodných schválených konzervantů (kyselina propionová a její soli).
- Odebírat krmné suroviny od prověřených dodavatelů (FLORIÁN, 2013).
- Mísení jednotlivých složek krmiv v krmnou směs pro komplexní výživu zvířete může zvýšit pravděpodobnost vícenásobné kontaminace mykotoxiny, ale zároveň snížit koncentraci mykotoxinů jednotlivých mikromycet (DIAZ, 2005).

### **3. 8 Biologický vliv mykotoxinů na organismus hospodářských zvířat**

#### Negativní účinky mykotoxinů u zvířat

Klinické projevy – Klinické projevy jsou takové, při nichž při intoxikaci daným mykotoxinem dochází k dramatickým zhoršením zdravotního stavu a užitkovosti zvířat. Klinické projevy se vyskytují méně často a způsobené ztráty jsou v součtu nižší než u subklinických projevů.

Subklinické projevy – Subklinické reakce na intoxikaci mykotoxiny jsou mírnějšího charakteru. Nejsou tak dramatické jako projevy klinické. Projevují se méně výrazným zhoršením užitkovosti a fyzického stavu zvířete. Subklinické projevy jsou však velmi

časté. Pro jejich mírný charakter jsou často přehlíženy. Způsobené celkové ztráty jsou ovšem v součtu vysoké a na organismus zvířete mají degenerativní vliv. Organismus je oslaben mykotoxiny a toto oslabení je často doprovázeno dalšími stresovými faktory prostředí např. chlad, vlhko atd. (FLORIÁN, 2013).

#### Základní symptomy působení mykotoxinů (FLORIÁN, 2013)

- Snížený příjem krmiva.
- Poruchy trávení.
- Poruchy reprodukce.
- Zhoršení užitkovosti.
- Zhoršení kvality srsti či opeření.
- Zhoršení imunity (doprovázené zvýšeným výskytem širokého spektra infekčních chorob).
- Vzhledem k variabilitě projevu a početnosti symptomů je přesná diagnóza mykotoxikózy velmi obtížná (FLORIÁN, 2013).

#### Toxicita mykotoxinů

Mykotoxiny můžeme rozdělit:

- Na silně toxické mykotoxiny
  - Aflatoxiny, Patulin, T-2 toxin, Ochratoxin A.
- Na středně toxické
  - např. Trichoteceny nebo Zearalenon.

Jedná se o toxicitu pro laboratorně chovaná zvířata, která může být u stejného druhu zvířete ovlivněna stářím, pohlavím, podmínkami prostředí, výživového stavu apod. (KALHOTKA, 2014).

### **3. 8. 1 Vliv mykotoxinů na hospodářská zvířata – přežvýkavci**

Vliv mykotoxinů na hospodářská zvířata je spojen s významnými ekonomickými ztrátami. Součástí krmné dávky přežvýkavců je mimo krmivo (krmná směs, šrot atd.) i píče, kde se také vyskytují mikromycety. Z tohoto důvodu je zvýšeno riziko vlivu mykotoxinu na hospodářská zvířata v porovnání s ostatními zvířaty. Přežvýkavce odlišuje od ostatních zvířat především zvláštěně přizpůsobená trávicí soustava. Žaludek přežvýkavců je tvořen 4 komorami. Je rozdělen na předžaludek, který se skládá z bacheru (*rumen*), čepce (*reticulum*), knihy (*omasum*) a vlastní žaludek neboli slez

(*abomasum*). První a největší prostor *rumen* a taky *reticulum* obsahují velké množství mikrobiální populace včetně bakterií ( $10^{11}$ /ml), *protozoa* (106/ml) a zástupců plísní ( $10^4$  zoospor/ml). Tento aktivní mikrobiální systém hraje hlavní roli při stravitelnosti vlákniny, produkci vitamínů B a produkci aminokyselin. Přirozená mikrobiální složka trávicího traktu chrání organismus zvířete před vlivy cizorodých mikrobiálních kultur a podílí se na metabolismu toxinů z rostlin. Bylo vyzorováno, že přežvýkavci jsou přirozeně odolnější vůči patogenním vlivům mykotoxinů oproti monogastriickým zvířatům (DIAZ, 2005).

### **3. 8. 1. 1 Toxicita Aflatoxinů u přežvýkavců**

Degradabilita AFB1 je u přežvýkavců minimální. Expozice působení aflatoxinu způsobuje hromadění mastných kyselin v játrech, ledvinách a srdci což může v důsledku způsobovat encefalopatii a otoky (DIAZ, 2005). Encefalopatie má neurologické a psychiatrické projevy po narušení mozkových funkcí, které jsou důsledkem selhání jater (MAXDORF, 2010). Při průběhu akutní aflatoxikózy dochází k přetížení a krvácení jater. Z těchto poznatků lze tedy odvodit, že přežvýkavci nemají dostatečně vyvinutý vlastní obranný systém proti toxicitě aflatoxinů. Navíc sekundárně mnohem toxičtější rezidua přecházejí do mléka (DIAZ, 2005).

### **3. 8. 1. 2 Toxicita Zearalenonu u přežvýkavců**

Primární negativní projevy vlivu zearalenonu jsou při reprodukci, kdy jeho vliv snižuje životaschopnost embrya. Snižuje také produkci progesteronu, testosteronu a konečným důsledkem tak může být neplodnost. U hospodářských zvířat dále symptomy zahrnují záněty pochvy, potraty a zduření prsních žláz u jalovic.

### **3. 8. 1. 3 Toxicita Trichotecenu u přežvýkavců**

Hlavní Trichoteceny, které se vyskytují v krmivech přežvýkavců, patří do skupiny A. Skupina Trichotecenu A zahrnuje krmivářsky významné Diacetoxyscirpenol – DAS a T-2 toxin. Další skupinou je Trichotecenová skupina B kde patří Deoxynivalenol – DON a Nivalenol - NIV.

- T-2 toxin bývá spojován s gastroenteritidou a střevním krvácením.
- DON je obecně charakterizován jako vomitoxin (DIAZ, 2013).

