

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**STANOVENÍ MYKOTOXINŮ AFLATOXINŮ, DEOXYNIVALENOLU
A OCHRATOXINU A VE VYBRANÝCH OBILOVINÁCH Z EKOLOGICKÉHO
ZEMĚDĚLSTVÍ METODOU ELISA**

Diplomová práce

Autor: Bc. Kateřina Musilová

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: P – SNB Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Hradec Králové

červenec 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: **Stanovení mykotoxinů aflatoxinů, deoxynivalenolu a ochratoxinu A ve vybraných obilovinách z ekologického zemědělství metodou ELISA** pod vedením vedoucího práce vypracovala samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu použité literatury, který je součástí této práce.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D., za cenné rady, ochotu a věcné připomínky a také vstřícnost při konzultacích, které mi pomohly při zpracování této práce.

Ráda bych poděkovala také paní Blance Novákové, za pomoc v laboratoři, ve které jsem prováděla praktickou část práce.

Anotace

MUSILOVÁ, K. *Stanovení mykotoxinů aflatoxinů, deoxynivalenolu a ochratoxinu A ve vybraných obilovinách z ekologického zemědělství metodou ELISA*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce František Malíř. 74 s.

Cílem a smyslem této práce je experimentální zjištění a stanovení mykotoxinů aflatoxinů, deoxynivalenolu a ochratoxinu A ve vybraných zemědělských plodinách metodou ELISA. Výzkum je prováděn výhradně na plodinách z ekologického zemědělství: pšenice setá a žito seté. Pozornost je věnována vyjmenovaným plodinám, které jsou důležité pro výživu z hlediska jejich systematického zařazení, popisu, využití, rozšíření a ekologie. Podstatná část práce se soustřeďuje na stanovení mykotoxinů ve 3 úrovních: stanovení bezprostředně po sklizni, ze skladu a z výrobního procesu. Pozornost je také věnována následnému srovnání množství mykotoxinů v obilovinách v jednotlivých úrovních od sklizně až po jejich zpracování.

Klíčová slova

Mykotoxiny, ELISA, obiloviny, ekologické zemědělství

Annotation

MUSILOVÁ, K. *Determination of mycotoxins of aflatoxins, deoxynivalenol and ochratoxin A in selected agricultural crops from organic agriculture by ELISA method.* Hradec Králové, 2018. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor František Malíř. 74 s.

The aim and purpose of this Diploma thesis is experimental finding and determination of mycotoxins of aflatoxin, deoxynivalenol and ochratoxin A in selected agricultural crops from organic agriculture by ELISA method. The research is carried out exclusively on organic crops: wheat and rye. Attention is paid to listed crops that are important for nutrition in terms of their systematic classification, description, utilization, extension and ecology. A substantial part of this work focuses on the determination of mycotoxins in 3 stages: determination from field, warehouse and production process. Another main focus is the subsequent comparison of the amount of mycotoxins in cereals in the different stages from harvesting field to its processing.

Keywords

Mycotoxins, ELISA, cereals, organic agriculture

Obsah

Úvod	11
1 Zkoumané mykotoxiny.....	12
1.1 Aflatoxiny.....	14
1.2 Ochratoxin A (OTA).....	18
1.3 Deoxynivalenol (DON).....	21
2 Sledované obiloviny.....	24
2.1 Charakteristika lipnicovitých rostlin (<i>Poaceae</i>).....	24
2.2 Žito seté (<i>Secale cereale</i>).....	27
2.2.1 Systematické zařazení.....	27
2.2.2 Popis.....	28
2.2.3 Využití.....	28
2.2.4 Rozšíření a historie	29
2.2.5 Ekologie	29
2.3 Pšenice setá (<i>Triticum eastivum</i>).....	30
2.3.1 Systematické zařazení.....	30
2.3.2 Popis.....	30
2.3.3 Využití.....	31
2.3.4 Rozšíření a historie	31
2.3.5 Ekologie	32
3 Ekologické zemědělství.....	32
3.1 Historie a rozvoj ekologického zemědělství.....	33
3.1.1 Ekologické zemědělství v EU	35
3.1.2 Ekologické zemědělství v České Republice.....	36
3.2 Cíle a zásady ekologického zemědělství	37
3.3 Pravidla označování bioproduktů, kontrola.....	39

3.4	Financování ekologického zemědělství	40
4	ELISA	41
4.1	Základní složky ELISA testů.....	42
4.1.1	Antigen	42
4.1.2	Protilátka.....	43
4.1.3	Konjugát.....	43
4.1.4	Substrát.....	43
4.2	Přímé a nepřímé imunochemické metody.....	43
4.3	Kompetitivní ELISA.....	44
4.4	Nekompetitivní ELISA.....	44
5	Odběr vzorků.....	44
6	Metodika stanovení obsahu mykotoxinů	46
5.1	Stanovení aflatoxinů	46
5.1.1	Princip testu	46
5.1.2	Dodávaná činidla.....	47
5.1.3	Další potřebný materiál.....	47
5.1.4	Příprava vzorku	48
5.1.5	Provedení testu.....	48
5.1.6	Vyhodnocení testu	48
5.2	Stanovení ochratoxinu A.....	49
5.2.1	Princip testu	49
5.2.2	Dodávaná činidla.....	49
5.2.3	Další potřebný materiál.....	49
5.2.4	Příprava vzorku	50
5.2.5	Provedení testu.....	50
5.2.6	Vyhodnocení testu	50
5.3	Stanovení deoxynivalnolu	51

5.3.1	Princip testu.....	51
5.3.2	Dodávaná činidla.....	51
5.3.3	Další potřebný materiál.....	52
5.3.4	Příprava vzorku.....	52
5.3.5	Provedení testu.....	52
5.3.6	Vyhodnocení testu.....	53
7	Výsledky.....	53
7.1	Výsledky stanovení aflatoxinů.....	53
7.2	Výsledky stanovení OTA.....	54
7.3	Výsledky stanovení DON.....	55
8	Diskuze.....	57
	Závěr.....	61
	Seznam použité literatury.....	63
	Seznam použitých obrázků.....	71
	Seznam použitých tabulek.....	73
	Přílohy.....	73

Seznam zkratek

AEO	oprávněný hospodářský subjekt (Authorised Economic Operator)
AFB ₁	aflatoxin B ₁
AFB ₂	aflatoxin B ₂
AFG ₁	aflatoxin G ₁
AFG ₂	aflatoxin G ₂
AFM ₁	aflatoxin M ₁
AFM ₂	alfatoxin M ₂
BEN	Balkánská endemická nefropatie
CIN	Chronická intersticiální nefropatie
ČR	Česká Republika
DON	deoxynivalenol
EHS	Evropské hospodářské společenství
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ES	Evropské společenství
EU	Evropská Unie
EZ	ekologické zemědělství
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
GAEC	standardy dobrého zemědělského a environmentálního stavu půdy (Good Agricultural and Environmental Conditions)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer) je součástí WHO, se sídlem ve francouzském městě Lyon a zabývá se výzkumem příčin rakoviny
IFOAM	Mezinárodní federace sdružení za organické zemědělství (International Federation of Organic Agriculture Movements)
KEZ	Kontrola ekologického zemědělství
LOD	mez detekce
OTA	ochratoxin A
PRO-BIO	celostátní sdružení ekozemědělců
RIA	radioimunoanalýza (Radioimmunoassay)
SZIF	Státní zemědělský intervenční fond
SMR	povinné požadavky na hospodaření
SZP	správná zemědělská praxe
ÚKZUS	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
VMH	vláknité mikroskopické houby
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

Terminologický slovník

adice	sumace (sčítání)
antagonismus	protichůdné působení
biotransformace	přeměna chemické struktury látky působením živého organismu
diverzita	rozmanitost
embryotoxická látka	látka, která vykazuje toxické účinky na zárodek, embryo
genotoxická látka	látka, která má toxické účinky vůči genomu; poškozují genetickou informaci
hemoragické účinky	krvácivé účinky
hepatom	nádor jater
hepatotoxická látka	látka, která vykazuje toxické účinky na játra
hydroxylace	enzymová reakce spočívající ve vnesení hydroxylové skupiny do sloučeniny
imunotoxická látka	látka, která vykazuje toxické účinky na imunitní systém
inhibice	zpomalení některých procesů v organismu
karcinogenní látka	látka, která vyvolává zhoubné rakovinné bujení
katalýza	urychlení chemické reakce katalýzátory
kvantifikace	určování množství
letargie	otupělost
lymfocyt	typ bílé krvinky, imunitní buňka
mutagenní látka	látka, která je schopná vyvolat genetickou mutaci
mykotoxin	toxin produkováný mikroskopickými vláknitými houbami (plísněmi)
nefrotoxická látka	látka, která vykazuje toxický účinek na tkáň ledvin
neurotoxická látka	látka, která vykazuje toxický účinek na nervový systém
potenciace	zesílení
proliferace	hojné množení, bujení
reziduum	zbytky obtížně rozložitelných, více či méně jedovatých a v přírodě cizích, látek
screening	vyšetřování za účelem vyhledávání chorob v jejich časných stádiích, kdy ještě nenastaly potíže a příznaky
sekundární metabolit	organická látka vznikající v těle organismu, která není přímo zahrnuta do procesu růstu, vývoje či rozmnožování daného organismu
spektrofotometr	přístroj na měření vlnové délky
synergismus	působení stejným směrem, souhlasné působení
toxigenní účinek	produkující toxin
teratogenní látka	látka způsobující vznik vrozených vývojových vad a defektů

Úvod

Lidé a zvířata mohou být neustále ohroženi všudypřítomnými přírodními toxickými látkami, které se nacházejí v potravinách, krmivech a životním prostředí. Takovými látkami jsou i mykotoxiny, což jsou sekundární metabolity vláknitých mikroskopických hub (VMH), např. rodů *Aspergillus*, *Penicillium* či *Fusarium*, ale i dalších. Díky jejich nepříznivým toxickým účinkům na lidské zdraví, ale i díky narůstajícím hospodářským ztrátám, způsobených kontaminací VMH a mykotoxiny, jsou považovány za velkou hrozbu pro bezpečnost potravin a přitahují tak celosvětovou pozornost.

