



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů

Bakalářská práce

Aflatoxin M1 v mléce v závislosti na ročním období

Autor práce: Tereza Rohrbacherová

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Samková, Ph.D.

Konzultant práce: doc. MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

České Budějovice
2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnocení přítomnosti aflatoxinu M1 (AFM1) v mléce v závislosti na ročním období. Stanovení AFM1 v bazénových vzorcích syrového kravského mléka bylo provedeno ve čtyřech ročních obdobích roku 2022 u 172 vzorků mléka z 30 farem. Byla použita testovací souprava Charm MRL AFM1 (Charm), která umožňuje kvantitativní stanovení AFM1. Nejvyšší zastoupení vzorků, u kterých byl AFM1 detekován, bylo pozorováno v podzimním období (18,6 %), nejnižší v letním období (9,4 %). Z celkového počtu 172 analyzovaných vzorků byly pouze dva vzorky s hodnotou přesahující MRL Evropské unie (tj. 0,05 µg/kg). Průměrný obsah AFM1 v mléce za rok 2022 činil 0,0037 µg/l.

Klíčová slova: mléko, bazénové vzorky mléka, kvalita mléka, aflatoxin M1, roční období

Abstract

The aim of the bachelor thesis was to evaluate the presence of aflatoxin M1 (AFM1) in raw cow's milk, depending on the season. In four terms of 2022, the determination of AFM1 in 172 bulk milk samples from 30 farms was carried out. The Charm MRL AFM1 test kit (Charm), which allows the quantitative determination of AFM1, was used. The highest proportion of samples in which AFM1 was detected was observed in the autumn (18.6 %), and the lowest in the summer (9.4 %). Only two samples had a value above the MRL of the European Union (i.e. 0.05 µg/kg). The average content of AFM1 in milk for the year 2022 was 0.0037 µg/l.

Keywords: milk, bulk milk, milk quality, aflatoxin M1, season

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, jež mi byli velkou oporou při psaní mé bakalářské práce. V první řadě bych chtěla poděkovat paní prof. Ing. Evě Samkové, Ph.D., a to nejen za odborné vedení mé práce, ale především za její drahocenný čas a nesmírnou dávku trpělivosti a ochoty. Dále bych také ráda poděkovala konzultantce paní doc. MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. Samozřejmě velké díky taktéž patří odborníkům, díky nimž jsem měla k dispozici prostředí, vybavení a vzorky. Zvláště děkuji vedoucí laboratoře v mlékárně Madeta a.s., paní Ing. Veronice Střelečkové, která mi poskytla potřebnou pomoc a vedení během mé práce v laboratoři a společnosti O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., která poskytla analyzátor nezbytný pro praktickou část této práce. Na závěr bych ráda vyjádřila svůj vděk každému, kdo mě po celou dobu studia podporoval. Především děkuji své rodině a přátelům, jež mi vždy stáli po boku a podporovali mě na každém kroku. Právě jejich neutuchající podpora a povzbuzování mi dodávaly sílu a motivaci.

Obsah

Úvod.....	7
1 Literární přehled.....	8
1.1 Mykotoxiny a jejich výskyt.....	8
1.1.1 Vliv mykotoxinů na lidské zdraví.....	10
1.1.2 Legislativa pro mykotoxiny v potravinách a krmivech.....	11
1.2 Aflatoxiny.....	13
1.2.1 Charakteristika a vznik AFM1.....	14
1.2.2 Producenti aflatoxinů.....	16
1.3 Výskyt AFM1 v mléce ve světě a v České republice.....	19
1.4 Výskyt AFM1 v závislosti na ročním období.....	20
2 Cíl práce.....	23
3 Materiál a metodika.....	24
3.1 Charakteristika a odběr vzorků mléka.....	24
3.2 Analýzy vzorků mléka.....	24
3.2.1 Stanovení kvalitativních parametrů mléka.....	24
3.2.2 Stanovení AFM1.....	25
3.3 Statistické vyhodnocení dat.....	26
4 Výsledky a diskuze.....	27
4.1 Celkové vyhodnocení monitoringu AFM1 v syrovém kravském mléce.....	27
4.2 Vyhodnocení monitoringu AFM1 v závislosti na ročním období.....	30
4.3 Vliv přítomnosti AFM1 na kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka	
31	
Závěr.....	36
Seznam použité literatury.....	37
Seznam elektronických zdrojů.....	45
Seznam obrázků.....	46

Seznam tabulek	47
Seznam grafů.....	48
Seznam použitých zkratk.....	49

Úvod

Mléko je významnou složkou lidské výživy. Je zdrojem důležitých živin nezbytných pro organismus, jako jsou bílkoviny, tuky, vitaminy a minerální látky. Tyto nutrienty mají velký význam pro udržení zdravého růstu, stavbu kostí či zubů.

Jedním z aspektů negativně ovlivňujících kvalitu mléka je přítomnost kontaminujících látek, mezi něž se zařazují i mykotoxiny. Výskyt mykotoxinů v zemědělských produktech a jejich škodlivé účinky na člověka a zvířata nejsou záležitostí posledních několika let, ale provázely producenty a konzumenty rostlinných produktů od nepaměti. V potravinovém řetězci se původní mykotoxin může přeměnit na jiné toxické sloučeniny a dostat se ke spotřebiteli. Názorným příkladem je výskyt aflatoxinu M1 v mléčných výrobcích, který je důsledkem přítomnosti aflatoxinu B1 v krmivu.

Kontaminaci krmiv plísněmi a následné tvorbě toxinů však není možné v zemědělské výrobě zcela zamezit, proto je velmi důležitá pravidelná kontrola kvality krmiv, ale také kontrola přítomnosti mykotoxinů v zemědělských produktech a potravinách.

Cílem této práce je vyhodnocení přítomnosti aflatoxinu M1 v mléce v závislosti na ročním období.

1 Literární přehled

1.1 Mykotoxiny a jejich výskyt

Dle Miraglia et al. (2004) jsou považovány mykotoxiny za jedny z nejstarších příčin onemocnění vyvolaných konzumací kontaminovaných potravin/krmiv u lidí i zvířat.

Jedná se o mimořádně významné sekundární metabolické produkty plísní představujících skupinu biotoxinů, tj. toxinů přírodního původu. Vyskytují se především na rostlinách a produktech, jež jsou z nich vyráběny. Lze je klasifikovat jako primární kontaminanty neboli takzvané exogenní látky, které se netvoří přirozeně v samotné surovině nebo potravíně (Matissek, 2020).

Mikroskopické vláknité houby (plísně, mikromycety) produkující mykotoxiny se mohou vyvíjet téměř na jakémkoli pevném nebo tekutém nosiči, pokud jsou splněny příznivé podmínky prostředí. I když dojde k rychlému růstu určité plísně na substrátu, nemusí to nutně znamenat, že dochází k produkci mykotoxinů. Nicméně skutečnost, že je v daném prostředí velké množství plísní, znamená také větší pravděpodobnost vzniku velkého množství mykotoxinů (Bhat et al., 2010; Battilani et al., 2012; Campagnollo et al., 2016).

Mikroskopické vláknité houby mohou při vhodných teplotních a vlhkostních podmínkách kontaminovat zemědělské komodity jak během předsklizňové přípravy (na poli), tak po sklizni při skladování, přepravě a zpracování. Negativním důsledkem je produkce již zmíněných mykotoxinů (Bhat et al., 2010).

Mezi chemickými škodlivinami v potravinách hrají mykotoxiny mimořádně důležitou roli. Jak uvádí Eskola et al. (2020), více než 25 % zemědělské produkce je kontaminováno mikromycetami. Dosud bylo identifikováno asi 400 různých mykotoxinů, ale pouze asi 20 z nich, syntetizovaných různými druhy hub, představuje významné přírodní kontaminanty v krmivech a potravinách. Mezi nejdůležitější producenty se řadí *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Claviceps*. Tabulka 1.1 znázorňuje vybrané druhy plísní a jejich metabolity.

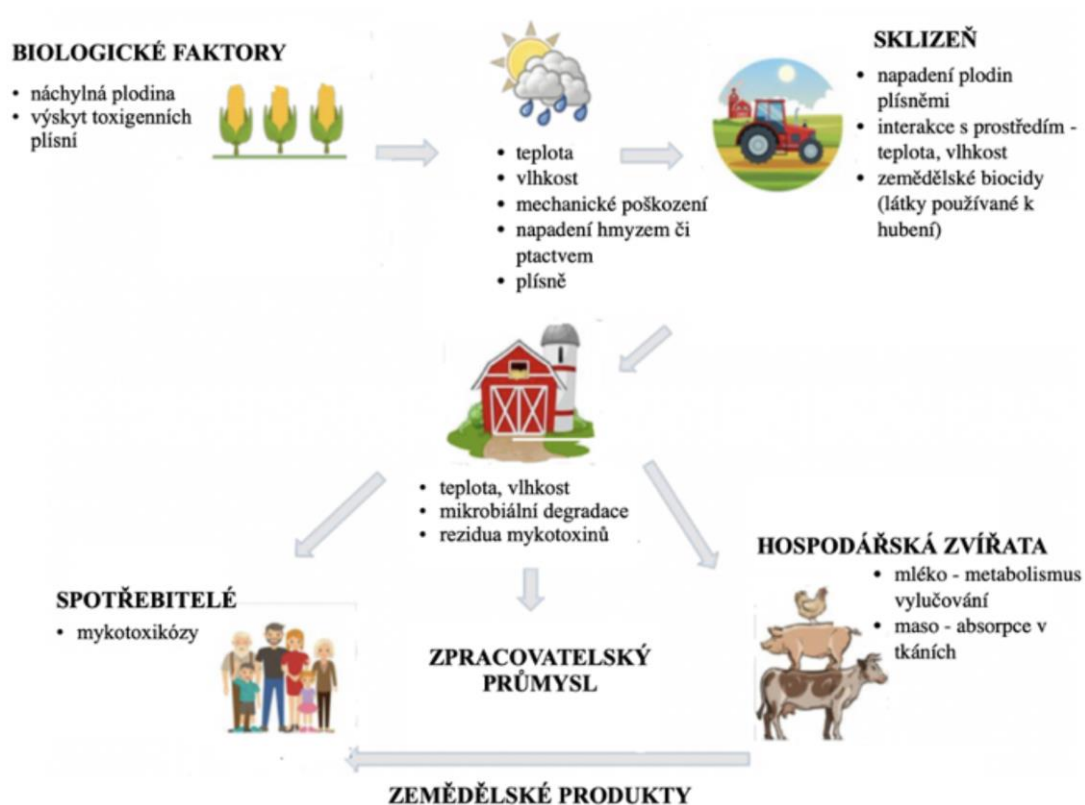
Tabulka 1.1: Příklady nejvýznamnějších mykotoxinů

Rod	Druh	Mykotoxiny
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxiny B1, B2, G1, G2
	<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxiny B1, B2
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxin A
<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	T-2 toxin
	<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxynivalenol, zearalenon
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisin B1
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxin A

Zdroj: Velíšek a Hajšlová (2009)

Mykotoxiny byly nalezeny v celé řadě rostlinných produktů (rýže, pšenice, žito, ječmen, kukuřice, sója, čirok, ořechy, koření), živočišných produktů (mléčné výrobky, maso, vejce), potravin (pečivo, těstoviny, snídaňové cereálie), nápojů (ovoce, šťávy a pyré, pivo a víno) a krmiv (Paterson et al., 2009; Bhat et al., 2010).