#### **3. 8. 1. 4 Toxicita Ochratoxinu A u přežvýkavců**

Je známo celkem 7 druhů Ochratoxinů, z nichž je nejvíce toxický a známý Ochratoxin A (OTA). Toxicita Ochratoxinu A je závislá na druhu zvířete, na pohlaví a způsobu podání. Mezi hlavní účinky patří nefrotoxicita a poškození jater. OTA vykazuje ale i imunotoxické účinky. To vede k vyšší míře běžných onemocnění zvířat a snížení užitkovosti (RADA, 2012).

Hlavními klinickými příznaky spojenými s akutní ochratoxicózou jsou anorexie, zvracení, zvýšená tělesná teplota, vyčerpanost a smrt. U chronické ochratoxikózy dochází k polydipsii a hepatotoxicitě. Toxicita Ochratoxinu A u přežvýkavců je relativně nízká díky specifické mikrobiální floře v jejich zažívacím traktu (DIAZ, 2005).

#### **3. 8. 1. 4 Toxicita Patulinu u přežvýkavců**

Pomocí výzkumů byly zjištěny závažné projevy intoxikace Patulinem obsaženém v krmivu na centrální nervovou soustavu zvířete. Je obsažen převážně v silážích, senážích a při nedodržených hygienických podmínkách se vyskytuje také v krmném sladovém květu. Hlavním producentem Patulinu v krmivu je *Aspergillus clavatus*. Intoxikace u zvířat konzumující kontaminovaná krmiva při výzkumu se projevovала neurotoxickými projevy. Neurotoxické projevy se skládají z chvění zvířete, ataxie, parézy, polehávání a v některých případech smrt (DIAZ, 2005).

V roce 2014 byl v Toxikologické Laboratoři v Argentině prováděn výzkum vlivu Zearalenonu (ZEN) a Patulinu (PAT) samostatně, anebo ve vzájemné kombinaci na mikrobiální pochody v bachoru a stravitelnost organické hmoty. Podle zjištěných výsledků ZEN ani PAT nemají přímý vliv na stravitelnost organické hmoty (RICCIO, 2014).

#### **3. 8. 2 Vliv mykotoxinů na koně**

Koně jsou býložravci s jednoduchým žaludkem (*nonruminant*). V tlustém střevě dochází k aktivnímu mikrobiálnímu trávení potravy. V tenkém střevě dochází k absorpci živin před fermentačním kvašením. V důsledku toho jsou koně náchylnější k mykotoxinům než přežvýkavci. U přežvýkavců dochází k absorpci po fermentačním trávení. Vzhledem k nedostatku přesvědčivých vědeckých výzkumů týkajících se úrovně různých mykotoxinů snášených koňmi, by měl být kladen důraz na krmení

krmivý a pící prostou mykotoxinů. Při nadměrné kontaminaci krmiva plísněmi, je krmivo koňmi obvykle odmítáno. Při jejím požití dochází k poškození trávicího traktu. Mírná kolika je typickým případem nárazové intoxikace koně. Bohužel většina forem plísní nemění chuť a vůni v určitém stupni kontaminace a proto jsou zvířata často vystavována pravidelnému příjmu kontaminovaných zrn a píče. Limity mykotoxinů v krmivech při krmení koní jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Na rozdíl od jiných hospodářských zvířat, chovaných převážně k živočišné produkci potravin pro konečného konzumenta (člověk), za účelem co největšího zisku za krátký časový úsek, je dnes u koní kladen důraz na šlechtění chovů pro temperament, krásu, tradici chovu a sportovní využití. Z těchto důvodů byly pravděpodobně doposud výzkumy zaměřeny na zvířata živočišné produkce. Přesto že účinky mykotoxinu u koní nejsou zcela prozkoumané, ani zdokumentované ve vědecké literatuře, jsou však následky působení toxinů na organismus koně podstatné. Mykotoxiny mají za následek různé zdravotní problémy, včetně kolik, neurologických poruch, paralýz, přecitlivělosti a poškození mozku. Kumulativní vliv krmení při nízké hladině mykotoxinu přispívá k postupnému zhoršování funkcí orgánů, s tím spojené potlačení imunitního systému a zvýšení náchylnosti k infekcím. To má v následném důsledku vliv na tempo vývoje, využití krmiva, plodnost, dýchání, rychlost, schopnost vykonávat práci a životnost. Problémem je, že kumulativní vliv krmení při nízké hladině mykotoxinů může ovlivnit chov nebo výkon bez výskytu zjevných příznaků onemocnění (JONES, 2007).

**Tabulka č. 3: Maximální hodnoty toxinů přípustné v krmivech pro koně (JONES, 2007).**

Mykotoxin	Max. limit v ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Aflatoxin	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
T-2 Toxin	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$
DON	400 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Zearalenon	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Fumonisin	2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$

K faktorům které mají negativní vliv na obranyschopnost koně proti mykotoxinům, patří teplotní a vlhkostní stres, nutriční profil, přítomnost více toxinů, věk a reprodukční status (DIAZ, 2005).

Uvedené limity jsou založené na pozorování v terénu. Je zapotřebí kontrolované vědecké studie k objasnění tolerance koní k toxicitě určitých mykotoxin (JONES, 2007).