Mykotoxiny se mohou nacházet, jak při pěstování plodin – již na poli, tak i během skladování, v různých fázích zpracování a přepravě plodin a také v kontaminovaných surovinách použitých při výrobě potravin. K významným mykotoxinům se řadí aflatoxiny, ochratoxiny a deoxynivalenol, na které je zaměřena pozornost v této práci. Deoxynivalenol může vznikat na plodinách už přímo na poli, zatímco aflatoxiny a ochratoxin A se většinou vyskytují až během skladování díky nesprávné manipulaci po sklizni. Nicméně díky globálnímu oteplení se předpokládá jejich možný výskyt již na poli, kdy často dochází k mechanickému poškození či napadení hmyzem. Nejdůležitější roli však hraje teplota a vlhkost, což jsou dva limitující faktory pro růst a vývoj mykotoxinů. Je známo, že metody zpracování obilnin, jako jsou třídění, čištění, mletí, fermentace, pečení a pražení snižují koncentraci mykotoxinů. Důležitá je správná zemědělská praxe (SZP), a také správná výrobní praxe.

Cílem práce je stanovení mykotoxinů aflatoxinů, ochratoxinu A (OTA) a deoxynivalenolu (DON) metodou ELISA ve dvou obilovinách pocházejících výhradně z ekologického zemědělství. Stanovení bylo prováděno ve třech fázích, a to u obilovin z pole, dále během skladování a v poslední fázi výroby.

Právě obsah mykotoxinů v bioproduktech pocházejících z ekologického zemědělství je vcelku diskutovaným tématem. Mnoho lidí se domnívá, že díky nemožnosti použití fungicidů během pěstování a skladování jsou bioprodukty doslova plné VMH a jejich škodlivých metabolitů, mykotoxinů. Výskyt mykotoxinů

však není závislý pouze na použití či nepoužití fungicidů, ale na množství jiných faktorů, dále např. na způsobu skladování a zpracování. Kromě toho se v ekologickém zemědělství využívá také preventivních opatření, jako je použití odolných odrůd rostlin či pestré osevní postupy, se kterými se často v běžném konvenčním zemědělství nesetkáme. Organizace pro výživu a zemědělství (FAO/WHO) navíc potvrdila, že konzumace biopotravin nevede u člověka ke zvýšenému riziku nežádoucích toxických účinků, způsobených kontaminací mykotoxiny.

V teoretické části práce je pozornost zaměřena na historii objevu, popis, výskyt a účinky stanovovaných mykotoxinů. Dále je popisována základní charakteristika čeledi lipnicovité, do které patří pšenice setá a žito seté jakožto dvě obiloviny, u kterých se zjišťovaly koncentrace zmíněných mykotoxinů. Třetí část teoretické části práce poskytuje základní poznatky o ekologickém zemědělství a v poslední části je vysvětlena podstata týkající se metody ELISA, která byla využita při stanovení mykotoxinů.

V praktické části se práce zaměřuje na vysvětlení principu metody ELISA a její následné uvedení do praxe, tj. stanovení jednotlivých mykotoxinů v obilovinách pomocí testovací sady RIDASCREEN FAST. Následně pak i práci se spektrofotometrem a softwarovým programem RIDA SOFT Win, který byl využit k výpočtu množství mykotoxinů a tvorbě kalibračních křivek.

1 Zkoumané mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity VMH, které se vyskytují přirozeně a kontaminují celý potravinový řetězec (Ostrý *et al.*, 2017). Jedná se o látky nebílkovinné povahy toxické vůči člověku a hospodářským zvířatům (Laciaková *et al.*, 2011). V současné době je známo přes 400 mykotoxinů (Milicevic *et al.*, 2015), existují však náznaky, že jich existují až tisíce (Boonen *et al.*, 2012). Lidé jsou neustále vystavováni mykotoxinům, především prostřednictvím přívodu potravy, jak rostlinného, tak živočišného původu. Zdravotní rizika jsou pak důsledkem toxicity mykotoxinů (Ostrý *et al.*, 2017). Mykotoxiny tedy představují obrovskou zdravotní hrozbu, jak pro lidi, tak pro zvířata a každoročně přinášejí ztráty na

životech a velké ekonomické ztráty v potravinářském průmyslu a v chovu zvířat (Ji *et al.*, 2016), jmenovitě např. zvýšené náklady na zdravotní a veterinární péči, snížení živočišné výroby, náklady na likvidaci kontaminovaných potravin a krmiv (Zain, 2011; Milicevic *et al.*, 2015; Neme & Mohammed, 2017). Z toho důvodu jsou potřebné metody eliminace či inaktivace mykotoxinů v potravinách i v krmivech, byť pro lidskou potřebu se suroviny pouze třídí. Je však dobře známo, že ne všechny plísně jsou toxinogenní a ne všechny jejich sekundární metabolity jsou toxické (Ji *et al.*, 2016). Některé plísně jsou schopné produkovat více, než jeden mykotoxin a některé mykotoxiny jsou produkovány více, než jedním houbovým druhem (Zain, 2011). Často se na kontaminovaném substrátu může nacházet více mykotoxinů (Zain, 2011; Boonen *et al.*, 2012). Vědecká pozornost je však zaměřena především na mykotoxiny, které se ukázaly být toxické (Zain, 2011; Ji *et al.*, 2016).

Za významné mykotoxiny jsou považovány zejména aflatoxiny (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂), ochratoxiny (OTA), trichotheceny (DON) dále fumonisiny (B₁, B₂, B₃) či zearalenon (Laciaková *et al.*, 2011).

Základní společná charakteristika mykotoxinů je ta, že způsobují jak akutní otravy, tak také pozdní následky neboli chronické otravy (Polášková *et al.*, 2011; Ostrý *et al.*, 2017). Akutní toxicita je charakterizována přívodem vysoké dávky mykotoxinů, rychlým nástupem účinků a zřejmou toxickou reakcí (včetně rychlého úmrtí), naopak chronická toxicita je charakterizována dlouhodobým přívodem nízké dávky mykotoxinů (Zain, 2011; Ostrý *et al.*, 2017).

Ke kontaminacím potravinového řetězce dochází přirozeně a nepředvídatelně, nelze jim zamezit a jejich úplná eliminace není z praktického hlediska uskutečnitelná a to ani při dodržování doporučených správných zemědělských a technologických postupů. Tím jsou mykotoxiny předurčeny k regulaci legislativou (Laciaková *et al.*, 2011). Mimo to neexistuje neškodná dávka mykotoxinů (Polášková *et al.*, 2011). Na mezinárodní úrovni jsou mykotoxiny regulovány hlavním orgánem: Společná komise WHO/FAO pro *Codex alimentarius*, jejímž úkolem je vypracovávat mezinárodní standardy v oblasti bezpečnosti potravin (Laciaková *et al.*, 2011). Právní předpisy pro kontrolu mykotoxinů v EU jsou např. nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, které stanovuje maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Pro krmiva existuje směrnice Evropského

parlamentu a Rady 2002/32 ES o nežádoucích látkách v krmivech (Laciaková *et al.*, 2011; Polášková *et al.*, 2011).

Mykotoxiny se nejčastěji vyskytují v oblastech s horkým a vlhkým podnebím, které je příznivé pro jejich růst. Kromě toho se však vyskytují i v mírném podnebném pásu (Zain, 2011). Co se týče bezpečnosti potravin rostlinného a živočišného původu v poslední době je pozorováno, že velký vliv na výskyt a šíření VMH má změna klimatu (např. oteplování atmosféry, tání ledovců, zvýšení hladiny moře a oceánů) a globální oteplování (Ostrý *et al.*, 2016a). Při posuzování rizika mykotoxinů pro zdraví lidí a zvířat je hlavním problémem množství faktorů (fyzikální, chemické, biologické) ovlivňující produkci a přítomnost mykotoxinů v potravinách a krmivech (Zain, 2011; Milicevic *et al.*, 2015). Samotná izolace a prokázání VMH v potravinách (krmivech) nemusí nutně znamenat přítomnost mykotoxinů (Zain, 2011).