Charakter a množství produkovaných mykotoxinů jsou plně ovlivněny druhem produkčního organismu a vzájemným působením různých faktorů, jako je například typ substrátu, dostupné živiny, vlhkost suroviny, aktivita vody, teplota, vlhkost vzduchu, zralost plísňových kolonií, biologická konkurence, fyzické poškození substrátu v důsledku činnosti hmyzu (obrázek 1.1). Kontaminace potravin mykotoxiny se tedy může lišit v závislosti na zeměpisné poloze, podmínkách při výrobě a způsobu skladování, jakož i na druhu potravin (Paterson et al., 2009).



Obrázek 1.1: Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách a krmivech (dle Patersona a Limy, 2010)

1.1.1 Vliv mykotoxinů na lidské zdraví

Mykotoxiny jsou známé širokou škálou negativních účinků na lidský i zvířecí organismus. Tyto mohou nastupovat buď akutně, v případě vysokých přijatých dávek a vést např. k poškození ledvin či jater, nebo mají chronický charakter. Dlouhodobé působení mykotoxinů může vést k závažným poškozením na úrovni buněk, mutagenním a karcinogenním účinkům (tabulka 1.2) (Köppen et al., 2010).

Tabulka 1.2: Přehled nejvýznamnějších mykotoxinů a jejich biologické účinky

Mykotoxin	Zkratka	Toxické účinky
Aflatoxiny	AF	hepatotoxické, karcinogenní
Ochratoxin A	OTA	hepatotoxické, nefrotoxicke
Fumonisin	FB	hepatotoxické, neurotoxicke
Zearalenon	ZEN	estrogenní, teratogenní

Deoxynivalenol	DON	hepatotoxické, mutagenní
T-2 toxin	T-2	hepatotoxické, mutagenní, strumigenní
Citrinin	CIT	hepatotoxické, nefrotické
Patulin	PAT	hepatotoxické, mutagenní, teratogenní

Zdroj: Sirbu et al (2020)

1.1.2 Legislativa pro mykotoxiny v potravinách a krmivech

Vzhledem k tomu, že v některých zemích je mnoho lidí dlouhodobě vystaveno vysokým hladinám mykotoxinů ve stravě, snaží se evropská legislativa sjednotit maximální limity mykotoxinů v potravinách a krmivech pro všechny členy Evropské unie a tím zavázat všechny země ke společným pravidlům (Duraković et al., 2010).

Evropská unie má striktní předpisy týkající se povoleného množství mykotoxinů a aflatoxinu M1 v potravinách a krmivech (tabulka 1.3). Tyto limity jsou stanoveny dle:

- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Úřední věstník Evropské unie L 364/5.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1126/2007, kterým se mění nařízení ES č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a vy výrobcích z kukuřice.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 165/2010, kterým se mění nařízení (ES) č.1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o aflatoxiny.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 105/2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 594/2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální obsah některých kontaminantů v potravinách, stanoví limity pro obsah a určení ochranných opatření pro aflatoxin M1 (AFM1) v mléce a mléčných výrobcích.

Obecně se regulační orgány pokoušejí stanovit takové limity, které minimalizují riziko nepříznivých zdravotních účinků a zároveň umožňují určitou míru nevyhnutelné kontaminace (Lee a Ryu, 2017).

Tabulka 1.3: Limity pro mykotoxiny stanovené dle Evropské unie

Druh	Potravina/krmivo	ML (µg/kg)
Aflatoxin B1	Obiloviny a obilné produkty	2-10
Aflatoxin B1	Koření	5-15
Aflatoxin B1	Krmné suroviny	0,02
Aflatoxin B1, B2, G1, G2	Obiloviny a obilné produkty	4
Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1	Dětská výživa	0,10
Aflatoxin M1	Mléko a mléčné produkty	0,05
Citrinin	Potravinářské přísady	200
Deoxynivalenol	Obiloviny	750
Fumonisin B1	Nezpracovaná kukuřice	4000
Fumonisin B2	Kukuřice pro přímou konzumaci	2000
Ochratoxin A	Hrozny, hroznový mošt, víno	2
Ochratoxin A	Zrna kávy a kávové produkty	5
Ochratoxin A	Obiloviny, mouka a pečivo	3-10
Patulin	Ovoce a ovocné šťávy	50
T-2 toxin	Obiloviny	100

ML = maximální limit

V USA reguluje obsah mykotoxinů v potravinách a krmivech Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). FDA stanoví limity pro různé typy mykotoxinů ve výživě lidí a zvířat a kontroluje jejich dodržování (tabulka 1.4). Tyto limity jsou stanoveny na základě vědeckých studií a posouzení rizik. Jejich cílem je chránit zdraví spotřebitelů (Dohlman, 2003; Barac, 2019).

Tabulka 1.4: Limity pro mykotoxiny stanovené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv

Druh	Účel	ML ($\mu\text{g/kg}$)
Aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1	Pro potravinářský průmysl	0-40
	Pro krmivářský průmysl	0-1000
Ochratoxin A	Pro potravinářský průmysl	0-50
	Pro krmivářský průmysl	0-1000
Deoxynivalenol	Pro potravinářský průmysl	500-2000
	Pro krmivářský průmysl	5-10000
Patulin	Pro potravinářský průmysl	0-50
Fumonisin	Pro potravinářský průmysl	0-1000
	Pro krmivářský průmysl	5000-50000

ML = maximální limit

Zdroj: Dohlman (2003); Barac (2019)

1.2 Aflatoxiny

V roce 1959 se ve Velké Británii objevila na farmách ve východní Anglii zcela výjimečná událost, při které během velmi krátké doby došlo k výrazným úhynům v krutích chovech. Toto onemocnění bylo nazýváno krutí nemocí X (Turkey "X" disease). Tato nemoc se projevovala zejména poškozením jaterního parenchymu a proliferací epitelu žlučových cest (Malír a Ostrý, 2003). Důvodem těchto ztrát byl toxin v krmivu, které obsahovalo arašídovou moučku. Arašídová moučka je významnou surovinou bohatou na bílkoviny. Používá se jako složka krmných směsí a do Evropy je dovážena z tropických a subtropických zemí. V těchto oblastech je zvýšený obsah toxinu důsledkem příznivých podmínek pro růst plísní, které produkují aflatoxin (Allcroft a Canaghan, 1963). O několik let později byla v USA evidována náhlá epidemie jaterního karcinomu pstruhů, která souvisela s kontaminací krmiva aflatoxiny (Bennett a Klich, 2003).

Studie provedené Blountem (1961), Asplinem a Carnaghanem (1961), které se zajímaly o etiologii patologických příznaků, odhalily, že aflatoxiny byly přítomny v několika produktech se silně rozvinutou plísní. Pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS) se prokázalo, že arašídové moučky dovezené z Brazílie intenzivně fluoreskovaly v ultrafialovém světle v důsledku přítomnosti plísně *Aspergillus flavus*. Prudce jedovaté metabolity byly označeny jako aflatoxiny (AF). Důležitým milníkem byl rok

1963, kdy byly spolu s AFB2 a AFG2 detekovány také známé AFB1 a AFG1 (Betina, 1990). Dle Patočky (2004) jsou tak nazývány proto, že při chromatografickém rozboru vznikají na tenké vrstvě skvrny, které fluoreskují modře (**blue**), a skvrny, které se zbarvují zeleně (**green**).

Nákazy se neobjevovaly jen u zvířat. První epidemie aflatoxikózy u lidí byla registrována v roce 1974 ve více než 150 vesnicích v severozápadní Indii (Bennett a Klich, 2003). Při tomto incidentu se u více než několika stovek lidí začaly projevovat příznaky otravy a postižení jater spojené se žloutenkou, jež jsou jedním z hlavních příznaků spojovaných s AF. Na následky tohoto onemocnění zemřelo více než 100 místních obyvatel. Po provedeném testování na hladinu AF se potvrdila přítomnost AFB1 v kukuřici, kterou dotyční konzumovali (Bennett a Klich, 2003).

Malíř a Ostrý (2003) považují AF za běžně se objevující v potravinách a krmivech celosvětově a jsou patrně nejznámějšími a nejlépe vědecky prozkoumanými mykotoxiny.

1.2.1 Charakteristika a vznik AFM1

Aflatoxiny jsou hojně rozšířeny v horkých a vlhkých oblastech. Můžeme je nalézt v celé řadě komodit (Šimůnek, 2004). Mezi nejvýznamnější patří kukuřice, čirok, arašidy, pistáciové oříšky, obiloviny či sušené ovoce. Nalezneme je také v živočišných produktech. Zde se jako ohnisko výskytu uvádí svalovina, játra, mléko či mléčné produkty (Višňovský, 1997).

Uvádí se, že zhruba 1 až 3 % AF z potravin/krmiva jsou vstřebány do organismu a krevním oběhem se dostávají do jater, kde jsou nevratně navázány na bílkoviny a báze DNA. Tím dochází k tvorbě aduktu DNA (DNA adduct; segment DNA napojený na chemickou látku). V důsledku toho dochází k aflatoxikóze. Symptomy hepatotoxického onemocnění se mohou v počátečních fázích nemoci jevit jako anorexie, malátnost a mírná horečka. Avšak pokud aflatoxikóza přejde do potenciálně smrtelné akutní hepatitidy, mohou být příznaky daleko těžší. Jedná se například o zvracení, bolesti břicha a v neposlední řadě i o smrt. Míra úmrtnosti při akutní otravě se i přes poskytnutí potřebné péče pohybuje od 25 do 40 % (Azziz-Baumgartner et al., 2005).

Aflatoxiny řadíme do skupiny látek s malou molekulovou hmotností a rozdílnou chemickou strukturou a vlastnostmi. Jsou rozpustné v roztocích, jakými jsou například methanol, chloroform a benzen. Mimo to působí při velmi nízkých koncentracích

a jsou labilní při působení UV záření. Avšak jejich silnou stránkou je vysoká stabilita při teplotách přesahujících 100 °C. Právě z tohoto důvodu vykazují malý nebo téměř žádný rozklad při pečení, pražení a pasterizaci (Campagnollo et al., 2016).

Po chemické stránce jsou AF spojovány s difuranokumariny. Dosud je známo přibližně 20 AF, z nichž čtyři jsou uváděny jako nejvýznamnější, přirozeně se vyskytující látky, tj. AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2. Jádro prvních dvou sloučenin je založeno na kumarinu kondenzovaném s cyklopentanonem, v případě zbylých dvou sloučenin je místo cyklopentanonu organická sloučenina 5,6-dihydropyran-2-on (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Po požití krmiva kontaminovaného AF dochází k jejich metabolizaci v trávicím traktu a následně v játrech. Produktem je zejména AFM1, který vzniká z AFB1 hydroxylací a u dojnic může být vylučován do mléka (EFSA, 2004; Jaiswal et al., 2018; Marchese et al., 2018).