### **3. 8. 2. 1 Toxicita Aflatoxinu**

Na dvou různých koňských farmách byl pozorován vliv toxicity aflatoxinu vyskytujících se v arašídovém a kukuřičném krmivu. V jednom případě donutila zvýšená cena krmné rýže farmáře používat směs kukuřice a podzemnice olejné v kombinaci s rýží. Přičemž směs kukuřice a podzemnice tvořila 70 % krmné dávky. Reprezentativní vzorky směsi obsahovaly přibližně 0,2 mg/kg Aflatoxinu B1 a 0,2 mg/kg Aflatoxinu B2 . Velký počet zvířat (koní) prokazoval klinické příznaky oslabení, nemoci a 12 ročních hříbat zemřelo. Klinické příznaky byly také zpozorovány u poníků, kterým byla záměrně denně dávkována směs se zvýšeným množstvím Aflatoxinů. Vzorek z krmné směsi obsahoval 2 mg/kg Aflatoxin B1. Všechna zvířata zemřela během 76 hodin zkoušky. Poníci s přidělenou směsí o obsahu 0,3 mg B1/kg/den umírali v průběhu 12 a 16 dne. Klinické symptomy a biochemické změny byly pozorovány už při krmení směsí o obsahu 0,075 mg Aflatoxinu B1/kg/den. Klinické symptomy intoxikace Aflatoxiny se projevují ataxií, třesem, zvýšenou teplotou, podvýživou, ztrátou apetitu zvířete, úbytkem váhy, žloutenkou (nažloutlé bělmo zvířete), obsahem krve ve stolici a hnědým zbarvením moči. Cílovým orgánem shromažďování aflatoxinů jsou játra, kde toxin indukuje centrilobulární nekrózu jaterních buněk. První příznaky intoxikace se projeví již po 4 hodinách (FINK-GREMMELS, 2012).

### **3. 8. 2. 2 Toxicita Ochratoxinu A**

Výsledky intoxikace Ochratoxinem A u koní do dnes nejsou známé, ale předpokládá se, že budou podobné, jako u prasat (JONES, 2007).

### 3. 8. 3 Vliv mykotoxinů na prasata

Prasata jsou na výskyt mikromycet v krmivech obzvlášť citlivá. Snižuje se jejich rychlost vývoje a imunitní funkce. Výrobci krmiv si musí být vědomi citlivostí prasat na kontaminaci krmiv mykotoxiny a podle toho postupovat (JONES, 2007).

#### 3. 8. 3. 1 Vliv Aflatoxiny B1

Vliv Aflatoxinu B1 byl velmi rozsáhle studován. K snížení příjmu potravy u prasat dochází již při množství 20-200  $\mu\text{g/kg}$  v krmivu. Snížený příjem potravy může být dočasně kompenzován dodáním specifických dietních živin, jako jsou lysin nebo metionin. V závažných případech (1000-5000  $\mu\text{g/kg}$ ) u aflatoxikóz dochází k úmrtí. Aflatoxin M1 se dostává do mléka prasnic a má negativní vliv na jejich selata (JONES, 2007).

#### 3. 8. 3. 2 Vliv Deoxynivalenolu (vomitoxin) DON

Jeho koncentrace v krmivu v množství 300-500  $\mu\text{g/kg}$  je často doprovázená odmítáním krmiva, snížení hmotnosti a zvýšením výskytu infekčních onemocnění. Nadměrné množství DON v krmivu prasat může dojít až k vyvolávání zvracení. DON je také nazýván jako vomitoxin právě ve spojitosti se zvracením prasat (JONES, 2007).

#### 3. 8. 3. 2 Vliv Zearalenonu

Zearalenon má významný vliv na reprodukční schopnost prasat. Nejvíce jsou citlivé prasnice, které selata ještě neměla. Mezi pozorované příznaky patří zarudnutí, větší velikost vulvy a zvýšená velikost prsní tkáně. Zearalenon způsobuje embryonální úmrtnost v různých fázích březosti prasnice. Problémy s plodností jsou často spojovány s koncentrací Zearalenonu od 100 do 200  $\mu\text{g/kg}$  v krmivech (JONES, 2007).

**Tabulka č. 4: Povolené limity mykotoxinů v krmivech pro prasata (JONES, 2007).**

	Deoxynivalenolu ( $\mu\text{g/kg}$ )	Zearalenon ( $\mu\text{g/kg}$ )	Aflatoxin ( $\mu\text{g/kg}$ )
Prasata	300	200	100
Chovní samci	300	100	50

Tato úroveň limitů je stanovena na základě rozsáhlých terénních pozorování.

### **3. 8. 4 Vliv mykotoxinů u drůbeže**

Mykotoxiny, které se významně podílí na zdraví drůbeže, jsou produkovány rody hub *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Drůbež se vyznačuje svou zvýšenou citlivostí vůči Aflatoxinu. Ostatní druhy zvířat mají tendenci být citlivější spíše k účinkům Fumonosinů, Deoxynivalenolu a Zearalenonu oproti drůbeži. Nicméně obecně kontaminace výše uvedenými toxiny způsobuje mimo jiné i snížení nutriční hodnoty krmiva a její chutnosti. Vliv mykotoxinů na drůbež ovlivňuje několik faktorů, jako jsou fyziologický stav zvířete, věk, nutriční stav a doba expozice. Mykotoxikózy lze v polních podmínkách obtížně diagnostikovat. U nosnic lze tolerovat vyšší úroveň, než u mladých ptáků, ale úroveň by měla být stále menší než 50 µg/kg (DIAZ, 2005).

#### **3. 8. 4. 1 Vliv Aflatoxinu na organismus drůbeže**

Nejnáchylněji na expozici Aflatoxinu reaguje mladá drůbež, zejména kachny a krůty, které jsou na hladinu Aflatoxinu velice citlivé. Obecně platí, že při chovu drůbeže nemůže být překročeno 20 µg/kg Aflatoxinu ve stravě. Nicméně krmení i nižších úrovní než je 20 µg/kg snižuje imunitní systém drůbeže. Je snížená schopnost podléhání stresu, která souvisí s inhibicí imunitního systému. Inhibice imunitního systému a s tím způsobená vysoká náchylnost k produkci adrenalinu u drůbeže má vliv na velikost vejce a nižší produkci vajec. Je třeba věnovat zvláštní pozornost použití kontaminované kukuřice, která je obvykle silně kontaminovaná Aflatoxiny a je třeba ji proto užívat v krmných směsích v jistém poměru. Krmení kukuřicí má vliv na obsah metabolitů Aflatoxinu ve žloutku (DIAZ, 2005).