Mezi hlavní cesty přívodu mykotoxinů patří dietární expozice. Toxicita však nastává také po inhalační nebo dermální expozici vzduchu a prachu obsahující mykotoxiny (Boonen *et al.*, 2012; Ostrý *et al.*, 2017). Přestože kůže tvoří přirozenou bariéru pro exogenní sloučeniny, mykotoxiny s nízkou molekulovou hmotností rozpustné v tucích mají vhodné vlastnosti pro průnik kůže. Je však nutné dodat, že data o propustnosti mykotoxinů kůží jsou jen velmi omezená (Boonen *et al.*, 2012). Jako příklad inhalační expozice lze jmenovat historicky, vzdušné otravy OTA v souvislosti s „nemocí starých knih“ a s „prokletím Tutanchamona“, kdy zemřelo náhlou a záhadnou smrtí z nevysvětlitelných příčin několik archeologů, kteří otevřeli starodávné egyptské hrobky. Údajně příčinou úmrtí bylo akutní selhání ledvin způsobené vdechováním spor *Aspergillus ochraceus*, které obsahovaly ochratoxiny (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

1.1 Aflatoxiny

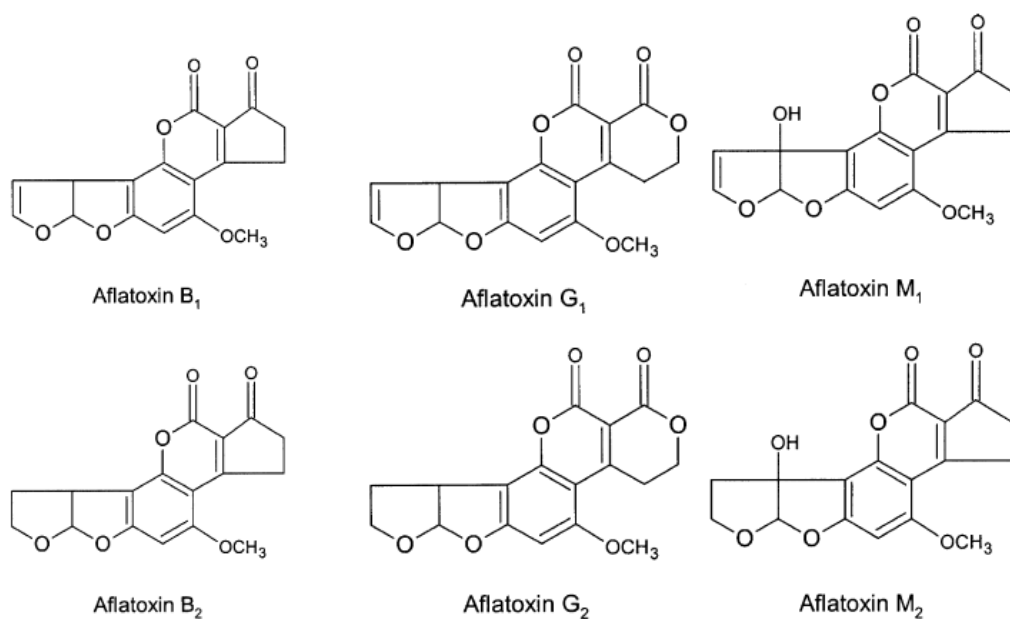
Aflatoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované plísněmi rodu *Aspergillus* ze sekce *Flavi* (Malíř *et al.*, 2003) a jsou uznávány jako nejvíce nebezpečné mykotoxiny (Ji *et al.*, 2016). Zároveň jsou považovány za nejvíce známé a široce distribuované (Neme & Mohammed, 2017). Za nejvýznamnějšího producenta těchto toxinů je označován druh *Aspergillus flavus*, díky němuž

aflatoxiny získaly svůj název (*Aspergillus flavus* toxins). Objev byl učiněn roku 1960 nedaleko Londýna, ve spojitosti s epidemií označovanou jako „onemocnění X“ u krůt (Malíř *et al.*, 2003), kdy zemřelo na 100 000 kusů drůbeže po konzumaci arašídové moučky kontaminované VMH (Zain, 2011). Zasažení jedinci přestali přijímat potravu, krváceli pod kůží a stali se letargičtí (Laciaková *et al.*, 2011). Stejného roku byl objeven aflatoxin M₁ v kravském mléce. Zanedlouho bylo zaznamenáno i další onemocnění způsobené aflatoxiny – epidemie hepatomu u pstruhů, tentokrát v USA (Malíř *et al.*, 2003).

Za nejznámější producenty aflatoxinů lze považovat VMH *A. flavus* a *A. parasiticus* (Campagnollo *et al.*, 2016; Ji *et al.*, 2016; Neme & Mohammed, 2017), zejména za vhodných podmínek, jako je dostatečná teplota a vlhkost, dokážou růst prakticky na každém organickém substrátu (Malíř *et al.*, 2003). Jmenované dva druhy jsou celosvětově rozšířené a mohou přežít po dlouhou dobu v půdě, či rostlinných zbytcích i jiných substrátech (Laciaková *et al.*, 2011). Tvorba aflatoxinů začíná v době, kdy se vytvářejí konidie, po 6 dnech se jejich tvorba většinou snižuje. Mezi další známé producenty aflatoxinů můžeme řadit *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. argentinicus*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*. U přírodních zdrojů, které jsou součástí lidské stravy (zemědělské komodity), hraje největší roli při produkci aflatoxinů hlavně vysoká teplota a obsah volné vody, mezi další faktory lze zahrnout stres ze sucha, genotypy rostlin náchylné ke kontaminaci, poškození hmyzem a také druh substrátu. Vysoká a nízká koncentrace kyslíku naopak potlačuje tvorbu aflatoxinů, stejně tak jako koncentrace oxidu uhličitého vyšší než 10%. Pro tvorbu aflatoxinů jsou nepostradatelné také některé kovy, hlavně pak zinek. Ke kontaminaci však nemusí docházet jen u zemědělských produktů v málo rozvinutých tropických zemích, ale dochází k ní běžně v teplých oblastech s rozvinutým zemědělstvím (Malíř *et al.*, 2003).

Velkou náchylnost ke kontaminaci aflatoxinům mají zejména potraviny z kukuřice a různých druhů ořechů (Wild & Gong, 2010), dále také koření (Malíř *et al.*, 2003) nebo ovoce (Polášková *et al.*, 2011). Kukuřice a podzemnice olejná (arašíd) jsou považovány za hlavní zdroje expozice, jednak díky náchylnosti ke kontaminaci a také díky jejich veliké spotřebě (Neme & Mohammed, 2017). Kromě toho se aflatoxiny vyskytují v obilovinách (např. pšenice, ječmen, žito, rýže), v našich

podmínkách spíše ovšem za podmínek nevhodného skladování. V bramborách, cukru nebo kyselém zelí však aflatoxiny dosud nebyly stanoveny (Malíř *et al.*, 2003). Neme & Mohammed (2017) kromě obilnin, ořechů a koření uvádějí dále olejnatá semena, jako jsou např. slunečnicová, sójová a bavlníková semena. Zásadní význam pro veřejné zdraví představuje aflatoxin M₁, který se vyskytuje v mléce a mléčných výrobcích. Mléko tak vykazuje významný potenciál pro zavedení aflatoxinu do lidské výživy (Campagnollo *et al.*, 2016). Zvýšený výskyt aflatoxinu B₁ v kukuřici byl zaznamenán v letech 2012 – 2013 v jižní Evropě v důsledku zvýšení teplot a velkého sucha, proto odborníci očekávají v blízké budoucnosti i nárůst výskytu aflatoxinu B₁ u kukuřice, ale i v jiných potravinách (Ostrý *et al.*, 2017). Velmi významný byl včasný vývoj analytických metod schopných detekovat a kvantifikovat aflatoxiny v extraktech potravin a potravinářských plodin (Kensler *et al.*, 2010).