Výskyt AFM1 závisí na faktorech, jako je genetika zvířat, sezónní výkyvy, proces dojení a podmínky prostředí (EFSA, 2004; Iqbal et al., 2015; Campagnollo et al., 2016). Dle studií EFSA (2004) se uvádí, že pokud skot přijme v krmivu 2% obsah AFB1, bude následně vyloučeno 1 % AFM1. Tyto hodnoty jsou specifické pro skot s nižší mléčnou užitkovostí (tj. mléčná produkce <30 kg/den). Logicky tedy při chovu skotu s vyšší produkcí, bude množství mlékem vylučovaného AFM1 podstatně vyšší. Uvádí se zhruba 6,2 %.

Kontaminaci AFM1 lze zaznamenat v mléce po 12-24 hodinách od okamžiku prvního příjmu AFB1. Výskyt AFM1 v mléce je přechodného charakteru a dosahuje maximálního množství do druhého dne po příjmu kontaminovaného krmiva. Vylučování je obvykle ukončeno do 4 až 5 dnů po konzumaci (Dragacci et al., 1995).

Obrázek 1.2 znázorňuje schéma kontaminace mléka AFM1.



Obrázek 1.2: Schéma procesu kontaminace AFB1 a jeho transformace během cesty k zákazníkovi (Benkerroum, 2016)

1.2.2 Producenti aflatoxinů

Termín “aflatoxin” se odvozuje z kombinováním slov "a" (rod *Aspergillus*), "fla" (druh *flavus*) a výrazu "toxin" (jed) (Nesbitt et al., 1962). Obecně jsou AF považovány za hlavní toxické metabolity vytvářené houbami, zejména některými druhy rodu *Aspergillus*, jako je například *A. flavus*, *A. parasiticus* a vzácný *A. nomius*.

Rod *Aspergillus* je jedním z nejstarších pojmenovaných rodů hub. Pier Antonio Micheli je významnou osobností v historii mykologie a je často spojován s rodem *Aspergillus*, který byl jedním z jeho výzkumných zájmů. Pojmenoval ho kvůli tvarové podobnosti s pomůckou používanou římskokatolickým duchovenstvem ke kropení svěcenou vodou při bohoslužbě, která se nazývala "asperges" (Gibbons a Rokas, 2013). Druhy rodu *Aspergillus* byly identifikovány jako patogeny rostlin, hmyzu a zvířat (Bertuzzi et al., 2014).

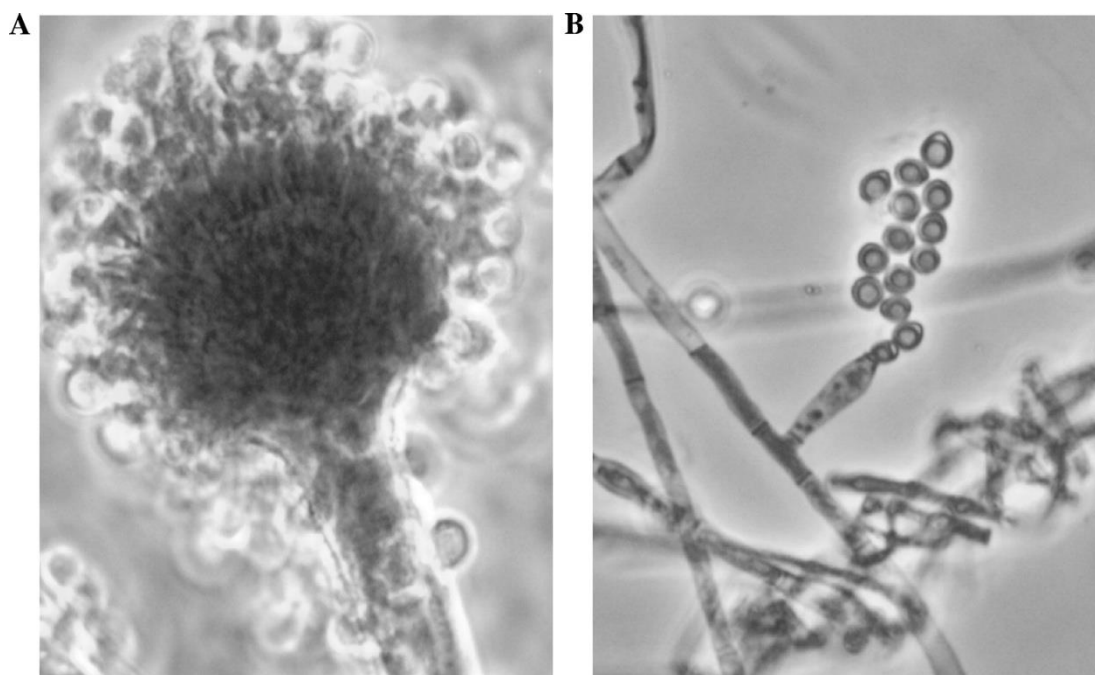
A. flavus

A. flavus je rozšířená vláknitá houba, která prorůstá celou řadou plodin včetně rýže, bavlny, arašídů a kukuřice. Může vyvolávat hnilobu klasů u kukuřice, hnilobu lusků

u podzemnice olejné a hnilobu nebo žlutou skvrnitost u bavlny. Primární způsob nakažení *A. flavus* je důsledkem sklerocia v půdě, které vylučuje své konidie do ovzduší (Guchi, 2015).

Tento patogen je charakterizován jako hemibiotrofní, tedy takový, který využívá dva typy parazitismu, kdy nejprve získává zásobní látky z živých buněk a poté usmrtí hostitelskou buňku, čímž získá potřebné složky z odumřelé tkáně (Guchi, 2015).

Tato plíseň obvykle infikuje kukuřici prostřednictvím široce rozšířených spor (konidií) (obrázek 1.3). Konidie klíčí a kolonizují povrch zrna v širokém rozmezí polních teplot a úzkém rozmezí vlhkosti. Po vyklíčení se houba dostává do neporušených semen tím, že roste na povrchu řapíku a klásku nebo proniká do spojení listů a řapíků. V této fázi jsou buňky velké, tenkostěnné a silně vakuolizované. Houba může prorůstat přes řapík (klas) do klásku skrze souvislé vzduchové prostory v těchto pletivech. Hyfy běžně rostou ve všech embryonálních pletivech, ale zejména v hlízách. Řada studií uvádí, že houba dává přednost kolonizaci embryonálního pletiva před endospermem. Houba je schopna růst při teplotách od 12 °C do 48 °C, nicméně jako optimální teplota pro růst se uvádí 37 °C (Amaike a Keller, 2011).



(A) Sklíčková kultura typického *A. flavus* ukazující konidie vyrůstající z biseriálních fialid (zvětšení $\times 200$).
(B) Sklíčková kultura izolátu *A. flavus* od pacienta vykazující atypickou morfologii (zvětšení $\times 400$).

Obrázek 1.3: *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) pod mikroskopickým rozlišením (Brandt et al., 2009)

A. parasiticus

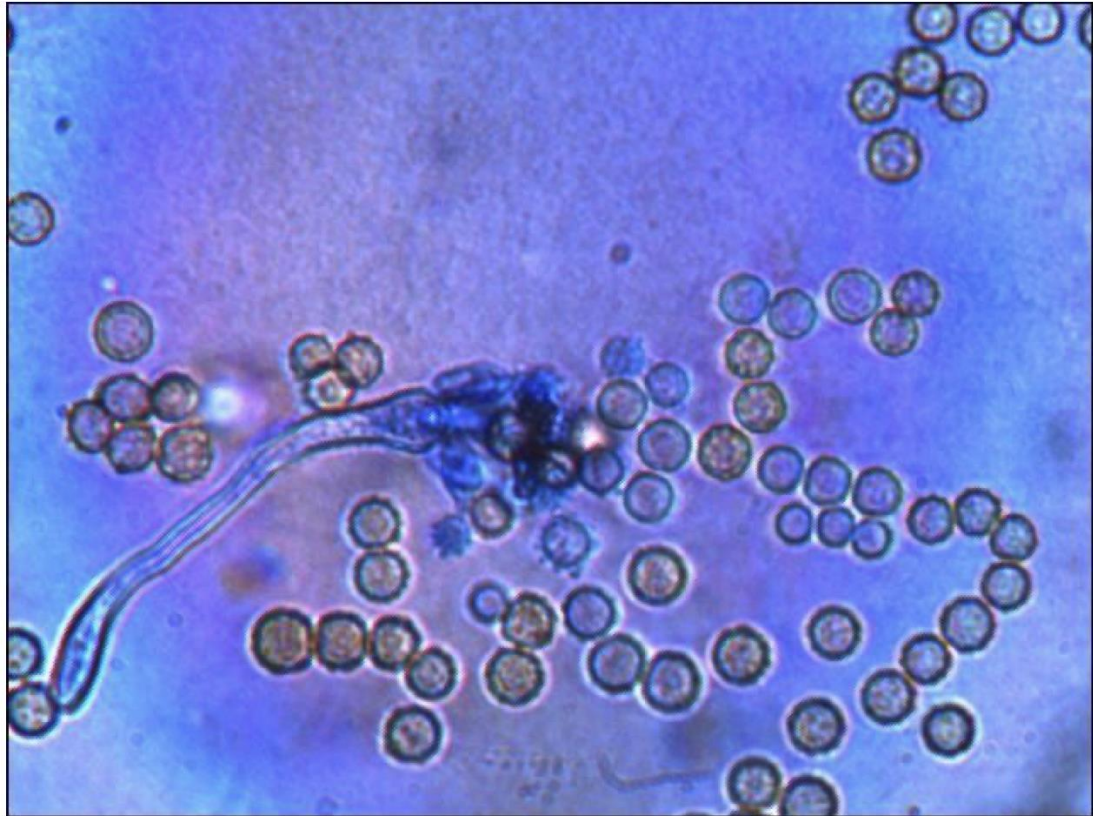
A. parasiticus je fytopatogenní organismus, který aktivně produkuje mykotoxiny, včetně AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2. Tyto mykotoxiny jsou známé svou silnou karcinogenitou, přičemž AFB1 je považován za asi nejsilnější přírodní karcinogen. Tyto houby najdeme běžně v půdě, kde přispívají k rozkladu rostlinného materiálu. Rovněž je najdeme v místech, kde jsou uskladněny obiloviny, na kukuřičných polích nebo plantážích arašídů a bavlníku. Kromě toho dokáže také druhotně kolonizovat lidi a zvířata (Horn et al., 2009).

Konidie *A. parasiticus* mají ve srovnání s *A. flavus* tmavší nádech zelené barvy, výrazně kratší konidiofory a ježkovité konidie (obrázek 1.4) (Jesenská, 1998).