#### **3. 8. 4. 2 Vliv T-2 toxinu**

Samotný T-2 toxin může způsobit u drůbeže ústní i střevní léze. T-2 toxin tak narušuje imunitní systém, příjem krmiva a živin, což způsobuje pokles produkce vajec a úbytek na váze. Zvláště nebezpečná je pro drůbež kombinace T-2 toxinu a Aflatoxinu. Tato kombinace působí deformaci játry (JONES, 2007).

#### **3. 8. 4. 2 Vliv DON**

DON se vykazuje nízkým vlivem na organismus drůbeže. Nicméně někdy bývá spojován s nižší spotřebou krmiva (nechutenstvím) a může být ukazatelem přítomnosti T-2 toxinu a jiných (JONES, 2007).



### 3. 8. 5 Vlivy mykotoxinu na domestikovaná (zdomácnělá) zvířata

Mezi domestikovaná (zdomácnělá) zvířata zařazujeme všechna zvířata běžně opečovávaná v zajetí pro plnění funkce společníka, např. psi, kočky, morčata, králíci a jiné. V posledním desetiletí se dramaticky zvýšil počet domestikovaných zvířat ve vyspělých zemích světa. Nepříznivé vlivy toxinů mykotického původu byly zdokumentovány u mnoha druhů zejména hospodářských zvířat. Studii vlivu mykotoxinů na zdomácnělá zvířata nebyla doposud věnována příliš velká pozornost. Přírodní mykotoxikózy byly pozorovány vlivem Patulinu, Aflatoxinu, Moniliforminu a Ochratoxinu u psů, koček, králíků a norků. Pro nejtoxičtější z Aflatoxinů – Aflatoxin B<sub>1</sub> byly EU stanoveny maximální regulační limity v krmivech na 10 µg/kg (DIAZ, 2005).

#### 3. 8. 5. 1 Vlivy Aflatoxinu

Aflatoxiny vyskytující se v krmivech domestikovaných zvířat jsou sekundárními metabolity rodu kropidlák, např. *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus flavus*. Negativní důsledky toxicity Aflatoxinů byly prokázány u hospodářských zvířat, domestikovaných zvířat a lidí na celém světě. Kvůli jejich vysoké toxicitě a karcinogenitě byla Aflatoxinům věnována větší pozornost než ostatním mykotoxinům. V roce 1950 byla diagnostikována fatální hepatitida u psů jako prozatímní hepatitida X. V této době byla etiologie neznámá, nicméně příznaky byly podobné těm, které byly zpozorovány u otravy prasat při intoxikaci Aflatoxiny plesnivou kukuřicí. Po izolaci a chemické identifikaci toxinů produkovaných kropidlakem žlutým (*Aspergillus flavus*) byla zpozorována úzká souvislost mezi aflatoxikózou a hepatitidou X. Na základě těchto souvislostí byly provedeny experimentální studie, které prokázaly náchylnost psů na poškození jater aflatoxikózou. Kromě hepatitidy a náhlé smrti patří k příznakům u psů a koček nechutenství, zvracení, polydipsie, polyurie, anorexie, somnolence, hepatitida a deprese. Při pokusech se psy dochází k úmrtí do 3 dnů u psů vystavených vlivu smrtelné dávky Aflatoxinu 0,5-1 mg/kg tělesné hmotnosti psa. U koček je smrtelnou dávkou množství 0,3-0,6 mg/kg tělesné hmotnosti. Záleží však na stáří a fyzickém stavu zvířete. Nejcitlivějšími zdomácnělými zvířaty na Aflatoxiny jsou králíci (DIAZ, 2005).

Patologické zkoušky na zvířatech odhalily zvětšená játra, diseminovanou intravaskulární koagulaci a silné krvácení. Aflatoxikóza má letální účinky při množství 0,5-1 mg/kg obsaženého v krmivu, k zjevným vlivům na životní stav zvířete dochází po 14 dnech. Těžké patologické změny zahrnují sub serózní a sub mukózní krvácení

v oblasti hrudní a peritoneální dutiny. Bylo také popsáno silné vnitřní krvácení žlučníku, ledvin, nadledvinek, brzlíku a srdce. Vyšetřovací metoda histopatologie odhalila u chronické aflatoxikózy naopak sevřklá játra s extenzivním zhuštěním vazivové tkáně, která je ve vzájemném vztahu s hepatotoxickými Afekty aflatoxinu zpozorovaných u mnoha druhů zvířat včetně psů (DIAZ, 2005).

### **3. 9 Degradace mykotoxinů**

Snahou před dekontaminací, je předcházení jejich výskytu v krmivech. K následné neutralizaci již kontaminovaného krmiva se dnes využívá fyzikálních, chemických a biologických metod. Mykotoxiny jsou látky značně stabilní. Přesto je lze, i když někdy s obtížemi degradovat (RADA, 2012).

V potravinářství degradace mykotoxinů postrádá význam, neboť pro výrobu potravin se nesmí použít zplesnivělá surovina. Navíc produkty degradace mohou být rovněž toxické (KALHOTKA, 2014).

Anorganické vyvazovače na bázi jílovitých hornin jsou problematické z hlediska účinnosti, jsou specifické zejména k aflatoxinům a mohou nespecificky vázat řadu dalších živin a tím snižovat nutriční hodnotu krmiv. Byly také popsány případy, kdy přidání jílu dokonce zvyšovalo toxický účinek mykotoxinů. Z tohoto důvodu se pozornost v poslední době obrací na mikroorganismy (RADA, 2012).

#### **3. 9. 1 Fyzikální degradace mykotoxinů**

Současné fyzikální a chemické metody jsou drahé a často není zřejmé, zda nevedou jen k maskování mykotoxinů. Maskované mykotoxiny mohou být později aktivovány v trávicím traktu. Proto je alternativním přístupem deaktivace mykotoxinů v trávicím traktu zvířat. Příkladem deaktivace mykotoxinů v trávicím traktu může být např. adsorpce na interní částice nebo mikroorganismy, které odchází s výkaly. V současné době je známo několik desítek adsorbentů na bázi modifikovaných hlinitokřemičitanů nebo aktivního uhlí (RADA, 2012).