Obrázek č. 1 – strukturní vzorce aflatoxinů

Aflatoxiny (obr. č. 1) jsou z hlediska biologického účinku hepatotoxické, imunotoxické a neurotoxické. Pozdní účinky zahrnují genotoxicitu, mutagenitu, karcinogenitu a teratogenitu (Malíř *et al.*, 2003; Polášková *et al.*, 2011). Aflatoxiny jsou lipofilní a jsou schopny překonat placentární bariéru a mohou tak být bioaktivovány v děloze (Wild & Gong, 2010). Akutní i chronická toxicita aflatoxinů klesá v daném pořadí: AFB₁>AFM₁>AFG₁>AFB₂>AFG₂ (Laciaková *et al.*, 2011), při čemž platí, že AFB₁ je nejtoxičtější ze všech, a to dokonce až 10x více toxický, než

AFG₂, 5x více toxický, než AFB₂ a 2x více toxický, než AFG₁. Aflatoxin B₁ je tedy nejsilnější významný přírodní karcinogen (Malíř *et al.*, 2003). Biotransformací aflatoxinů vznikají jejich hydroxyderiváty AFM₁ a AFM₂, které se nacházejí zejména v mléce krav krmených kontaminovaným krmivem (Laciaková *et al.*, 2011; Polášková *et al.*, 2011). Hydroxylací AFB₁ vzniká AFM₁ (Zain, 2011), který byl nalezen v játrech, ledvinách, krvi, moči, stolici, žluči a mléce savců. Je však oproti AFB₁ méně toxický a oproti ostatním přirozeně se vyskytujícím aflatoxinům se může vyskytovat i v nepřítomnosti jiných aflatoxinů. Proto tato expozice AFM₁ představuje největší problém zejména pro děti (Malíř *et al.*, 2003). AFM₂, který je značně méně toxický, než AFM₁ vzniká hydroxylací AFB₂ (Zain, 2011) a nachází se v játrech, ledvinách, moči a mléce savců, včetně toho lidského, ale ve srovnání s AFM₁ v daleko nižších koncentracích. Všeobecně jsou aflatoxiny primárně metabolizovány v játrech pomocí enzymů a oxidáz. Většina primárních metabolitů je pak detoxikována a následně vyloučena močí nebo stolicí (Malíř *et al.*, 2003). Nežádoucí toxikologické důsledky aflatoxinů jsou poměrně rozmanité díky širokému spektru expozic vedoucích k akutním účinkům, včetně rychlé smrti, či ke chronickým následkům (Kensler *et al.*, 2010). Vysoká chronická expozice se projevuje zejména v soběstačných zemědělských komoditách v některých částech např. Afriky či Asie, kde předpisy o kontrole expozice buď vůbec neexistují, nebo jsou prakticky nevymahatelné (Wild & Gong, 2010). Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC/WHO), která kategorizuje mykotoxiny z hlediska karcinogenních účinků, jsou od roku 2012 všechny aflatoxiny řazeny do skupiny A – prokázaný karcinogen pro člověka (IARC, 2012; Ostrý *et al.*, 2017).

Z hlediska chemické struktury se aflatoxiny řadí mezi nenasycené, polycyklické, vysoce substituované kumariny (Malíř *et al.*, 2003). Doposud bylo identifikováno na 20 aflatoxinů, z nichž nejznámější jsou 4 přirozeně se vyskytující typy a to aflatoxin B₁ (AFB₁), který je vůbec nejhojnější, dále aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin G₁ (AFG₁) a aflatoxin G₂ (AFG₂). Jako další lze jmenovat aflatoxin D₁ (AFD₁), aflatoxin M₁ (AFM₁), aflatoxin M₂ (AFM₂), aflatoxin P₁ (AFP₁) nebo aflatoxin Q₁ (AFQ₁). Aflatoxiny ze skupiny B vykazují modrou fluorescenci pod ultrafialovým světlem, zatímco aflatoxiny ze skupiny G vykazují fluorescenci žluto – zelenou (Laciaková *et al.*, 2011) a aflatoxiny skupiny M fluorescenci modro – fialovou (Malíř *et al.*, 2003). Aflatoxiny jsou nestabilní při působení UV záření, naopak jsou velmi stabilní při

teplotách vyšších než 100°C a nevykazují téměř žádný rozklad při pečení, pasterizaci a pražení (Campagnollo *et al.*, 2016).

Dle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 je pro aflatoxin B₁ základní přípustný limit pro všechny druhy obilovin a výrobky pocházející z obilovin stanoven na 2 µg/kg. Pro sumu aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂ limit činí 4 µg/kg. Pro AFM₁ v mléce je stanoven limit 0,050 µg/kg, v dětské výživě činí limitní koncentrace 0,025 µg/kg.

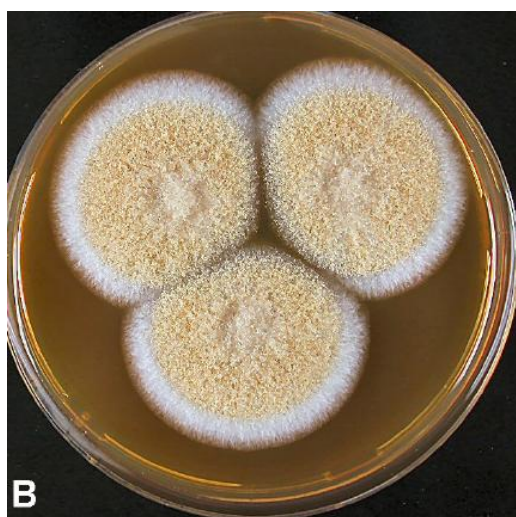
1.2 Ochratoxin A (OTA)

Objev mykotoxinu OTA se datuje do roku 1965, kdy byl izolován z *Aspergillus ochraceus* z kukuřičné mouky v Jihoafrické republice (Malíř *et al.*, 2016) při laboratorním screeningu toxinogenních VMH. Teprve roku 1969 byl OTA jako přirozeně se vyskytující kontaminant nalezen ve vzorku kukuřice v USA (Malíř *et al.*, 2003).

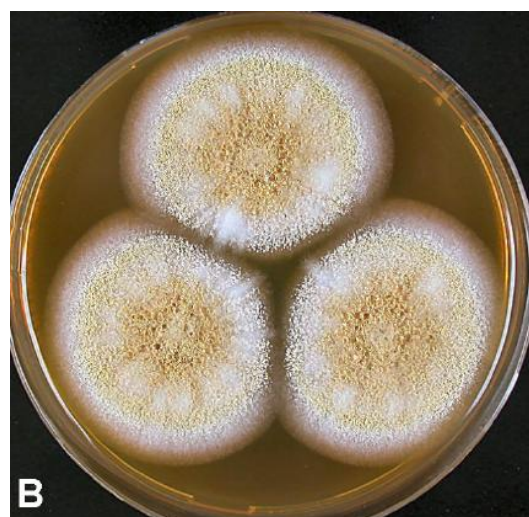
OTA je produkován zejména plísněmi rodů *Aspergillus* nebo *Penicillium* (Malíř *et al.*, 2003; Zain, 2011; Hibi *et al.*, 2011; Polášková *et al.*, 2011). Při produkci OTA se uplatňují VMH rodu *Aspergillus*, to především v tropických a subtropických oblastech (Laciaková *et al.*, 2011), jsou to například druhy *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. melleus*, *A. glaucus*, *A. elegans*, *A. alliaceus*, *A. petrakii* (Malíř *et al.*, 2003). Naproti tomu v chladnějších oblastech je OTA produkován VMH rodu *Penicillium* (Laciaková *et al.*, 2011), např. *P. verrucosum* (Malíř *et al.*, 2003). Roku 2004 byly z kávy izolovány a objeveny nové druhy rodu *Aspergillus* produkující OTA a to *A. westerdijkiae* (obr. č. 2) a *A. steynii* (obr. č. 3), (Frisvad *et al.*, 2004; Malíř *et al.*, 2016). Z kávy byly také izolovány další druhy produkující tento mykotoxin – *A. lacticoffeatus* a *A. sclerotioniger* (Samson *et al.*, 2004; Malíř *et al.*, 2016). VMH rodu *Aspergillus*, které produkují OTA, rostou při vysokých teplotách a produkují pigmentované hyfy a spory, a to činí tyto druhy odolné vůči UV záření (Malíř *et al.*, 2016).

OTA se nalézá zejména v obilovinách a cereálních výrobcích, dále v kávě, víně, koření nebo džusech. (Polášková *et al.*, 2011). Výskyt OTA (a zároveň jeho producenta *A. ochraceus*) byl zjištěn také v rýži, na rozdíl od méně častého výskytu v pšenici a kukuřici (Frisvad *et al.*, 2004). Vysoké koncentrace OTA byly zjištěny také v rozinkách (Abarca *et al.*, 2002; Polášková *et al.*, 2011). Další hlavní zdroje

OTA v potravinách jsou vepřové maso, krev a vnitřnosti (játra, ledviny), pivo, luštěniny a zelený čaj (Malíř *et al.*, 2003). Substrátem růstu plísní by mohly být i nesprávně skladované bylinné čaje (Malíř *et al.*, 2014). V Evropě podle Kodexu pro potravinářské přídatné látky a kontaminující látky je druhým nejdůležitějším zdrojem OTA ve stravě hned po obilovinách víno (Sage *et al.*, 2004). V poslední době se uvažuje o možnosti, že výskyt OTA v krmivech pro zvířata a následné zvýšení výskytu OTA ve vepřovém mase a vnitřnostech je připisován změnám klimatu, vysokým teplotám a suchu. Tyto předpovědi se však v ČR nepotvrdily (Ostrý *et al.*, 2016a). Nicméně expozice člověka OTA z různých potravin je stále významná (Hibi *et al.*, 2011). OTA je relativně tepelně stabilní (Suchý & Herzig, 2005), uvádí se však, že pečení snižuje jeho obsah o 20%, zatímco vaření nemá žádný účinek (Malíř *et al.*, 2013).