Jedná se o nspecifikovaný typ saprofyta, který žije v symbióze s mrtvými a odumřelými látkami. Plodiny napadá buď na poli, nebo po sklizni při sušení, úpravě či skladování (Diener, 1989). *A. parasiticus* je přenášen vzduchem, ovšem rovněž bylo prokázáno, že se může šířit i vlhkou půdou (Coppock et al., 2018). Tento organismus má schopnost rozmnožovat se pohlavně i nepohlavně, obvykle však dochází k nepohlavnímu rozmnožování (Jesenská, 1998).

Pokud jde o symptomy u zvířat, *A. parasiticus* může způsobit poškození jater a imunosupresi. Dalším viditelným projevem je také snížená spotřeba krmiva. V neposlední řadě je zde velké riziko úmrtí. Krvácení sice není běžně uváděno jako symptomatický projev infekce *A. parasiticus* u zvířat, pokud by však v důsledku infekce došlo k poškození jater, mohlo by to vést k rozvoji krvácivých stavů (Coppock et al., 2018).

U osob, které pracují s obilím kontaminovaným *A. parasiticus* může docházet k podráždění kůže, k poškození plicní tkáně spojené s příznaky jako je dušnost, kašel, horečka, příp. může docházet i ke vzniku vředů, poškození plicní tkáně a podráždění kůže (Coppock et al., 2018).



Obrázek 1.4: *Aspergillus parasiticus* (*A. parasiticus*) (Abd El-Aziz, 2014).

1.3 Výskyt AFM1 v mléce ve světě a v České republice

Výskyt AFM1 v mléce a mléčných výrobcích je variabilní v závislosti na dané geografické oblasti. Nejvyšší hladiny byly zjištěny v některých zemích Afriky, Asie a Jižní Ameriky, kde jsou podmínky pro růst plísní nejvhodnější. Konkrétně u evropského a amerického kontinentu se hladiny AFM1 v průběhu desetiletí významně zvýšily. Tento nárůst lze vysvětlit tím, že se kukuřice řadí mezi nejpoužívanější plodiny v krmivech pro mléčný skot a jak uvádí Santos Pereira et al. (2019), její spotřeba se dále zvyšuje.

Mezi všemi kontinenty lze pozorovat statisticky významné rozdíly výskytu AFM1 v mléce a mléčných produktech. Dle studie Vaz et al. (2021) vykazoval africký kontinent nejvyšší, naopak Evropa nejnižší míru výskytu toxinů. Dá se říct, že tyto výsledky lze přičíst používání moderních metod při zpracování krmiv, zavádění bezpečnostních systémů, dodržování striktních předpisů vztahujících se na mykotoxiny v potravinách a vyspělým analytickým technikám, jež umožňují průběžné sledování přítomnosti sloučenin, jako jsou AF (Mollayusefian et al., 2021).

Na druhé straně v oblasti subsaharské Afriky se kvůli nedostatku krmiv a potravy často podává zvířatům jako krmivo kukuřice ve zcela nevhodném stavu (zkažená a plesnivá). To zvyšuje riziko kontaminace toxigenními plísněmi, což ohrožuje chovy dojeného skotu (Kemboi et al., 2020).

V České republice je v posledních letech věnována značná pozornost výskytu a koncentracím AF v potravinách a krmivech. S cílem minimalizovat riziko expozice těchto toxických látek byla provedena řada studií. V roce 2014 byla provedena studia zaměřená na hodnocení AFM1 v syrovém mléce. Semikvantitativní stanovení AFM1 v kravském, kozím a ovčím mléce provedené přístrojem Aflasensor Quanti rapid test bylo provedeno u 56 vzorků kravského mléka, 15 vzorků kozího mléka a 10 vzorků ovčího mléka. Kontaminace AFM1 se prokázala ve 37 % případů. V žádném z analyzovaných vzorků nepřesáhla hladina stanovené limity (Klimešová et al., 2014).

V roce 2018 bylo v České republice odebráno 288 vzorků mléka a mléčných výrobků a pouze u 3 vzorků byl zjištěn obsah AFM1 nad přípustným množstvím (EFSA, 2020).

Celkově lze tedy konstatovat, že v České republice se v mléce vyskytují převážně nízké hladiny AFM1. Nicméně v zájmu zajištění bezpečnosti potravin a ochrany zdraví spotřebitelů je nutné dbát na kvalitu krmiv a monitorovat přítomnost mykotoxinů. Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) pravidelně kontroluje potraviny a krmiva na přítomnost AF a v případě zjištění překročení limitních hodnot přijímá opatření k ochraně zdraví spotřebitelů. V České republice je stanoven maximální limit pro obsah AFM1 v mléce a mléčných výrobcích, který je 0,05 µg/kg podle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006.

1.4 Výskyt AFM1 v závislosti na ročním období

Mnozí autoři, jako je například Blanc a Karleskind (1981) uvádějí vyšší procento kontaminace AFM1 v chladných ročních obdobích než v teplých, neboť v zimě jsou dojnice krmeny větším množstvím konzervovaných krmiv, zatímco na jaře a v létě je k dispozici větší množství objemného krmiva včetně pastvy, v místech, kde je využívána. To potvrzují i Peng a Chen (2009), kteří rovněž prokázali, že mléko v letních měsících je ve srovnání s mlékem z chladnějšího období méně kontaminováno AFM1.

Existuje mnoho studií zkoumajících výskyt AFM1 v různých zemích a regionech v závislosti na ročním období. Například v rozmezí let 2019-2020 byla provedena studie zaměřená na vyhodnocení kontaminace AFM1 u pasterovaného mléka, mléka s prodlouženou trvanlivostí (ESL) a trvanlivého mléka (UHT) mléka ve střední Číně v zimním a letním období. Celkově bylo odebráno 547 vzorků mléka, z toho 279 v létě a 268 v zimě. Bylo zjištěno, že u vzorků ze zimního období byly častěji prokazovány pozitivní nálezy než u vzorků z letního období (Xiong et al., 2021). S tímto tvrzením se shodují i Akbar et al. (2019), kteří se podobnému výzkumu věnovali ve vybraných oblastech Paňdžábu na území Pákistánu. Údaje byly získány ze značného počtu vzorků (n=960), které byly odebrány během čtyř ročních období (tabulka 1.5). Výsledky ukázaly, že nezávisle na regionu bylo nejvíce kontaminovaných vzorků v zimě (93 %), zatímco v letním období bylo kontaminováno pouhých 12 %.

Tabulka 1.5: Procentuální zastoupení pozitivních (>0,50 µg/l) a negativních vzorků (<0,50 µg/l) mléka na přítomnost AFM1 v závislosti na ročním období a oblasti

Období	n	Limity (µg/l)	Zastoupení vzorků dle oblasti (%)				
			Jižní	Severní	Západní	Východní	Střední
Jaro	160	<0,50	22	22	31	19	25
		0,51–1,00	78	78	69	66	72
		>1,00	0	3	9	16	8
Léto	400	<0,50	75	50	64	54	78
		0,51–1,00	24	48	36	40	20
		>1,00	1	3	0	6	3
Podzim	160	<0,50	25	25	19	0	0
		0,51–1,00	72	75	69	72	88
		>1,00	3	0	13	28	03
Zima	240	<0,50	10	4	4	6	4
		0,51–1,00	63	67	56	54	71
		>1,00	27	29	35	40	25

Zdroj: Akbar et al., 2019

Veškeré dosavadní studie zabývající se touto problematikou shodně potvrzují zvýšené hladiny AFM1 zejména v chladnějším ročním období (Peng a Chen, 2009; Akbar et al., 2019; Xiong et al., 2021).

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnocení přítomnosti aflatoxinu M1 (AFM1) v mléce v závislosti na ročním období.

Bakalářská práce byla zpracována v rámci projektu QK21010326 Možnosti ovlivňování výskytu inhibičních látek v mléce jako účinný nástroj vedoucí k podpoře zdraví zvířat a ke zvyšování kvality a bezpečnosti potravin a projektu GAJU 005/2022/Z OneHealth: genetické, environmentální a technologické faktory ovlivňující živočišnou produkci, kvalitu a bezpečnost potravin a zdraví zvířat a člověka.

3 Materiál a metodika

3.1 Charakteristika a odběr vzorků mléka

Stanovení AFM1 v bazénových vzorcích syrového kravského mléka bylo provedeno v roce 2022. Vzorky byly odebírány pomocí automatického vzorkovacího zařízení cisteren příslušných svozných linek. Celkem bylo odebráno a analyzováno 172 vzorků mléka ve čtyřech obdobích roku ze dvou regionů, šesti okresů a 30 dodavatelů mléka. Z důvodu zachování anonymity nebudou názvy krajů a okresů uvedeny. Množství analyzovaných vzorků v daném roce je uvedeno v následující tabulce 3.1.

Tabulka 3.1: Vzorky vyšetřené na přítomnost a obsah AFM1 během jednotlivých ročních období

Roční období	Počty vyšetřených vzorků	
	n	%
Jaro (duben)	45	26,2
Léto (červenec)	43	25,0
Podzim (září)	43	25,0
Zima (prosinec)	41	23,8

3.2 Analýzy vzorků mléka

3.2.1 Stanovení kvalitativních parametrů mléka

Kvalitativní parametry mléka (chemické složení – obsah tuku, bílkovin, laktózy, tukuprosté sušiny (TPS), celkové sušiny), počet somatických buněk (PSB), bod mrznutí mléka (BMM) byly stanoveny na analyzátoru CombiFoss™ 7. Přístroj kombinuje MilkoScan™ 7 RM (FT-MIR; infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) pro stanovení složek mléka a Fossomatic™ 7 (průtoková cytometrie pro stanovení PSB). Přístroj stanovuje u syrového mléka až 18 parametrů a testuje až 600 vzorků za hodinu. Hodnoty PSB byly logaritmicky transformovány.

3.2.2 Stanovení AFM1

Princip metody

Charm MRL AFM1 je kvantitativní imunoreceptorová analýza pro zjištění obsahu AFM1 v mléce. Vzorek mléka působí zbarvení v testovací zóně testovaného proužku. Intenzita zbarvení je vyhodnocována pomocí Charm EZ čtečky zkalibrované pro daný druh testovacích proužků. Čtečka určí dle intenzity zbarvení testovacích linií, zda je AFM1 ve vzorku přítomen či nikoli. Test je určen pro použití v mlékárnách, v laboratořích, na zemědělských farmách či u kontrolních orgánů.

Postup detekce

Při hodnocení se 300 µl vzorku mléka nanese pomocí automatické pipety na testovací strip. Délka inkubace daného vzorku je 15 minut při teplotě 40 °C. Po uplynutí časového limitu se vyjme strip z inkubátoru a vizuálně se zkontrolují testovací proužky, zdali nedošlo k jejich zbarvení. Pokud by došlo k výraznému ztmavnutí, strip není možno použít k analýze. Následně se test vloží do čtečky Charm EZ Reader, která během okamžiku vygeneruje na displeji daný výsledek. Postup provádění testu je rovněž znázorněn na obrázku 3.1.