##### **3. 9. 1. 1 Adsorbenty – Aktivní uhlí**

Aktivní uhlí je ve vodném roztoku schopné za *in vitro* podmínek, což znamená v laboratorních podmínkách ve zkumavce efektivně absorbovat většinu mykotoxinů. V případě však *in vivo* podmínek, což znamená v organismu zvířete, žádný vliv u různě

aktivovaných uhlí pozorován nebyl. Absorpční vlastnosti aktivního uhlí jsou závislé na mnoha faktorech. Faktory zahrnují velikost pórů, velikost plochy povrchu, strukturu mykotoxinu a dávky. Aktivní uhlí vzniká pyrolýzou organické hmoty za nepřístupu kyslíku. Grafitové destičky vytvářejí mikro póry a poskytují velkou absorpční plochu, přibližně 800 – 1600 m<sup>2</sup>/g. Jedná se ale o adsorbent nespecifický. Jeho relativně nízká účinnost *in vivo* nese s sebou navíc vysoké riziko adsorpce jiných nepostradatelných živin (RADA, 2012).

### 3. 9. 1. 2 Adsorbenty – Silikátové minerály

Silikátové minerály jsou nejrozsáhlejší a nejkompexnější třídou adsorbentů mykotoxinů (DIAZ, 2005).

Ve výživě hospodářských zvířat se jako adsorbent používá kaolinit, bentonit nebo zeolit. Jedná se o velmi porézní horniny, které obsahují trojrozměrné matrice tetraedrů AlO<sub>4</sub> a SiO<sub>4</sub> tvořící síťovou strukturu s vysokou schopností vázat vodu. Díky kationtové-výměnné kapacitě řady dalších přítomných iontů váží i řadu jiných organických molekul (RADA, 2012).

#### Kaolinit

Kaolinit je vodnatý křemičitan hlinitý (Al<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub>(OH)). Je to minerál ve velké míře zastoupen v horninách kaolínu. Mimo AlO<sub>4</sub> a SiO<sub>4</sub> nemá žádné další substituce jinými prvky.

#### Bentonit

Bentonit je oproti tomu chemicky proměnlivá a hůře definovaná hlinitokřemičitá hornina, jejíž hlavní složkou jsou smektity, nejčastěji montmorillonit (vodnatý křemičitan hlinitý a hořečnato-vápenatý, (Na; Ca)<sub>0,3</sub>(Al; Mg)<sub>2</sub>Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>.nH<sub>2</sub>O). Kromě toho obsahuje i další příměsi jako kaolinit.

V závislosti na složení se rozlišují tzv. silně bobtnavé a méně bobtnavé bentonity, přičemž ty silně bobtnavé jsou považovány za kvalitnější. Bobtnavost je dána obsahem smektitů, tedy hlavně montmorillonitu. Dalším měřítkem kvality v přímé souvislosti se schopností vázat mykotoxiny je kationtová výměnná kapacita (CEC).

Dříve byly považovány za standard kvality bentonity z USA, nové studie ukazují, že některé hnědé bentonity z Indie nebo Řecka mohou být i kvalitnější (RADA, 2012).

## HSCAS

Z bentonitů je zřejmě nejvíce prozkoumaný Novasil (Novasil PLUS<sup>TM</sup>), jehož druhým názvem je HSCAS a je distribuován firmou BASF. Novasil je selektivní vyvazovač AFB<sub>1</sub>. Novasil není tedy efektivní v případě jiných mykotoxinů. První studii na HSCAS publikoval T. D. Phillips (v publikaci Hydrated sodium calcium aluminosilicate a high affinity sorbent for aflatoxin z roku 1988), kdy u brojlerů podávání HSCAS při současné intoxikaci AFB<sub>1</sub> v dávce 7,5 mg/kg krmiva významně snížil dopad intoxikace, téměř na úroveň kontroly. Výsledky byly potvrzeny i v dalších studiích. *In vitro* i *in vivo* je HSCAS téměř dvakrát účinnější než vyvazovače na bázi kvasinek. Při přidavku 0,5 % NovaSil HSCAS do krmiva s 3 mg/kg AFB<sub>1</sub> došlo ke zvýšení přírůstku na úroveň 84 % kontroly bez AFB<sub>1</sub>. Adsorpce ostatních mykotoxinů jako Zearalenon, Ochratoxin A a Fumonisin je ale slabší nebo vůbec žádná. Po několika letech experimentů a prodeje komerčních produktů založených na HSCAS a dalších bentonitech je v tomto sektoru zřetelný trend vedoucí k vývoji širokospektrálních vyvazovačů založených na glukanech, hlinitokřemičitanech a enzymech vedoucích k biologické transformaci mykotoxinů na metabolicky méně aktivní nebo neaktivní produkty (RADA, 2012).

### **3. 9. 1. 3 Organojíly**

Mimo bentonity jsou jako absorpční jíly využívány zeolity. Zeolity jsou rozsáhlou skupinou silikátových hornin, z nichž nejznámější je klinoptiolit. Zeolity nebo bentonity mohou být chemicky modifikovány obohacováním o NaCl, což mění jejich sorpční kapacitu a specifitu. Modifikace NaCl a modifikace Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> rovněž významně mění sorpci amoniaku, vyšší podíl Ca<sup>2+</sup> ovlivňuje sorpci negativně (RADA, 2012).

Zeolity se také vyznačují schopností vázat a ztrácet vodu bez změny krystalické struktury (DVORAK, 1989).

Zeolity jsou mimo jiné využívány jako iontoměniče při úpravách a odsolování vody. Klinoptiolit je přírodní zeolit často využívaný ve výživě zvířat. Mimo to se uplatňují syntetické zeolity, které nachází četné průmyslové aplikace, mj. jako molekulová síta. Rozměry dutin jsou ale obvykle mnohem větší než u přírodních zeolitů (RADA, 2012).

Limitem jílových vyvazovačů je jejich specifický účinek pouze k aflatoxinům a jejich nízký případně velmi malý účinek k ostatním mykotoxinům. Toto omezení může být překonáno chemickými modifikacemi. Podstatou těchto modifikací jsou změny povrchových vlastností, kterých se dosahuje výměnou strukturálních kationtů nahrazených kvarterními amniiovými sloučeninami s vysokou molekulovou hmotností. Touto změnou vzrůstá hydrofobicita.