Obrázek č. 2 – *Aspergillus westerdijkiae*



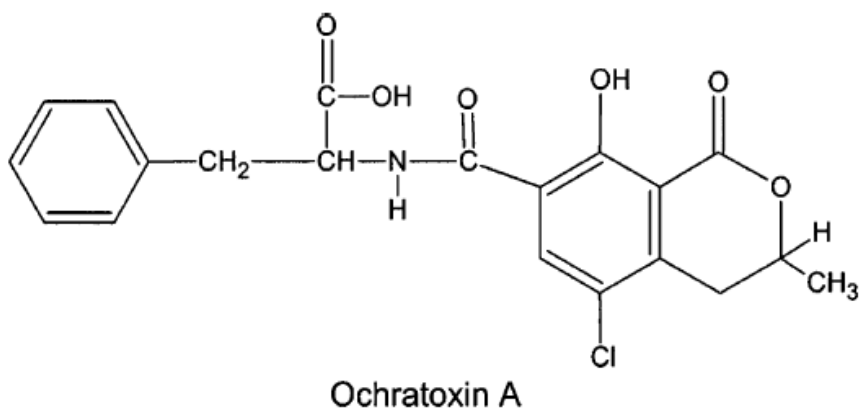
Obrázek č. 3 – *Aspergillus steynii*

Expozice zvířat nebo lidí OTA může způsobit množství zdravotních problémů. Mezi nejvýznamnější cesty přívodu OTA u lidí patří zejména dietární expozice (Malíř *et al.*, 2016). Kožní a inhalační expozice mají malý význam pro populaci, příležitostně však mohou hrát významnou roli (Malíř *et al.*, 2013). Pracovníci v zemědělství jsou často vystaveni inhalační expozici OTA, když manipulují s uloženou pšenicí či obilím obecně, zejména při uchovávání v uzavřeném prostoru po delší dobu. Také farmáři jsou vystaveni kontaminovaným vzdušným aerosolům. Nedávno bylo totiž prokázáno, že OTA je přítomen ve sporách a polétavém prachu (Pfohl-Leszkowicz, 2009). Bylo prokázáno, že OTA má schopnost inhibovat syntézu proteinů (Suchý & Herzig, 2005), z toho je v podstatě odvozena jak akutní, tak chronická toxicita

(Malíř *et al.*, 2003). Pfohl-Leszkowicz (2009) a Malíř *et al.* (2016) uvádějí, že chronické vystavení nízkým dávkám OTA by mohlo být mnohem škodlivější, než akutní expozice vysoké dávce. Mezi další mechanismy účinku OTA náleží poškození metabolismu cukrů a vápníku a poškození mitochondriálních funkcí (Malíř *et al.*, 2003; Laciaková *et al.*, 2011). OTA také narušuje mitotický proces buněk (Mally, 2012). K hlavním biologickým účinkům patří nefrotoxicita, hepatotoxicita, embryotoxicita, imunotoxicita, neurotoxicita, genotoxicita, teratogenita, karcinogenita (Malíř *et al.*, 2013; Malíř *et al.*, 2016) a mutagenita. Významným toxickým účinkem OTA je již zmiňovaná nefrotoxicita, kdy dochází k poškození ledvin a vylučovacího systému (Malíř *et al.*, 2003). OTA je jedním z nejsilnějších karcinogenů ledvin (Pfohl-Leszkowicz, 2009). OTA se podílí na patogenezi některých onemocnění ledvin, např. Balkánské endemické nefropatii (BEN) (Hibi *et al.*, 2011) nebo chronické intersticiální nefropatii (CIN) (Malíř *et al.*, 2016). OTA je podezírán jako možná příčina rakoviny varlat u mladých mužů (Akman *et al.*, 2012). Průzkumy ukazují, že se OTA chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním. Byl nalezen jak v tkáních, tak v krvi, kterou je distribuován v organismu (Malíř *et al.*, 2003; Laciaková *et al.*, 2011). OTA byl detekován v lidské krvi v celosvětovém měřítku. Po požití OTA lze však jeho koncentrace už po několika dnech najít i v moči. Jeho eliminace pomocí moči je však nízká a nezávislá na přijímané dávce. OTA je vylučován také lidským mlékem, avšak koncentrace OTA v mléce je mnohem nižší, než v krvi (Malíř *et al.*, 2016). Z hlediska toxicity je ochratoxin C stejně toxický jako OTA, avšak jeho výskyt je jen vzácný. O něco méně toxický (zhruba 16x), než OTA, je ochratoxin B a za nepříliš toxický je považován ochratoxin α , avšak má účinky genotoxické (Malíř *et al.*, 2003). Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) je OTA řazen do skupiny 2B – možný karcinogen pro člověka (Malíř *et al.*, 2003; Sage *et al.*, 2004), to od roku 1993 na základě několika studií na zvířatech, která prokázala velké množství důkazů o jeho karcinogenitě. Citlivost na rakovinu je závislá na druhu a pohlaví (Malíř *et al.*, 2016).

Z hlediska chemické struktury se OTA (obr. č. 4) řadí mezi pentaketidy a ze skupiny ochratoxinů značně dominuje. Ochratoxiny jako takové jsou deriváty 7-izokumarinu, který se váže na aminoskupinu L- β -fenylalaninu (Laciaková *et al.*, 2011). Další příklady mykotoxinů patřících k této skupině jsou ochratoxiny (B, C, D

a α) a 10-hydroxyochratoxin. Roku 1992 byly objeveny další tři mykotoxiny analogické k OTA, u kterých se však místo fenylalaninu vyskytuje jiný druh aminokyseliny např. lysin (Malíř *et al.*, 2003).



Obrázek č. 4 – strukturní vzorec ochratoxinu A

Dle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 je pro OTA v nezpracovaných obilovinách stanovený limit 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a pro všechny produkty pocházející z nezpracovaných obilovin, včetně zpracovaných výrobků z obilovin a obilovin určených k přímé spotřebě činí limit 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

1.3 Deoxynivalenol (DON)

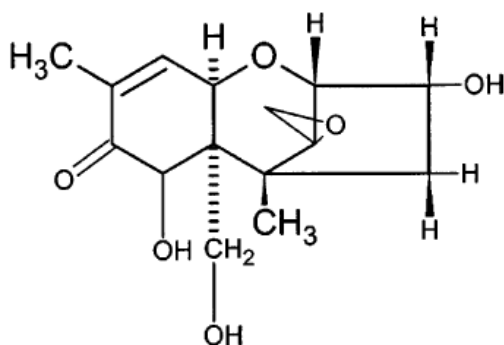
Roku 1973 byl v USA objeven mykotoxin DON, kdy byl izolován z kukuřice napadené toxinogenními VMH *Fusarium graminearum*. Jelikož kukuřice podávaná jako krmivo prasatům zapříčinila zvracení neboli vomitus, byl mykotoxin triviálním názvem pojmenován jako vomitoxin. DON objevili Yoshizawa a Mooroka, avšak nezávisle na sobě (Malíř *et al.*, 2003). Šobrová *et al.* (2010) uvádí, že roku 1972 byly popsány emetické účinky tohoto mykotoxinu u japonských mužů, kteří zkonzumovali plesnivý ječmen obsahující VMH rodu *Fusarium*.

DON je produkován toxigenními kmeny VMH rodu *Fusarium*. Autoři Malíř *et al.* (2003) a Polášková *et al.* (2011) se shodují, že významnými producenty jsou zejména *F. graminearum* a *F. sporotrichioides*. Mezi další významné producenty VMH patří dále *F. equiseti* (Polášková *et al.*, 2011) a *F. poae* či *F. culmorum* (Malíř *et al.*, 2003). DON je zejména produkován druhy VMH - jako jsou *F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. crookwellense* (Wu *et al.*, 2016), které jsou běžnými patogeny u

obilovin, zejména pšenice, ječmene a kukuřice. Velký vliv na výskyt mykotoxinů produkovaných plísní rodu *Fusarium* v zemědělských komoditách (především u kukuřice) měla v roce 2014 změna klimatu v Evropě, včetně České Republiky a to i přes dodržování zásad SZP (Ostrý *et al.*, 2016a). Koncentrace DON se mohou během klíčení zrna zvýšit, protože podmínky vysoké vlhkosti a mírné teploty usnadňují růst VMH rodu *Fusarium* a produkci mykotoxinů (Jin *et al.*, 218).