Obrázek 3.1: Postup provedení Charm testů na stanovení aflatoxinu M1 (AFM1) (Zdroj: O. K. SERVIS BioPro, 2022)

Výsledky testů se uvádějí jako relativní hodnoty, vyjádřené v jednotkách ppt. Čím vyšší je relativní hodnota, tím vyšší je koncentrace AFM1 ve vzorku potravin. Pokud přístroj Charm MRL AFM1 (Charm) vykáže hodnoty $<0,04 \mu\text{g/l}$, je vzorek posouzen jako negativní, neobsahuje tedy abnormální koncentraci. Hodnoty

>0,04 µg/l jsou považovány za pozitivní, byť maximální reziduální limit (MRL) Evropské unie je 0,05 µg/kg.

3.3 Statistické vyhodnocení dat

Při statistickém zpracování dat byly pro výpočty výsledků využity programy Microsoft Excel a Statistica Cz 12 (Statsoft ČR).

Při vyhodnocení byly jako nezávislé proměnné (faktory) zvoleny:

1) Období

- Jaro
- Léto
- Podzim
- Zima

2) Obsah AFM1:

- AFM1 negativní vzorky (N₁; 0 µg/l)
- AFM1 negativní vzorky (N₂; <0,040 µg/l)
- AFM1 pozitivní vzorky (P; ≥0,040 µg/l)

V rámci každé skupiny byly sledovány:

- přítomnost AFM1 (3 skupiny, N₁, N₂, P)
- obsah tuku (g/100 g)
- obsah bílkovin (g/100 g)
- obsah kaseinu (g/100 g)
- obsah laktózy (g/100 g)
- tukuprostá sušina (g/100 g)
- celková sušina (g/100 g)
- PSB (tis./ml; log)
- bod mrznutí (°C)

Pro vyhodnocení období na přítomnost AFM1 byly využity kontingenční tabulky, statistická významnost byla ověřena χ^2 testem. Pro vyhodnocení období na obsah AFM1 byla využita jednofaktorová analýza rozptylu.

Pro vyhodnocení období a obsahu AFM1 na kvalitativní ukazatele mléka byla využita byla využita jednofaktorová analýza rozptylu s následnými *post-hoc* testy (Fisherův *LSD* test).

4 Výsledky a diskuze

Přítomnost a obsah AFM1 byly sledovány ve čtyřech termínech roku 2022. Výsledky stanovení byly následně vyhodnoceny v závislosti na ročním období a rovněž byla s ohledem na přítomnost AFM1 posouzena kvalita mléka.

Pro stanovení obsahu AFM1 v mléce byla použita metoda Charm MRL AFM1 což je kvantitativní imunoreceptorová analýza, která umožňuje citlivé a přesné stanovení tohoto mykotoxinu v různých typech vzorků. Tyto testy jsou založeny na principu selektivní interakce mezi AFM1 a protilátkou proti němu na membráně. Pokud je AFM1 ve vzorku přítomen, dojde k vytvoření barevné čáry na membráně (Sarimehmetoglu et al., 2004).

4.1 Celkové vyhodnocení monitoringu AFM1 v syrovém kravském mléce

Výsledky testů se uvádějí jako relativní hodnoty, vyjádřené v jednotkách ppt. Čím vyšší je relativní hodnota, tím vyšší je koncentrace AFM1 ve vzorku potravin. Pokud přístroj Charm MRL AFM1 (Charm) vykáže hodnoty $<0,04 \mu\text{g/l}$, je vzorek posouzen jako negativní, neboť neobsahuje abnormální koncentraci. Hodnoty $\geq 0,04 \mu\text{g/l}$ jsou považovány za pozitivní, byť maximální reziduální limit (MRL) Evropské unie je $0,05 \mu\text{g/kg}$.

Při provádění této studie byl stanoven AFM1 u 172 vzorků bazénových vzorků mléka. Výsledky analýz, tj. výsledky přítomnosti a obsahu AFM1 jsou uvedeny v Tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Vyhodnocení přítomnosti a obsahu aflatoxinu M1 (AFM1) pomocí přístroje Charm MRL za rok 2022

Skupina	Limit ($\mu\text{g/l}$)	Výskyt		Obsah ($\mu\text{g/l}$)			
		n	%	\bar{x}	s_x	min.	max.
N ₁ - negativní ₁	0	149	86,6	0	0	0	0
N ₂ - negativní ₂	$<0,04$	16	9,3	0,0183	0,0037	0,015	0,026
P - pozitivní	$\geq 0,04$	7	4,1	0,0499	0,0081	0,041	0,064
Celkem	-	-	-	0,0037	0,0111	0	0,064

Pozitivní nález AFM1 (skupina P; $\geq 0,04 \mu\text{g/l}$) byl zjištěn u sedmi vzorků, tj. 4,1 % z celkového počtu analyzovaných vzorků při průměrném obsahu $0,0499 \mu\text{g/l}$. Hodnoty indikující pozitivitu vzorků se pohybovaly v rozmezí od $0,041 \mu\text{g/l}$ do $0,064 \mu\text{g/l}$.

Počet vzorků, u kterých byla zjištěna přítomnost AFM1 (skupina N₂), která nepřekročila hodnoty $0,04 \mu\text{g/l}$, byl 16, tj. 9,3 %. U této skupiny vzorků byl naměřen průměrný obsah $0,0183 \mu\text{g/l}$ s rozpětím $0,015$ až $0,026 \mu\text{g/l}$. Pouze u dvou vzorků byl zjištěn obsah AFM1 nad limitem EU (blíže kapitola 4.2).

Pro AFM1 v potravinách, které mohou obsahovat mléko nebo mléčné výrobky, jako jsou sýry, jogurty, máslo atd. je maximální přípustné množství AFM1 v potravinách určených k lidské spotřebě dle nařízení Komise (EU) č. 1881/2006 stanoveno na $0,05 \mu\text{g/kg}$. Důležité je podotknout, že pro kojeneckou výživu jsou limity striktnější. U potravin určených pro kojence a malé děti do 12 měsíců věku jsou limity stanoveny na $0,10 \mu\text{g/kg}$ (Iqbal et al., 2015).

Kontrolu AFM1 v mléce provádí v České republice Státní veterinární správa (SVS) a Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). SVS provádí pravidelné kontroly, aby zaručila, že jsou mléčné výrobky na trhu bezpečné a splňují přísné požadavky na kvalitu. Je-li prokázána nadlimitní přítomnost AFM1, SVS podniká příslušná opatření, jako je např. upozornění výrobců, další kontrolní odběry a laboratorní analýzy. Pokud je zjištěna opakovaná přítomnost AFM1 ve výrobku od téhož dodavatele, mohou být přijata další opatření, jako je zákaz prodeje, stažení výrobků z trhu nebo dokonce pokuta. SZPI kontroluje nejen výrobky na trhu, ale také výrobní podniky a distribuční sítě. Přítomnost AFM1 se provádí odběry vzorků mléka přímo od zemědělců, mlékáren, případně dalších subjektů podílejících se na výrobě mléčného produktu (Klorová, 2009).

V letech 2019 a 2020 provedla EFSA komplexní studii o výskytu AFM1 v kravském mléce v EU. Studie analyzovala údaje z více než 139 000 vzorků mléka z 28 členských států EU, Norska, Islandu, Švýcarska a Spojeného království (EFSA, 2020). Bylo zjištěno, že celková průměrná hodnota AFM1 v kravském mléce v roce 2021 byla $0,014 \mu\text{g/l}$.

Dle nejnovějších výsledků SVS týkajících se kontaminace AFM1 za rok 2022 dosahovala průměrná hodnota AFM1 v syrovém kravském mléce $0,025 \mu\text{g/l}$. Ve srovnání s výsledky šetření SVS z roku 2021 se průměrný obsah AFM1 v syrovém kravském mléce v České republice výrazně nezměnil ($0,026 \mu\text{g/l}$) (SVS, 2022).

Jako pozitivní se jeví zjištění, že uváděná průměrná hodnota AFM1 v kravském mléce v EU v roce 2021 je relativně nízká a srovnatelná s předchozími roky, což naznačuje, že současná opatření k minimalizaci výskytu AFM1 v mléce jsou účinná (Muaz et al., 2022). I přes skutečnost, že na evropském a amerických kontinentech se hladiny AFM1 v průběhu desetiletí významně zvýšily, zůstává Evropa ve srovnání s ostatními kontinenty stále mezi ty s nejnižšími hladinami. Naproti tomu v Africe je koncentrace AFM1 nejvyšší. Příčinou může být, že na africkém kontinentu neexistuje žádná oficiální kontrola (Turna a Wu, 2021).

V souvislosti s přítomností AFM1 byla publikována řada prací věnujících se odbourávání AFM1 v mléce. Uhlíková (2022) uvádí různé metody, které snižují obsah AFM1 v mléce. Jedná se např. o použití chemických látek, jako je peroxid vodíku a peroxysíran sodný k degradaci AFM1 z mléka a mléčných výrobků.

Obdobně efektivním způsobem, jak snížit obsah AFM1 v mléce, je využití mikroorganismů, jako jsou bakterie *Pediococcus pentosaceus* a *Kluyveromyces marxianus*. Výzkumy ukázaly, že oba uvedené druhy dokázaly během inkubace významně snížit hladinu AFM1 v mléce (Nguyen et al., 2020).

Zajímavá je v této souvislosti nová studie zaměřená na detoxikaci AFM1 v mléce pomocí kaolinu a Ca-bentonitu. Jedná se o přírodní materiály, které mají schopnost absorbovat a toxiny a jiné nežádoucí látky v trávicím traktu. V případě AFM1 naváží jílové minerály toxin a vyloučí ho z těla zvířete. Při přidávání těchto látek do krmiva se AFM1 váže na jejich povrch a nevstřebává se do těla zvířete. To znamená, že množství AFM1 v mléce zvířat se snižuje. Do budoucna by bylo vhodné provést další studie o použití kaolinu a Ca-bentonitu v praxi, aby se zjistilo, zda by se mohlo jednat o účinný způsob minimalizace kontaminace AFM1 v praxi (Moussa et al., 2020).