#### Modifikované organolity

V několika studiích byla testována schopnost organozeolitů vázat některé mykotoxiny *in vitro*. Výsledky těchto studií prokázaly, že modifikované zeolity (organozeolity) efektivně adsorbují AFB<sub>1</sub>, ZEA, OTA a FB<sub>1</sub>. Adsorpce AFB<sub>1</sub> však u modifikovaných zeolitů poklesla ve srovnání s nemodifikovanými zeolity. Výsledky, které prokázaly rozdílná množství navázaných ZEA, OTA a AFB<sub>1</sub> naznačují rozdílnosti funkčních skupin a rozdílný tvar molekul těchto mykotoxinů. To potvrzuje, že fyzikální a chemické vlastnosti mykotoxinů ovlivňují schopnost organominerálních materiálů je vázat. Na základě provedených studií lze říci, že organozeolity mohou být využívány jako krmná aditiva adsorbující mykotoxiny, pokud však bude jejich účinnost prokázána také v *in vivo* studiích.

#### Amadeite

Jiným příkladem organojílů je produkt, který je součástí komerčního produktu Amadeite<sup>®</sup> (Olmix, s. a.). Tento produkt je montmorillonitem modifikovaný extraktem ze zelených mořských řas (RADA, 2012).

### **3. 9. 2 Biologické degradace mykotoxinů**

Mikroorganismy jsou schopny snižovat toxický účinek mykotoxinů na organismus zvířete několika způsoby, jedním z nich je adsorpce, druhým enzymatická detoxikace. Adsorpce a enzymatická detoxikace mykotoxinů byla popsána u řady mikroorganismů, jak např. půdních hub, tak i některých mikroorganismů přirozeně se vyskytujících v trávicím traktu zvířat (RADA, 2012). V průběhu posledních let byla testována účinnost mnoha druhů mikroorganismu z hlediska biologické degradace mykotoxinů, z nichž pouze u některých byla prokázána schopnost degradovat mykotoxiny (OLSEN, 2004).

### **3. 9. 2. 1 Adsorpce mikroorganismů při degradaci mykotoxinů**

Adsorpce probíhá na povrch buněčné stěny. Adsorpce je interakce mezi toxinem a funkčními skupinami na povrchu buňky, založené na fyzikální adsorpci, výměně iontů a komplekaci. Tyto interakce nejsou závislé na metabolismu buňky. Komponenty buněčné stěny zahrnují polysacharidy, proteiny a lipidy, které vytvářejí velkou i mezidruhovou variabilitu navzájem odlišných adsorpčních center na bázi různých vazebných mechanismů (OLSEN, 2004).

### **3. 9. 2. 1 Enzymatická detoxikace**

Příkladem může být degradace aflatoxinu vlastním myceliem pomocí enzymu peroxidáza. Některé mikroorganismy *Falvobacterium*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* degradují Patulin. Některé mykotoxiny degraduje mikroflóra bachoru a intestinální mikroflóra dalších zvířat také pomocí enzymatických reakcí.

#### Kvasinky a bakterie mléčného kvašení (BMK) – degradace mykotoxinů

Zajímavých výsledků bylo dosaženo s některými druhy kmeny *Saccharomyces* a bakterií mléčného kvašení. Studie se zaměřují především na probiotické kmeny BMK (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*) a kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*).

Několik desítek pokusů potvrdilo schopnost kvasinek a BMK vázat některé molekuly, jako jsou např. toxiny a ionty kovů prostřednictvím vazebných struktur na povrchu buněčných stěn. Výhodou je, že se tyto mikroorganismy často přirozeně vyskytují jak v traktu zvířat, tak i ve fermentovaných potravinách a krmivech. Některé skupiny BMK jsou již dnes využívány jako aditiva a to především při silážování (RADA, 2012).

### **3. 10 Mykotoxiny v krmivech legislativa**

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 574/2011 ze dne 16. Června 2011, kterým se mění příloha i směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech

- Nařízení stanovuje legislativně závazné limity pro aflatoxin B1 a námel v krmivech

DOPORUČENÍ KOMISE č. 2005/187/EC ze dne 2. března 2005 o koordinovaném programu kontrol v oblasti výživy zvířat pro rok 2005 dle směrnice Rady 95/53/ES

- Doporučení členským státům provádět koordinovaný program kontrol koncentrace mykotoxinů (aflatoxinu B1, Ochratoxinu A, zearalenonu, deoxynivalenolu a Fumonisinů) v krmivech v roce 2005
- Příloha obsahuje směrné hodnoty koncentrace vybraných mykotoxinů v krmivech

DOPORUČENÍ KOMISE Č. 2005/925/EC ze dne 14. Prosince 2005 o koordinovaném programu kontrol v oblasti zvířat pro rok 2006 dle směrnice Rady 95/53/ES

- Doporučení členským státům provádět koordinovaný program kontrol koncentrace mykotoxinů (Aflatoxinu B1, Ochratoxinu A, Zearalenonu, Deoxynivalenolu a Fumonisinů) v krmivech v roce 2006
- Příloha obsahuje směrné hodnoty koncentrace vybraných mykotoxinů v krmivech

DOPORUČENÍ KOMISE č. 2006/576/EC ze dne 17. srpna 2006 o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat

- Výzva členským státům, aby prováděly intenzivní monitoring přítomnosti dotčených mykotoxinů (i ve spolupráci s provozovateli krmivářských podniků)
- Příloha obsahující směrné hodnoty dotčených mykotoxinů pro produkty určené ke krmení zvířat

DOPORUČENÍ KOMISE č. 2006/583/ES ze dne 17. srpna 2006 k prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin

- Hlavními zdroji příjmu fusariových toxinů v potravě jsou výrobky z obilovin, zejména z pšenice a kukuřice.
- Rizikové skupiny (např. kojenci a malé děti) se blíží hodnotám přijatelného denního příjmu (viz. DON)
- Příloha obsahuje zásady prevence a snižování kontaminace obilovin fusariovými toxiny (FLORIAN, 2013).