DON je rozšířen fakticky kdekoliv po světě, kde jsou pěstovány obiloviny (Malíř *et al.*, 2003) a je považován za nejběžnější a nejznámější mykotoxin, kontaminující zrno a následně produkty z obilovin. Jeho výskyt v potravinách a krmivech je potencionálním ukazatelem výskytu dalších mykotoxinů (Šobrová *et al.*, 2010). Na jeho přítomnost poukazuje přítomnost načervenalých, bělavých, scvrklých či nápadně lehkých zrn (Suchý & Herzig, 2005). Díky dodržování SZP a při použití vhodných agrotechnických opatření lze zabránit kontaminaci obilovin DON již při pěstování. Zásadní roli však hrají především klimatické podmínky. DON byl nalezen zejména v obilovinách a výrobcích z nich, ječmeni, kukuřici, rýži, pšenici, triticales, prosu, otrubách, v žitné mouce (Malíř *et al.*, 2003), čiroku, pohance, chlebě, pivu a nudlích (Šobrová *et al.*, 2010). Dále např. ve špagetách, sójových bobech, zázvoru, česneku a bramborách. Nejvyšší koncentrace DON se nacházejí hlavně v ječmeni, kukuřici a pšenici. Co se týče živočichů, přenos DON krmivem je možný, ale přechod reziduí DON do mléka, masa nebo vajec je jen zanedbatelný (Malíř *et al.*, 2003). Nebezpečí spočívá v tom, že i po základním kulinářském zpracování mykotoxin zůstává v potravinách a krmivech (Šobrová *et al.*, 2010). Vaření, pečení a smažení jsou diskutovány jako redukční procesy DON v potravinách, nicméně ze všech mykotoxinů je nejvíce termostabilní. Zejména pečení je důležitý proces využívaný při výrobě obilných potravin (např. chléb). Hodnoty DON však závisejí na více faktorech, např. typ mouky, recept, teplota, doba pečení apod. (Wu *et al.*, 2016). Šobrová *et al.* (2010) uvádí, že jedna z nejdůležitějších fyzikálně-chemických vlastností DON je jeho schopnost odolávat vysokým teplotám (až 200°C), což zvyšuje riziko výskytu v potravinách. Zároveň uvádí, že DON je rozpustný ve vodě, tedy se jeho koncentrace při vaření může snížit (Šobrová *et al.*, 2010).

Riziko expozice člověka je buď přímé přívodem potravin rostlinného původu, nebo nepřímé prostřednictvím potravin živočišného původu (Šobrová *et al.*, 2010). Akutní toxicita je popisována především poškozením GIT a zvracením, což bylo zjištěno zejména u prasat (Malíř *et al.*, 2003), která navíc odmítají i krmivo (Wu *et al.*, 2016). Dále se uvádí, že jiné druhy, jako např. koně, jsou méně citlivé na DON (Wu *et al.*, 2016). DON ovlivňuje, jak zvířecí, tak lidské zdraví a způsobuje akutní dočasnou nevolnost, zvracení, bolest hlavy a břicha, průjem, závratě a horečku (Šobrová *et al.*, 2010). K emetickým účinkům po konzumaci dochází, díky transportu DONu do mozku, kde probíhá dopaminergními receptory (Suchý & Herzig, 2005; Šobrová *et al.*, 2010). U zvířat bylo dále prokázáno dermatologické poškození, hemoragické, imunosupresivní a teratogenní účinky. Je pravděpodobné, že díky imunosupresivnímu působení trichotecenů se zvyšuje karcinogenita aflatoxinu B₁ (Malíř *et al.*, 2003). Polášková *et al.* (2011) navíc uvádí účinky neurotoxické a mutagení. V různých studiích bylo zjištěno, že hlavními cíli působení DONu jsou mitochondrie a ribozomy (Wu *et al.*, 2016). DON také inhibuje syntézu proteinů (Suchý & Herzig, 2005; Laciaková *et al.*, 2011). Koexistence DONu s kyselinou fusarovou představuje další rizika pro konzumenty zrní, protože tato kyselina ještě dokonce potencuje toxicitu DONu (Neme & Mohammed, 2017). Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) neexistují dostatečné důkazy o karcinogenitě DON u pokusných zvířat, proto je DON zařazován do kategorie 3 – není klasifikován jako karcinogen pro člověka (Šobrová *et al.*, 2010; Ostrý *et al.*, 2017).



Obrázek č. 5 – strukturní vzorec deoxynivalenolu

DON (obr. č. 5) patří do skupiny trichotecenů typu B (Malíř *et al.*, 2003; Polášková *et al.*, 2011; Khaneghah *et al.*, 2018). Je to nejčastěji se vyskytující trichothecen

v přírodě (Wu *et al.*, 2016). Strukturálně se jedná o polární organickou sloučeninu, která obsahuje 3 volné hydroxylové skupiny (-OH), které jsou spojovány s její toxicitou (Šobrová *et al.*, 2010). Také se řadí mezi sesquiterpeny – z hlediska způsobu biosyntézy (Malíř *et al.*, 2003).

Dle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 je pro DON v obilovinách určených k přímé spotřebě přípustná limitní koncentrace 750 µg/kg, v pečivu, sušenkách, svačinkách z obilovin a ve snídaňových cereáliích činí limit 500 µg/kg. V příkrmech určených pro kojenice a malé děti je stanovena limitní koncentrace na 200 µg/kg.

2 Sledované obiloviny

Obilniny patří mezi základní složku lidské výživy. Přispívají k pokrytí energetické potřeby populace, jsou zdrojem všech výživově významných látek (Sluková & Skřivan, 2016). Jejich podíl na celkové spotřebě energie v potravě je 30 – 40% u obyvatel vyspělých zemí, v rozvojových zemích dosahuje až 90%. Kromě energie poskytují také bílkoviny, vitamíny a minerální látky. Je však nutné říci, že bílkoviny obilnin nedosahují takové nutriční hodnoty jako bílkoviny živočišné (Benda *et al.*, 2010). Obiloviny sledované v této práci patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Dle botanického hlediska patří mezi obiloviny pouze zástupci rostlin zastupující čeleď lipnicovité, jako je např. rod pšenice (*Triticum*), žito (*Secale*), oves (*Avena*), kukuřice (*Zea*), také rýže (*Oryza*), proso (*Panicum*) či bér (*Setaria*). Všeobecně se však mezi obiloviny řadí druhy rostlin z jiných čeledí, např. pohanka (*Fagopyrum*) z čeledi rdesnovité (Grau *et al.*, 1990). Kromě již zmíněného lze jmenovat také amarant či quinoa z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) (Příhoda *et al.*, 2006; Sluková *et al.*, 2016).

2.1 Charakteristika lipnicovitých rostlin (*Poaceae*)

Největší část lipnicovitých rostlin tvoří vegetativní orgány – kořen, stonk a listy. Kořenový systém u jednoděložných rostlin, kam patří i čeleď lipnicovité, je tvořen vedlejšími kořeny, které se větví v kořenové větve prvního a druhého řádu (Grau *et al.*, 1990). Kořeny prvního řádu se vytváří při klíčení obilek, nazývají se kořeny primární či také zárodečné. O něco později se z podzemního kolénka vytváří mohutný kořenový systém, jedná se o kořeny sekundární, bývají často svazčité

(Benda *et al.*, 2000). Celkově kořeny dosahují až neobyčejné délky, např. u dospělé rostliny žita dosahuje celková délka kořenového systému kolem 80 km (Grau *et al.*, 1990). Žito a oves mají nejbohatší kořenovou soustavu, oproti pšenici či ječmeni. Rostliny však netvoří vegetativní podzemní zásobní orgány, jako je bulva nebo cibule (Benda *et al.*, 2000). Velmi dlouhý je též cévní systém, který začíná už v půdě a do rostliny přivádí vodu a minerální látky. Kořeny slouží zejména k upevnění celé rostliny v půdě, přičemž se celá čeleď řadí mezi mělkokořenné rostliny (Grau *et al.*, 1990). Další funkce je zásobní a vyživovací (Benda *et al.*, 2000).

Stonek, přesněji stéblo, čeledi lipnicovité je vždy okrouhlé a členěné na články (*internodia*) a kolénka (*nodí*). Internodia jsou dutá, pouze kolénka jsou vyplněna rostlinným pletivem (Benda *et al.*, 2000). Stéblo je vždy dvouřadě olistěné tzn., listy jsou umístěny na protilehlých stranách stébla a střídají se od kolénka ke kolénku. I přes celkovou délku stébla (i více než metr), zůstává stéblo pouze 2 mm tlusté. Navíc také nese květenství, které ať už je větvené či kompaktní, dosahuje značné váhy (Grau *et al.*, 1990). Aby nedocházelo ke zlomení stébla vlastní vahou, vyskytují se v jeho stěnách mechanická a sklerenchymatická pletiva. Pouze v místech bezprostředně nad kolénky jsou vlákna přerušena a nahrazena dělivou tkání, která umožňuje stéblu růst do výšky, popř. jeho narovnění při eventuálním růstu do šikmé polohy (Grau *et al.*, 1990; Benda *et al.*, 2000).