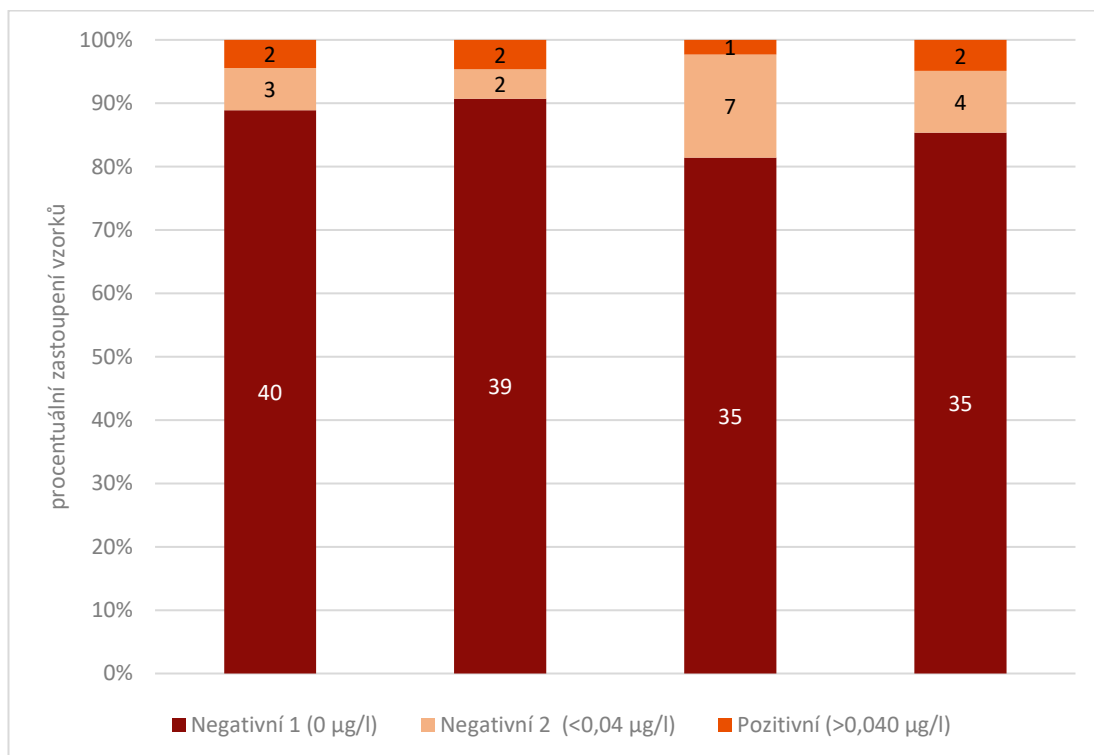
4.2 Vyhodnocení monitoringu AFM1 v závislosti na ročním období

V průběhu roku mohou na výskyt plísní v krmivech působit faktory, jako jsou teplota, vlhkost či dešťové srážky (Köppen et al., 2010).

Tabulka 4.2: Vliv ročního období na přítomnost a obsah aflatoxinu M1 (AFM1) v mléce

Období	n	Počty vzorků (%)			Obsah (µg/l)			
		N ₁	N ₂	P	\bar{x}	s _x	min.	max.
Jaro	45	88,9	6,7	4,4	0,0031	0,0100	0	0,048
Léto	43	90,7	4,7	4,7	0,0035	0,0120	0	0,064
Podzim	43	81,4	16,3	2,3	0,0040	0,0090	0	0,041
Zima	41	85,4	9,8	4,9	0,0044	0,0130	0	0,058
p	172	0,6381			0,9453			

n – celkový počet vzorků; N₁ – negativní₁, AFM1 0 µg/l; N₂ – negativní₂, AFM1 <0,04 µg/l; P – pozitivní, ≥0,040 µg/l



Graf 4.1: Podíly (četnostní a procentuální) pozitivních a negativních vzorků v závislosti na ročním období

Tabulka 4.2 a graf 4.1 ukazují zvýšený výskyt AFM1 zejména v podzimních měsících. Z výsledků uvedených v tabulce 4.2 vyplývá, že v září byl AFM1 detekován u 18,6 % vzorků (skupina N₂ a P), zatímco v ostatních obdobích byla přítomnost AFM1 nižší. V jarním období 11,1 %, v letním 9,4 % a v zimním 14,7 %. Z toho je patrné, že dochází k výrazným výkyvům, ačkoliv statisticky významné rozdíly v přítomnosti AFM1 zaznamenány nebyly ($p = 0,6381$), stejně jako nebyly statisticky významné rozdíly u průměrného obsahu AFM1 ($p = 0,9453$). Nejvyšší průměrný obsah byl však zjištěn v zimním období (0,0044 µg/l) a nejnižší na jaře (0,0031 µg/l). Hodnoty přesahující MRL byly zaznamenány pouze dvě, v letním (0,064 µg/l) a zimním období (0,058 µg/l).

Jak bylo zmíněno již v teoretické části, o výskytu AFM1 v závislosti na ročním období existují četné studie. Studie provedená v roce 2018 sledovala výskyt AFM1 v syrovém mléce v Pákistánu během celého roku. Bylo zjištěno, že nižší míra výskytu AFM1 byla zaznamenána v zimě, vyšší naopak v létě a na podzim (Asghar a Salman, 2018).

Možný častější výskyt AFM1 během podzimu je úzce spojován především s výživou. V porovnání s letním obdobím se v těchto měsících používají konzervovaná krmiva, která mohou mít vyšší obsah toxických plísní (Ismail et al., 2016).

4.3 Vliv přítomnosti AFM1 na kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka

Mléko je jednoznačně definováno jako plnohodnotná potravinu, protože obsahuje energetické živiny včetně tuku, bílkovin, laktózy, esenciálních mastných kyselin, vitamínů a minerálních látek ve vyváženém poměru (Licata et al., 2004).

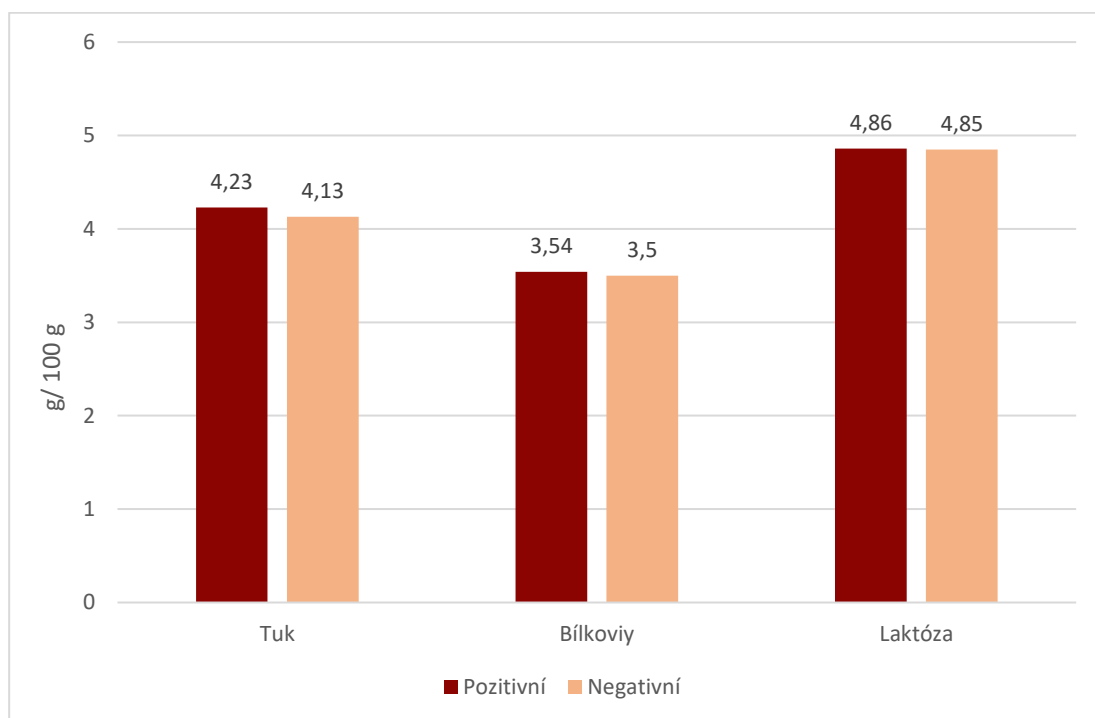
V této souvislosti je často zkoumán vliv AFM1 na nutriční složení mléka a mléčných výrobků. Ačkoli některé studie naznačují, že AFM1 nemá významný vliv na kvalitu mléka, je nutno vnímat tyto výsledky s rozvahou. Například studie Křížové et al. (2016) nezjistila žádné významné změny v obsahu tuku a laktózy v mléce v souvislosti s přítomností AFM1. Někteří odborníci naopak prokázali, že při zkrmování kontaminovaných krmiv dochází ke snížení produkce mléka a změně jeho nutričního složení (Roila et al., 2021).

Zvýšené hladiny AFM1 v mléce mohou negativně ovlivnit smyslové vlastnosti mléka, jako je chuť, vůně a barva. Uvádí se také, že AFM1 může snižovat obsah tuku, bílkovin a vápníku (Iqbal et al., 2015).

V této bakalářské práci se negativní vliv na kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka nepotvrdil, ačkoliv u téměř všech ukazatelů byly hodnoty pro negativní vzorky (skupina N₁ i skupina N₂) nižší než pro vzorky pozitivní (tabulka 4.3).

Tuto skutečnost dokumentuje i graf 4.2, kde jsou uvedeny obsahy tuku, bílkovin a laktózy v průměru za obě skupiny vzorků, kde byla zjištěna přítomnost AFM1 (tj. skupiny P a N₂) v porovnání se skupinou vzorků, kde přítomnost AFM1 detekována nebyla (skupina N₁).

Celková průměrná sušina zjištěná u skupiny P a N₂ činila 13,39 %, zatímco u skupiny N₁ 13,22 % (data v tabulce neuvedena).



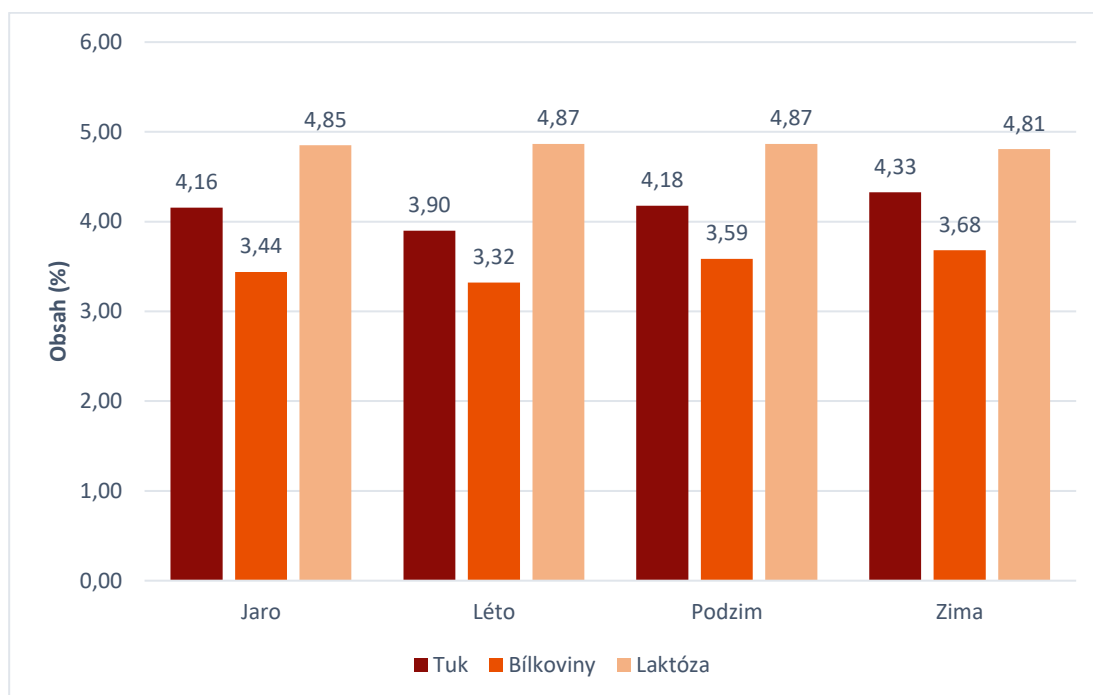
Graf 4.2: Průměrný obsah tuku, bílkovin a laktózy u pozitivních (skupina P + N₂) a negativních (skupina N₁) vzorků mléka