### **3. 11 Limity**

Protože jsou mykotoxiny pro zvířata toxické a karcinogenní, v mnoha zemích je jejich množství v krmivech regulováno stanovenými limity. Nedávné výsledky průzkumu FAO/WHO ukázaly, že více než 100 zemí má stanovené regulační mezní hodnoty pro výskyt aflatoxinů v krmivech. Nejprísnější regulace se vztahuje k obsahu aflatoxinů pro jeho nejvyšší toxicitu a karcinogenitu ze všech současných mykotoxinů (DIAZ, 2005)

#### **Limity v krmivech pro Aflatoxin B1 v ČR**

<u>Aflatoxin B1</u>	<u>mg/kg</u>
---------------------	--------------

<u>Krmné suroviny</u>	<u>0,020</u>
-----------------------	--------------

<u>Doplňková a kompletní krmiva</u>	<u>0,010</u>
-------------------------------------	--------------

<u>Doplňková a kompletní krmiva pro dojnice a telata, pro ovce pro produkci mléka a jehňata, pro kozy pro produkci mléka a kůzlata, pro selata a mláďata drůbeže</u>	<u>0,005</u>
--	--------------

<u>Doplňková a kompletní krmiva pro skot (s výjimkou dojnic a telat), ovce (s výjimkou ovcí pro produkci mléka a jehňat), kozy (s výjimkou koz pro produkci mléka a kůzlat), prasat (s výjimkou selat) a drůbeže (s výjimkou mláďat drůbeže)</u>	<u>0,020</u>
--	--------------

#### **Směrné hodnoty v krmivech pro Deoxynivalenol v ČR**

<u>Deoxynivalenol</u>	<u>mg/kg</u>
-----------------------	--------------



Obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice	8,000
<u>Vedlejší produkty kukuřice</u>	<u>12,000</u>
<u>Doplňková a komplexní krmiva pro prasata</u>	<u>0,900</u>
Doplňková a komplexní krmiva pro telata (<4 měsíce), jehňata a kůzlata	2,000
<u>Doplňková a komplexní krmiva</u>	<u>5,000</u>

### **Směrné hodnoty v krmivech pro Zearalenon v ČR**

<b>Zearalenon</b>	<b>mg/kg</b>
Obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice	2,000
<u>Vedlejší produkty kukuřice</u>	<u>3,000</u>
Doplňková a kompletní krmiva pro selata a prasničky (mladé prasnice)	0,100
Doplňková a komplexní krmiva pro prasnice a výkrm prasat	0,250
Doplňková a komplexní krmiva pro telata, dojnice, ovce (včetně jehňat) a kozy (včetně kůzlat)	0,500

### **Směrné hodnoty v krmivech pro Ochratoxin A v ČR**

<b>Ochratoxin A</b>	<b>mg/kg</b>
<u>Obiloviny a produkty obilovin</u>	<u>0,250</u>
<u>Doplňková a kompletní krmiva pro prasata</u>	<u>0,050</u>
<u>Doplňková a kompletní krmiva pro drůbež</u>	<u>0,100</u>

## Směrné hodnoty v krmivech pro Fumonosin B1 + B2 v ČR

### Fumonosin B1 + B2 mg/kg

Kukuřice a produkty kukuřice 60,000

Doplňková a kompletní krmiva pro prasata, koně, králíky a zvířata v zájmovém chovu 5,000

Doplňková a kompletní krmiva pro ryby 10,000

Doplňková a kompletní krmiva pro drůbež, telata (< 4měsíce), jehňata a kůzlata 20,000

Doplňková a kompletní krmiva pro přežvýkavce (>4 měsíce) a norky 50,000

(FLORIÁN, 2013)

## 4 ZÁVĚR

Bakalářská práce uvádí do problematiky mikroskopických vláknitých hub a jejich působení sekundárních metabolitů (mykotoxinů). Především se zaměřuje na krmivářsky významné mykotoxiny, jež poměrně podrobně popisuje a charakterizuje. Vyznačuje jejich vliv na užitkovost, chov a celkový fyzický stav zvířete. Zaměřuje se také na příčiny výskytu plísní v krmivech, možnosti předcházení jejich vzniku a následnou degradaci mykotoxinů absorbenty.

Z e zjištěných poznatků usuzuji, že největším negativy výskytu mykotoxinů jsou:

- V krmivu se často vyskytuje více druhů mykotoxinů.
- Existují interakce mezi mykotoxiny navzájem i mezi mykotoxiny a jinými stresovými faktory.
- Interakce mezi mykotoxiny zhoršuje jejich negativní účinek a ztěžuje správnou diagnózu.
- Přirozeně zamořená krmiva vykazují vyšší toxicitu, než krmiva se stejnou hladinou čistého mykotoxinu dodaného do krmiva uměle (interakce s dalšími nestanovenými mykotoxiny)

V současné době ještě není příliš vědecky podložených informací o maskovaných mykotoxinech. Jejich studiu je dnes věnována velká pozornost. Problémem prozatím zůstává schopnost maskovaných mykotoxinů unikát běžným analytickým stanovením.

Nedávné výsledky FAO/WHO ukázaly, že více než 100 zemí má dnes stanovené regulační mezní hodnoty pro výskyt mykotoxinů v krmivech. Nejpřísnější regulace se vztahuje k obsahu aflatoxinů pro jeho nejvyšší toxicitu a karcinogenitu ze všech současných mykotoxinů.