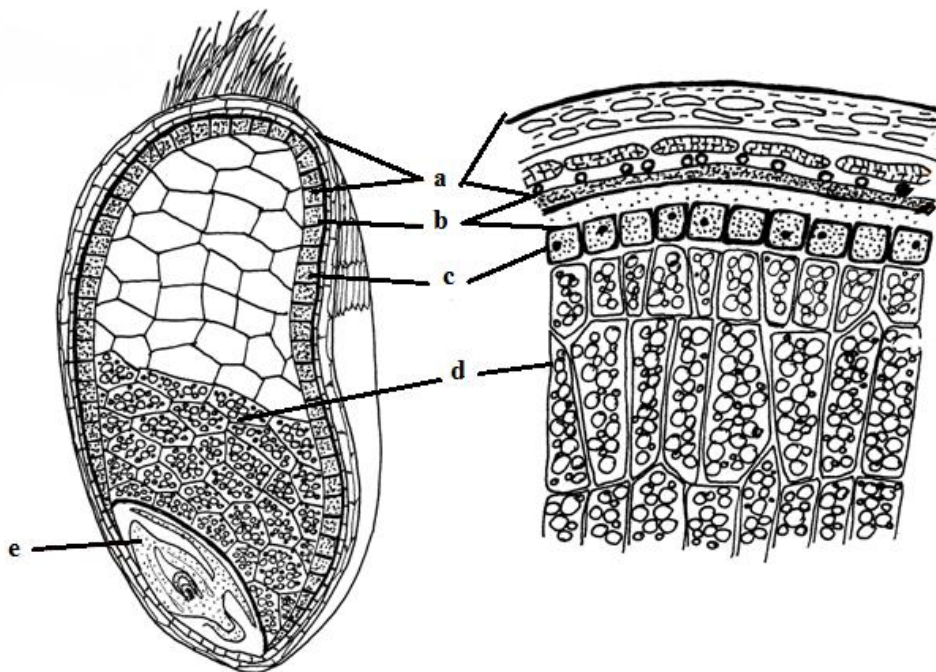
Listy sestávají ze dvou částí – listové pochvy a listové čepele (řapík chybí). Listová pochva je bazální částí a přirůstá ke kolénku a ostatními svými okraji překrývá téměř celé internodium takřka k následujícímu kolénku. Listové pochvy jsou na jedné straně otevřené a její horní část může být vypouklá. Listová pochva plynule přechází v listovou čepel tvořící svrchní konec listu. Na přechodu těchto dvou částí (z úžlabí pochvy) vyrůstá nezelený, malý blanitý lem, nazývaný se jazýček (*ligula*), který slouží zejména při určování. Listová pochva může vybíhat v zašpičatělá ouška (*auricula*) obepínající stonek (Grau *et al.*, 1990; Benda *et al.*, 2000). Plochá nebo svinutá listová čepel je vždy protáhlá a zašpičatělá s rovnoběžnou žilnatinou, která je typická pro jednoděložné rostliny. Každá jednotlivá žilka je svazek vodivého pletiva, sloužící jako výztuha a pro transport živin (Grau *et al.*, 1990).

Z generativních orgánů jsou květy u čeledi lipnicovitých velmi nenápadné, jedná se o dlouhé klasy, laty nebo lichoklasy. Jedná se o větrosprašné rostliny, nemusí tak

vytvářet nápadné květy, protože jejich pyl je přenášen pasivně větrem. Květenství tak musí značně převyšovat úroveň listů. I když je větrosprašnost vývojově primitivnější, pro tuto čeleď je značně výhodná a odráží se v určitých zvláštностech stavby květu (Grau *et al.*, 1990). Květ je tvořen jedním semeníkem, dvěma péřitými, dlouhými, většinou průhlednými bliznami, na které se posléze zachytí pylová zrna. Pod semeníkem se nachází tři tyčinky s dlouhými nitkami a žlutými prašníky. Pod tyčinkami se nachází většinou dvě drobné šupinky – plenky, které se zvětšují při přijímání vody a přispívají tak k otevření květu. Pod plenkami se nachází další šupinovitý květní orgán – pluška. Jako podpůrný listen květu slouží další obal a to plucha. Jednotlivé květy jsou hustě nahloučené v klásek. Uvnitř klásku se jednotlivé květy nachází v paždí vlastní pluchy. Na bázi je pak klásek obalen horní a dolní plevou, ty lze považovat za podpůrné listeny květenství. Samotný klásek se tedy skládá z většího počtu květů a tvoří tak dílčí květenství. Klásky spolu s klasovým vřetenem vytváří klas (Grau *et al.*, 1990; Benda *et al.*, 2000). Existují pak různá uspořádání klásků. Pokud jsou klásky přisedlé na květní ose, jedná se o květenství nazývané klas. Další typ květenství je lata, na které jsou klásky uspořádány na dlouhých postranních větvích. Pokud jsou postranní větve značně krátké, květenství se označuje jako lichoklas. U malého množství rostlin z této čeledi se vyskytují i hroznovitá květenství, jedná se pak např. o hrozen, jednostranný hrozen či palici, kterou nalezneme u kukuřice (Grau *et al.*, 1990).

Mezi generativní orgány patří též plody. Po odkvětu se jednoplodolistý semeník vyvíjí v jednosemenný suchý plod obilku (Grau *et al.*, 1990). Často se plod obilovin označuje jako zrno, byť je to botanicky nesprávně (Benda *et al.*, 2000). Stěna plodu se spojuje s vlastním osemením a srůstá s ním. Každá dozrálá obilka má na jedné své straně hlubokou rýhu, která představuje předcházející břišní šev semeníku a tedy stranu obrácenou ve zrajícím klásku k plušce či kvřetení klásku. Na bázi obilky se nachází štítovitý, asymetrický protažený terčík – štítek (*scutellum*). Pod štítkem se nachází klíček (*embryo*), na kterém lze rozeznat základ kořínku a lodyhy (Grau *et al.*, 1990). Celá obilka (obr. č. 6) je chráněná pevným oplodím (*perikarp*) sloužící k ochraně před mechanickým poškozením, pod kterým se vyskytuje osemení (*testa*), které určuje vnější barevný vzhled a výživná tkáň (*endosperm*). V endospermu se nachází zásobní látky, jako jsou škrobová zrna a bílkoviny, důležité pro výživu embrya a podporu klíčení do doby, než dojde k prorůstání

prvních lístků orníci (Příhoda *et al.*, 2006; Kopáčová, 2007). Mezi endospermem a osemením se nachází jedna nebo několik vrstev aleuronových buněk, které slouží k výživě zárodku (Benda *et al.*, 2000). Po vzniku prvních lístků je výživa zajišťována fotosyntézou. Transport živin je zprostředkováván vrstvou tkáně, která přiléhá na zrníčka škrobu a odpovídá děložnímu lístku. Děložní lístek tak zůstává v obilce a první lístky, které vyrůstají z obilky, jsou vlastně následující listy. Některé druhy celý životní cyklus uskuteční v rámci jednoho roku, jiné klíčí až v létě či na podzim, avšak plody vytvoří až v létě následujícího roku (ozimy) a velký počet druhů je víceletých či vytrvalých a zimu přečkávají např. v podobě podzemních výhonků či stébel a růžic (Grau *et al.*, 1990). Morfologie zrna všech obilovin je zhruba shodná. Rozdíly jsou především v tvaru (kulatá, protáhlá) a velikosti, avšak rozměry se mohou lišit i v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách či kvalitě půdy (Příhoda *et al.*, 2006).



Obrázek č. 6 – podélný řez obilkou (a – oplodí, b – osemení, c – vrstva aleuronových buněk, d – výživná tkáň, e – klíček)

2.2 Žito seté (*Secale cereale*)

2.2.1 Systematické zařazení

- Říše: rostliny (*Plantae*)
- Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

- Nadoddělení: semenné rostliny (*Spermatophyta*)
- Oddělení: krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*)
- Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)
- Čeleď: lipnicovité (*Poaceae*)
- Rod: žito (*Secale*)
- Druh: žito seté (*Secale cereale*)

Dostupné z: Plants Database

2.2.2 Popis

Žito seté je jednoletá nebo přezimující tráva, která dosahuje výšky od 60 do 200 cm (Grau *et al.*, 1990). Je to jednoděložná rostlina se svazčitými kořeny, které druhotně netloustnou (Rovenská, 1973). Jedná se o poměrně mohutnou, přímou rostlinu, která je v horní části hustě chlupatá. Čepele listů jsou ploché, lysé a modravě ojíňené. Listové pochvy mají krátká ouška, jazýčky jsou také poměrně krátké (asi 1,5 mm), na konci zatupělé. Stéblo je tvořeno z kolének a článků a na horním konci je zakončeno jednoduchým květenstvím – klasem (Rovenská, 1973). Ve stádiu zralosti jsou klasy lehce převislé. Klasy jsou čtyřhranné až 20 cm dlouhé, bez vrcholových klásků. Vřeteno pevné a téměř nerozpadavé. Klásky jsou většinou dvoukvěté, vzácně pak trojkvěté (Grau *et al.*, 1990). Klásek se skládá z plev (Rovenská, 1973). Plevy jsou velké do 1 cm, jsou jedno – žilné, úzce kopinaté a na svrchní straně mají osinatou špičku a jsou kýlnaté. Pluchy dosahují délky necelých 2 cm, jsou zřetelně trojžilné, kýlnaté až k bázi a ve svrchní části se silnou osinou (Grau *et al.*, 1990). Dále pluška, mezi ní a pluchou se nachází květ žita, který se skládá z tyčinek a pestíku tvořeného bliznami a semeníkem, který je objímám plenkami (Rovenská, 1973). Plod – obilka má na hřbetní straně hlubokou rýhu, na svrchní straně je chomáček chlupů a dosahuje délky 5 až 9 mm (Grau *et al.*, 1990).