Tabulka 4.3: Vliv aflatoxinu M1 (AFM1) na základní kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka

Ukazatel	Vzorky												p
	N ₁ - negativní (0 µg/l)				N ₂ - negativní (<0,04 µg/l)				P - pozitivní (≥0,040 µg/l)				
	\bar{x}	s _x	min.	max.	\bar{x}	s _x	min.	max.	\bar{x}	s _x	min.	max.	
Tuk (g/100 g)	4,12	0,36	3,36	5,88	4,28	0,36	3,84	5,14	4,23	0,58	3,67	5,05	0,2151
Bílkoviny (g/100 g)	3,49	0,23	2,71	4,27	3,60	0,19	3,26	3,88	3,57	0,23	3,34	3,96	0,1529
Kasein (g/100 g)	2,74	0,18	2,12	3,36	2,81	0,13	2,57	3,03	2,81	0,15	2,64	3,06	0,1581
Laktóza (g/100 g)	4,85	0,11	4,15	5,00	4,82	0,99	4,54	4,97	4,88	0,53	4,80	4,97	0,3906
TPS (g/100 g)	9,05	0,24	8,19	9,58	9,11	0,18	8,74	9,36	9,19	0,20	8,93	9,46	0,2446
Celková sušina (g/100 g)	13,21	0,48	11,79	15,39	13,42	0,39	12,93	14,50	13,43	0,66	12,77	14,49	0,1337
PSB (tis./ml)	209	93	60	581	188	99	81	466	229	86	131	335	
PSB (log)	2,721	0,004	2,708	2,736	2,721	0,004	2,714	2,728	2,722	0,005	2,713	2,731	0,2943
BMM (°C × -1 000)	525	5	510	545	526	5	518	535	527	6	517	538	0,2917

TPS = tukuprostá sušina, PSB = počet somatických buněk, BMM = bod mrznutí

Bez ohledu na přítomnost AFM1 v mléce je nutné uvést, že kvalita mléka se výrazně v průběhu roku mění (Tomašević et al., 2015). Tato skutečnost byla potvrzena i v této bakalářské práci, jak naznačují výsledky uvedené v tabulce 4.4 a grafu 4.3.



Graf 4.3: Obsah tuku, bílkovin a laktózy v mléce v závislosti na ročním období

Pokud jde o obsah laktózy, ten byl v letních měsících nepatrně vyšší. Nicméně hodnoty uvedené v grafu lze považovat za relativně stabilní. V průměru se liší jen o několik desetin procenta. Celkově by množství laktózy v mléce mělo být stabilní a nemělo by být výrazně ovlivněno žádnými vnějšími faktory (Adam et al., 2005).

Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány v obsahu tuku a bílkovin, které byly v letním období statisticky významně nižší v porovnání s jarním, letním a zimním obdobím. Tato zjištění jsou v souladu s literárními prameny (Bernabucci et al., 2015; Kabil et al., 2015).

Statisticky významné rozdíly v závislosti na ročním období byly zjištěny rovněž v hodnotách PSB (log). Zvýšené hodnoty PSB uváděné řadou autorů pro letní období (Bhatt et al., 2013; Bogdanovičová et al., 2016) se však v této práci nepotvrdily.

Tabulka 4.4: Základní kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka v jednotlivých ročních obdobích

Ukazatel	Sledované období								p
	Jaro		Léto		Podzim		Zima		
	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	
Tuk (g/100 g)	4,16 ^b	0,31	3,90 ^a	0,29	4,18 ^b	0,33	4,33 ^c	0,43	<0,001
Bílkoviny (g/100 g)	3,44 ^b	0,19	3,32 ^a	0,15	3,59 ^c	0,19	3,68 ^d	0,22	<0,001
Kasein (g/100 g)	2,74 ^b	0,16	2,62 ^a	0,12	2,81 ^c	0,14	2,83 ^c	0,19	0,7768
Laktóza (g/100 g)	4,85 ^{ab}	0,11	4,87 ^b	0,08	4,87 ^b	0,10	4,81 ^a	0,14	0,0478
TPS (g/100 g)	9,031 ^b	0,223	8,915 ^a	0,168	9,138 ^b	0,184	9,181 ^c	0,271	<0,001
Celková sušina (g/100 g)	13,26 ^b	0,40	12,84 ^a	0,34	13,31 ^c	0,37	13,55 ^c	0,52	<0,001
PSB (tis./ml)	197	98	208	95	215	94	215	87	-
PSB (log)	2,719 ^a	0,004	2,718 ^{ab}	0,004	2,722 ^c	0,003	2,720 ^{bc}	0,004	0,0008
BMM (°C × -1 000)	524 ^{ab}	5	523 ^a	4	527 ^c	4	525 ^{bc}	5	0,0008

^{a,b,c,d} průměry s odlišnými horními indexy v řádcích se statisticky významně liší na hladině $p < 0,05$;

TPS = tukuprostá sušina; PSB = počet somatických buněk; BMM = bod mrznutí.

Závěr

Bakalářská práce se zaměřila na výskyt a kvantifikaci aflatoxinu M1 (AFM1) v syrovém kravském mléce během jednotlivých ročních období.

Během roku 2022 bylo testováno celkem 172 vzorků rovnoměrně odebraných ve čtyřech ročních obdobích. Byly zaznamenány značné rozdíly výskytu AFM1 v závislosti na období, kdy byla pozorována vyšší míra zastoupení v podzimních měsících. Přítomnost AFM1 byla v tomto období detekována u 18,6 % vzorků, zatímco v letním období pouze u 9,6 %.

Obsah AFM1 v nadlimitních hodnotách, které stanovuje Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 (0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$) byla zjištěna pouze ve dvou případech, a to v letním (0,064 $\mu\text{g}/\text{l}$) a zimním období (0,058 $\mu\text{g}/\text{l}$).

V práci byl dále sledován vliv obsahu AFM1 na kvalitu mléka. Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že přítomnost AFM1 neměla statisticky významný vliv na základní kvalitativní ukazatele.

I když výsledky této práce neprokázaly v souvislosti s přítomností AFM1 znepokojivé hodnoty, je třeba přítomnost této kontaminující látky v mléce stále sledovat, neboť představuje pro spotřebitele zdravotní riziko.

Vzhledem k omezenému časovému rámci byl výzkum prováděn pouze v průběhu jednoho roku, což může celkově ovlivnit zhodnocení dané situace. Pro lepší pochopení této problematiky by bylo vhodné provést rozsáhlejší studii, která by se týkala většího počtu sledovaných oblastí a podrobila by analýze větší množství vzorků. To by poskytlo komplexnější informace a pomohlo by formulovat i další kroky k možné minimalizaci rizik.

Seznam použité literatury

1. Abd El-Aziz, A. R. (2014). Eco-friendly biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus parasiticus*. *Dig J Nanomater Biostruct*, 9: 1485-1492.
2. Adam, A. C. et al. (2005). Lactose: the milk sugar from a biotechnological perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 553-557.
3. Akbar, N. et al. (2019). Occurrence and seasonal variations of aflatoxin M1 in milk from Punjab, Pakistan. *Toxins*, 11(10):574.
4. Allcroft, R. a Carnaghan, R. B. A. (1963). Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Veterinary Record*, 75: 259-263.
5. Amaike, S. a Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 107-133.
6. Asghar, N. a Salman, A. (2018). Impact of agriculture credit on food production and food security in Pakistan. *Pakistan Journal of Commerce and Social Sciences (PJCSS)*, 12(3):851-864.
7. Asplin, F. D., a Carnaghan, R. B. A. (1961). The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Veterinary Record*, 73: 1215-1219.
8. Azziz-Baumgartner, E. et al. (2005). Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*, 113(12):1779-1783.
9. Barac, A. (2019). Mycotoxins and human disease. *Clinically Relevant Mycoses: A Practical Approach*. Springer, Cham. ISBN 978-3-319-92299-7.
10. Battilani, P. et al. (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *European Food Safety Authority Supporting Publications*, 9(1):223.

-
11. Benkerroum, N. (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 62: 63-75.
 12. Bennett, J. W. a Klich, M. (2003). Clinical microbiology reviews. *Mycotoxins* 16(3): 497-516.
 13. Bernabucci, U. et al. (2015). Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. *Journal of dairy science*, 98(3): 1815-1827.
 14. Bertuzzi, M. et al. (2014). The pH responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *Public Library of Science Pathogens*, 10(10): e1004413.
 15. Betina, V. (1990). *Mykotoxíny: chémia – biológia – ekológia*. Alfa, Bratislava. ISBN 80-05-00631-4.
 16. Bhat, R. et al. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1):57-81.
 17. Bhatt, P. K. et al. (2013). Productivity, quality, nutrient content and soil fertility of summer greengram (*Vigna radiata*) as influenced by different levels of vermicompost and phosphorus with and without PSB. *International Journal of Agricultural Sciences*, 9(2): 659-662.
 18. Blanc, M. a Karleskind, A. (1981). Données sur la contamination par l'aflatoxine M1 du lait et des produits laitiers en France. Résultats de 1046 analyses effectuées durant la période allant du 1er septembre 1980 au 30 juin 1981. *Le Lait*, 61(608):481-493.
 19. Blount, W. P. (1961). Turkey" X" disease. *Journal of British Turkey Federation*, 9: 52-77.
 20. Bogdanovièová, K. et al. (2016). Microbiological Quality of Raw Milk in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(3).

-
21. Brandt, M. E. et al. (2009). Atypical *Aspergillus flavus* isolates associated with chronic azole therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10): 3372-3375.
 22. Campagnollo, F. B. et al. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, 68: 310-329.
 23. Coppock, R. W. et al. (2018). Aflatoxins. In: Gupta., R. C. (Eds.). *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Třetí vydání. Academic Press, 983-994. ISBN 978-0128114100.
 24. Diener, U. L. (1989). Preharvest aflatoxin contamination of peanuts, corn and cottonseed: A review. *Biodeterioration Research 2: General Biodeterioration, Degradation, Mycotoxins, Biotoxins, and Wood Decay*, 217-244.
 25. Dohlmán, E. (2003). Mycotoxin hazards and regulations. *International Trade and Food Safety*, 97.
 26. Dragacci, S. et al. (1995). Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoxin M1 in cheeses. *Food Additives & Contaminants*, 12(1):59-65.
 27. Duraković, L. et al. (2010). Aflatoxin Accumulation During the Growth of Mould *Aspergillus flavus* ATCC 26949 on Corn in Pure and Mixed Culture as Related to Various Temperature and Moisture Content. *Hrvatski Časopis za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam*, 5(1-2):10-17.
 28. Eskola, M. et al. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25 %. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16):2773-2789.
 29. European Food Safety Authority (EFSA). (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *European Food Safety Authority Journal*, 2(3):39.