Mým závěrem je poznatek a usouzení, že velkým problémem hlavně malých chovatelů jsou subklinické projevy, které jsou reakcí na intoxikaci mykotoxiny a jejich příznaky jsou mírnější než klinické projevy. Projevují se méně výrazným zhoršením užitkovosti a fyzického stavu zvířete. Pro jejich mírný charakter jsou často přehlíženy a zvířatům je tak stále podáváno kontaminované krmivo.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AINSWORTH, G., G. R. BISBY a D. HAWKSWORTH., 2008: *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi* [online]. [cit. 2015-04-04]. ISBN 08-519-8885-7. Dostupné z: <https://katalog.mendelu.cz/>
- BAČINA A., 2014: *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní metody* [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/vyuka.aspx>
- BARR D. J. S., 1992: *Mycologia: Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of mycologist* [online]. [cit. 2015-04-04]. ISBN 1557-2536. Dostupné z: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/3760397?sid=21106343934733&uid=2&uid=2129&uid=4&uid=70>
- BETINA V., 1999: *Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects: bioactive molecules volume 9*. Amsterdam: Elsevier, 437 s. ISBN 04-449-8885-8.
- COUFAL P., 2005: *Analytické separační metody* [online]. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/welcome.html>
- DIAZ, D. E., 2005: *The mycotoxin blue book*. Reprinted. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2005. ISBN 19-047-6119-4.
- FASSATIOVÁ O., 1986: *Moulds and filamentous fungi in technical microbiology*. New York: Elsevier, 233 p. ISBN 04-449-9559-5.
- FINK-GREMMELS J., 2012: *Animal feed contamination: effects on livestock and food safety* [online]. Philadelphia: Cambridge, U. K. [cit. 2015-04-04]. ISBN 9780857093615. Dostupné z: <https://katalog.mendelu.cz/>
- FLORIÁN M., 2013: Systém kontroly a monitoringu mykotoxinů v krmivářské praxi. In: *EAGRI: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2013\\_seminar-mykotoxiny-a-zemedelska-produkce.html](http://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2013_seminar-mykotoxiny-a-zemedelska-produkce.html)
- HONZLOVÁ A., 2015: Vyšetřování mykotoxinů na SVŮ Jihlava. In: *Státní veterinární ústav Jihlava* [online]. Jihlava, [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://www.svujihlava.cz/>
- CHEŁKOWSKI J., 1989: *Fusarium: mycotoxins, taxonomy, and pathogenicity* [online]. New York: Elsevier. ISBN 04-448-7468-2 [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: <https://books.google.cz/>

JESENSKÁ Z., 1993: *Micromycetes in foodstuffs and feedstuffs*. Amsterdam: Elsevier, 1993, x, 256 s. Progress in Industrial Microbiology. ISBN 04-449-8684-7.

JONES, F. T., M. B. GENTER a W. M. HAGLER, 2007: *Understanding and coping with effects of mycotoxins in livestock feed and forage* [online]. North Carolina cooperative extension service, [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: [http://www.cals.ncsu.edu/an\\_sci/extension/animal/nutr/Understanding\\_mycotoxins.pdf](http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/animal/nutr/Understanding_mycotoxins.pdf). Helping people put knowledge to work. North Carolina state University.

KALHOTKA L., 2014: *Mikromycety - vláknité mikroskopické houby (plísňe) a kvasinky - v prostředí člověka*. Brno: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-943-8.

KOBLÍŽEK, J. a R. ŘEPKA., 2007: *Systematická botanika*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 978-807-3750-244.

KŘÍŽOVÁ L., 2013: Vliv výživy hospodářských zvířat na kvalitu živočišných produktů s důrazem na zdraví člověka. In: *Agrovýzkum: Výzkumný ústav pro chov skotu* [online]. Rapotín, [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: [http://www.vuchs.cz/akce/2009-11\\_2010-03-Vliv-vyzivy-hospodarskych-zvirat-na-kvalitu-zivocisnych-produktu/prezentace.html](http://www.vuchs.cz/akce/2009-11_2010-03-Vliv-vyzivy-hospodarskych-zvirat-na-kvalitu-zivocisnych-produktu/prezentace.html)

MADDISON, D. R., K. S. SCHULZ a W. P. MADDISON., 2007: *Tree of Life Web Project* [online]. University of Arizona, Tuscon AZ 85721 U.S.A.: Zootaxa [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: <http://tolweb.org/tree/>

MAXDORF., 2010: *Velký lékařský slovník* [online]. 4. vydání. Praha: Maxdorf s.r.o, 2010 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/>

OLSEN, M. a N. MAGAN., 2004: *Mycotoxins in food Detection and control* [online]. Cambridge: Woodhead Pub [cit. 2015-04-06]. ISBN 18-557-3908-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/>

OSTRÝ V., 1998: *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha: Státní zdravotní ústav. ISBN 80-7071-102-7.

PLAŠKOVÁ P., 2008: *Biokoroze anorganických materiálů* [online]. Univerzita Tomáše Bati ve Zlín, [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/7513>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

RADA, V. a J. HAVLÍK., 2012: Transformace mykotoxinů střevními mikroorganismy. In: VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v. v. i. *Transformace mykotoxinů střevními*

*mikroorganismy: Mykotoxiny studie 2012* [online]. Praha, s. 68 [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: [www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Mykotoxiny%20studie%202012.pdf](http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Mykotoxiny%20studie%202012.pdf)

RICCIO, M. B., M. O. TAPIA, G. MARTÍNEZ, S. ARANGUREN, S. DIEGUEZ, A. L. SORACI a E. RODRÍGUEZ., 2014: *Effect of the combination of crude extracts of Penicillium griseofulvum and Fusarium graminearum containing patulin and zearalenone on rumen microbial fermentation and on their metabolism in continuous culture fermenters*. 2014-06-30, vol. 68, issue 4, s. 309-319. DOI: 10.1080/1745039X.2014.927709. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1745039X.2014.927709>

SMITH, J. E. A R. S. HENDERSON, 1991: *Mycotoxins and animal foods* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press, 875 p. [cit. 2015-04-05]. ISBN 08-493-4904-4. Dostupné z: <http://books.google.cz/>

ŠILHÁNKOVÁ L., 2002: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. A dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

WATLING R., 2002: *Tropical mycology* [online]. New York: Wallingford CABI Publishing, 2 v. [cit. 2015-04-04]. ISBN 0-85199-543-8. Dostupné z: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20023069146>