-
30. Gibbons, J. G., Rokas, A. (2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiology*, 21(1):14-22.
 31. Guchi, E. (2015). Aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) caused by *Aspergillus* species in Ethiopia. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 3(1):11-19.
 32. Horn, B. W. et al. (2009). The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 101(2):275-280.
 33. Iqbal, S. Z. et al. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1): 110-119.
 34. Ismail, A. et al. (2016). Seasonal prevalence level of aflatoxin M1 and its estimated daily intake in Pakistan. *Food Control*, 60: 461-465.
 35. Jesenská, Z. (1998). Mykromycéty – povodci mykóz, mykotoxikóz a alergií (II). *Remedia: Klinická Mikrobiologie*. 2(4):144-148.
 36. Kabil, O. I. et al. (2015). Effect of seasonal variation on chemical composition of cow's milk. *Benha Veterinary Medical Journal*, 28(1): 150-154.
 37. Kemboi, D. C. et al. (2020). A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in Sub-Saharan Africa. *Toxins*, 12(4):222.
 38. Klorová, J. (2009). *Současná úroveň hodnocení jakosti potravinářských produktů v České republice*. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Katedra kvality produktů.
 39. Köppen, R. et al. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1595-1612.

-
40. Licata, P. et al. (2004). Levels of “toxic” and “essential” metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International*, 30(1):1-6.
 41. Malír, F., a Ostrý, V. (2003). *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno. ISBN 80-7013-395-3.
 42. Matissek, R. (2020). Mykotoxine. In *Lebensmittelsicherheit*. Springer Spektrum, Berlin. ISBN 978-3-662-61898-1.
 43. Miraglia, M. et al. (2004). Mycotoxins. In L. M. L. Nollet, *Handbook of food analysis*. 2. vydání. CRC Press. Marcel Dekker, Boca Raton. ISBN 0-8247-5037-3.
 44. Mollayusefian, I. et al. (2021). The concentration of aflatoxin M1 in raw and pasteurized milk: A worldwide systematic review and meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 115: 22-30.
 45. Moussa, A. I. et al. (2020). Efficacy of Kaolin and Bentonite Clay to Reduce Aflatoxin M1 Content in Contaminated Milk and Effects on Milk Quality. *Pakistan Veterinary Journal*, 40(2).
 46. Muaz, K. et al. (2022). Aflatoxin M1 in milk and dairy products: Global occurrence and potential decontamination strategies. *Toxin reviews*, 41(2): 588-605.
 47. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o stanovení maximálních limitů reziduí pesticidů v nezpracovaných potravinách a krmivech živočišného původu.
 48. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1126/2007 ZE DNE 28. září 2007, kterým se mění nařízení ES č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a vy výrobcích z kukuřice. Úřední věstník Evropské unie L 255/14.

-
49. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Úřední věstník Evropské unie L 364/5.
 50. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 105/2010 ze dne 5. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o ochratoxin A. Úřední věstník Evropské unie L 35/7.
 51. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 165/2010 ze dne 26. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č.1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o aflatoxiny. Úřední věstník Evropské unie L 50/8.
 52. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 594/2012 ze dne 5. července 2012, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity kontaminujících látek ochratoxinu A, PCB bez dioxinového efektu a melaminu v potravinách. Úřední věstník Evropské unie L 176/43.
 53. Nesbitt, B. F. et al. (1962). *Aspergillus flavus* and turkey X disease: toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 195: 1062-1063.
 54. Nguyen, T. et al. (2020). Control of aflatoxin M1 in milk by novel methods: A review. *Food Chemistry*, 311:125984.
 55. Paterson, R. R. M. a Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43(7):1902-1914.
 56. Paterson, R.R.M. a Lima, N. (2009). The Weaponisation of Mycotoxins. In: Rai, M., Varma, A. (eds) *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-642-00724-8.
 57. Patočka, J. (2004). *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing, Praha. ISBN 80-247-0608-3.

-
58. Peng, K. Y. a Chen, C. Y. (2009). Prevalence of aflatoxin M1 in milk and its potential liver cancer risk in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 72(5):1025-1029.
 59. Roila, R. et al. (2021). A study of the occurrence of aflatoxin M1 in milk supply chain over a seven-year period (2014–2020): human exposure assessment and risk characterization in the population of central Italy. *Foods*, 10(7):1529.
 60. Santos Pereira, C. et al. (2019). Prevalent mycotoxins in animal feed: Occurrence and analytical methods. *Toxins*, 11(5):290.
 61. Sarimehmetoglu, B. et al. (2004). Detection of aflatoxin M1 in cheese samples by ELISA. *Food Control*, 15(1): 45-49.
 62. Sirbu, V. I. et al. (2020). Mycotoxins in feed: An overview on biological effects and decontamination methods. *Agrolife Scientific Journal*, 9(2): 285-296.
 63. SVS ČR: Informační bulletin č.1/2022 Kontaminace potravinového řetězce cizorodými látkami: Situace v roce 2022.
 64. SVS ČR: Informační bulletin č.1/2023 Kontaminace potravinového řetězce cizorodými látkami: Situace v roce 2023.
 65. Tomašević, I. et al. (2015). Two-year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food Control*, 56: 64-70.
 66. Turna, N. S. a Wu, F. (2021). Aflatoxin M1 in milk: A global occurrence, intake, & exposure assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 110: 183-192.
 67. Uhlíková, T. (2022). *Přítomnost mykotoxinu – aflatoxinu M1 v mléce*. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů.

-
68. Vaz, A. et al. (2021). Detection methods for aflatoxin M1 in dairy products. *Microorganisms*, 8(2):246.
 69. Velíšek, J. a Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin II*. OSSIS. Václav Šedivý, Tábor. ISBN. 978-80-86659-16-9.
 70. Višňovský, P. (1997). *Framakologie látek znečišťujících životní prostředí*. Karolinum, Praha. ISBN 80-7184-407-1.
 71. Xiong, J. et al. (2021). Aflatoxin M1 in pasteurized, ESL and UHT milk products from central China during summer and winter seasons: prevalence and risk assessment of exposure in different age groups. *Food Control*, 125: 107908.

Seznam elektronických zdrojů

1. European Food Safety Authority (EFSA). (2020): *Trusted science for safe food: protecting consumers' health with independent scientific advice on the food chain*, [online] [14. 3. 2023]. Dostupné z: <https://data.europa.eu/doi/10.2805/419620>.
2. Klimešová, M. et al. (2014). *Stanovení aflatoxinu M1 v syrovém mléce testem Aflasensor Quanti*. [online] Technologická Agentura České republiky Strafos [25.2.2023]. Dostupné z: <https://starfos.tacr.cz/cs/re-sult/RIV%2F26722861%3A%2F14%3A%23KL09>.
3. Pohanka, M. (2008). Aflatoxiny. [online]. Toxikology.cz [12.3.2023]. Dostupné z <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=177>.
4. Šimůnek, J. (2004). Plísňe a mykotoxiny. [online]. [12.3.2023]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf.
5. Tvrzová, L. et al. (2006). Miniatlás mikroorganismů. [online] Elportál [cit. 11. 02. 2023]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/es-tud/prif/ps06/mikroorg/web/index.html>.

Seznam obrázků

Obrázek 1.1: Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách a krmivech (dle Patersona a Limy, 2010)	10
Obrázek 1.2: Schéma procesu kontaminace AFB1 a jeho transformace během cesty k zákazníkovi (Benkerroum, 2016).....	16
Obrázek 1.3: <i>Aspergillus flavus</i> (<i>A. flavus</i>) pod mikroskopickým rozlišením (Brandt et al., 2009)	17
Obrázek 1.4: <i>Aspergillus parasiticus</i> (<i>A. parasiticus</i>) (Abd El-Aziz, 2014).	19
Obrázek 3.1: Postup provedení Charm testů na stanovení aflatoxinu M1 (AFM1) (Zdroj: O. K. SERVIS BioPro, 2022)	25

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Příklady nejvýznamnějších mykotoxinů.....	9
Tabulka 1.2: Přehled nejvýznamnějších mykotoxinů a jejich biologické účinky.....	10
Tabulka 1.3: Limity pro mykotoxiny stanovené dle Evropské unie	12
Tabulka 1.4: Limity pro mykotoxiny stanovené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv	13
Tabulka 1.5: Procentuální zastoupení pozitivních (>0,50 µg/l) a negativních vzorků (<0,50 µg/l) mléka na přítomnost AFM1 v závislosti na ročním období a oblasti	21
Tabulka 3.1: Vzorky vyšetřené na přítomnost a obsah AFM1 během jednotlivých ročních období.....	24
Tabulka 4.1: Vyhodnocení přítomnosti a obsahu aflatoxinu M1 (AFM1) pomocí přístroje Charm MRL za rok 2022	27
Tabulka 4.2: Vliv ročního období na přítomnost a obsah aflatoxinu M1 (AFM1) v mléce	30
Tabulka 4.3: Vliv aflatoxinu M1 (AFM1) na základní kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka.....	33
Tabulka 4.4: Základní kvalitativní ukazatele syrového kravského mléka v jednotlivých ročních obdobích.....	35

Seznam grafů

Graf 4.1: Podíly (četnostní a procentuální) pozitivních a negativních vzorků v závislosti na ročním období	30
Graf 4.2: Průměrný obsah tuku, bílkovin a laktózy u pozitivních (skupina P + N ₂) a negativních (skupina N ₁) vzorků mléka	32
Graf 4.3: Obsah tuku, bílkovin a laktózy v mléce v závislosti na ročním období	34

Seznam použitých zkratek

AF – Aflatoxin

AFB1 – Aflatoxin B1

AFB2 – Aflatoxin B2

AFG1 – Aflatoxin G1

AFG2 – Aflatoxin G2

AFM1 – Aflatoxin M1

AFM2 – Aflatoxin M2

BMM – Bod mrznutí

CIT – Citrinin

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

DON – Deoxynivalenol

EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)

ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

EU – Evropská unie

FB – Fumonisin

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)

ML – Maximální limit

MRL – Maximální reziduální limit

MZe – Ministerstvo zemědělství

OTA – Ochratoxin A

PAT – Patulin

ppb – Parts per billion

ppt – Parts per trillion

PSB – Počet somatických buněk

SVS – Státní veterinární správa

SZPI – Státní zemědělská a potravinářská inspekce

T-2–T-2 toxin

TPS – Tukuprostá sušina

ZEN – Zearalenon