2.2.3 Využití

Žito má hojné využití, nejvíce se však využívá v průmyslu potravinářském (Rovenská, 1973; Tichá & Vyzínová, 2006), také v pícninářství (Rovenská, 1973; Kopáčová, 2007). Žito slouží jako krmivo, avšak jen v omezené míře (hořká chuť, nižší výživná hodnota), více se uplatňuje jako jarní zelené krmení. Případně jej lze využít pro technické a farmaceutické účely např. pro získání námelových alkaloidů.

V potravinářství se nejvíce žito využívá při výrobě některých druhů chleba, lihu či jako kávová náhražka. V Kanadě a USA se z něj vyrábí žitná whisky (Tichá & Vyzínová, 2006). U nás je žitný destilát známý pod názvem „režná“. Dále se využívají pražená žitná semena, která se prodávají jako tzv. žitovka. Žito je též vhodné pro nakličování (Kopáčová, 2007).

2.2.4 Rozšíření a historie

Jedná se o rostlinu, která se nachází na celém světě, přičemž její původní stanoviště bychom našli v západní Asii (Rovenská, 1973; Grau *et al.*, 1990). Plané žito se pravděpodobně nacházelo jako plevelová příměs (Smýkal, 2009; Beranová *et al.*, 2010) v pšeničných polích, až posléze bylo vzato, jako výnosná rostlina. Dodnes se však v Asii vyskytují četné odrůdy planého žita (Grau *et al.*, 1990). Mezi kulturní druhy obilí se žito zařadilo poměrně se zpožděním (Grau *et al.*, 1990; Beranová & Kubačák, 2010). První doložené důkazy o výskytu plevelného žita pocházejí ze sedmého století před Kristem z mladší doby kamenné v Sýrii a Turecku. První doklady o kultivovaném žitu mají původ v období 4400 až 4000 let před Kristem z území Polska. Na území Maďarska, Polska, České Republiky a Slovenska z doby bronzové jsou doloženy nejstarší čisté kultury pěstovaných forem žita (Grau *et al.*, 1990). Teprve až v éře středověku v 11. – 13. století započala doba pěstování této plodiny, a to hlavně v západní a severní Evropě (Grau *et al.*, 1990; Beranová & Kubačák, 2010). Zejména pro výrobu chleba (Grau *et al.*, 1990). Ve střední Evropě začalo převažovat žito mezi polními plodinami teprve až ve 14. – 15. století, což dokazují paleobotanické doklady a historické zprávy (Beranová & Kubačák, 2010). Kulturní žito představovalo nejdůležitější obilovinu pro výrobu chleba, např. v Německu do 17. století (Grau *et al.*, 1990). Beranová & Kubačák (2010) uvádějí, že žito si svůj význam v tomto ohledu udrželo až do 19. století. Do počátku 20. století byly výnosy žita i pšenice v našich podmínkách rovnocenné, od konce 20. století se však podíl žita začal snižovat (Příhoda, 2016). V současné době co se týče výroby chleba, stojí na prvním místě pomyslného žebříčku pšenice (Grau *et al.*, 1990).

2.2.5 Ekologie

Žito seté je vcelku nenáročná obilovina, která má ráda lehce vlhká stanoviště, avšak souvislejší zamokření ji nesvědčí (Grau *et al.*, 1990). Ideální půdy pro

pěstování jsou písčité či písčito – hlinité půdy, které jsou slabě kyselé nebo neutrální (Grau *et al.*, 1990; Tichá & Vyzínová, 2006). Žito je v ČR vyséváno jako ozim (Tichá & Vyzínová, 2006; Kopáčová, 2007), tedy se vysévá na podzim a sklízí v létě následujícího roku. Brzo po zasetí na podzim se tvoří první lístky, které jsou zbarvené do červena. V zimě rostlina přezimuje ve vegetativním stavu a díky chladu získá impuls pro tvorbu květů. Na jaře pokračuje v růstu, koncem dubna se tvoří nosná stébla. V době květu (květen až červen) můžeme nad polem se žitem vidět husté, nažloutlé oblaky pylu. Jde o typickou cizosprašnou rostlinu (Grau *et al.*, 1990). Na rozdíl od pšenice žito nepotřebuje tolik tepla a je možné jej nalézt i ve vyšších nadmořských výškách (900 m) v oblastech s chladným a drsnějším klimatem (Kopáčová, 2007), v Alpách dokonce dosahuje výšky až 1600 m. n. m (Grau *et al.*, 1990). Úrodu přináší také za polárním kruhem (Benda *et al.*, 2000).

2.3 Pšenice setá (*Triticum aestivum*)

2.3.1 Systematické zařazení

- Říše: rostliny (*Plantae*)
- Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)
- Nadoddělení: semenné rostliny (*Spermatophyta*)
- Oddělení: krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*)
- Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)
- Čeleď: lipnicovité (*Poaceae*)
- Rod: pšenice (*Triticum*)
- Druh: pšenice setá (*Triticum aestivum*)

Dostupné z: Gramene

2.3.2 Popis

Pšenice setá je jednoletá nebo přezimující rostlina, která dosahuje výšky od 60 do 120 cm. V dřívějších dobách, kdy nebyly zavedeny krátkostébelné odrůdy, dosahovala výšky i 150 cm. Tato obilovina má přímá dutá stébla, na spodu s chlupatými kolénky (Grau *et al.*, 1990). Stébla jsou kolénky rozdělena na 5 až 6 článků (Benda *et al.*, 2000). Čepele listů jsou lysé či jen málo chlupaté většinou tmavě zelené až modrozelené. Listové pochvy jsou přilehlé, na rozdíl od žita s velmi dlouhými, na pohled brvitými oušky. Jazyčky jsou spíše kratší a na konci

utáté. Lichoklasy jsou téměř pravidelně čtyřhranné až 10 cm dlouhé, nahuštěné na sebe. Klásky bývají dvou až pětikvěté, stejně široké jako dlouhé a poměrně smáčklé. Plevy mají krátký zoubek, v horní části jsou viditelně kýlnaté, v celkovém tvaru spíše podlouhle oválné. Pluchy mohou být s dlouhou osinou i bez ní, v závislosti na odrůdě (Grau *et al.*, 1990). Podle toho se pšenice dělí na vousky – pluchy mají osinu a paličnatky – pluchy nemají osinu (Benda *et al.*, 2000). V době zralosti klasů obilky lehce vypadávají z obalů a pluchy i plušky zůstávají přirostlé k nerozpadavému tuhému vřetenu, obilky jsou tedy nahé. Obilky jsou opět v závislosti na odrůdě buď okrouhlé či oválně podlouhlé, barevně zlatožluté nebo světle žluté, vždy s mělkou rýhou (Grau *et al.*, 1990).

2.3.3 Využití

Pšenice je jedna z nejběžnějších rostlin (Kopáčová, 2007; Khaneghah *et al.*, 2018) a nejdůležitější obilovina světa (Grau *et al.*, 1990). Produkty z pšenice slouží pro lidskou stravu jako primární zdroje kalorií a bílkovin z rostlinných zdrojů (Khaneghah *et al.*, 2018). Pšeničné obilky se obvykle zpracovávají na mouky, které se využívají k výrobě chleba, těstovin (Tichá & Vyzínová, 2006), dále sušenek v potravinářském průmyslu (Khaneghah *et al.*, 2018). Pšeničné šroty, mouky či otruby se využívají pro hospodářská zvířata, jako krmivo (Tichá & Vyzínová, 2006). Jelikož se suché, zralé obilky skládají z více než 70% z uhlohydrátů a asi z 10% z bílkovin, je pšeničná mouka bohatá na lepek a je tak ideální pro pečení chleba a jiného pečiva (Grau *et al.*, 1990). Vysoký obsah lepku však může zvířatům způsobovat trávicí obtíže, protože se při trávení mění na mazlavou hmotu, která může zhoršovat střevní peristaltiku a snižovat využití dodaných živin (Tichá & Vyzínová, 2006). V četných oblastech světa se pšenice využívá k výrobě piva (Grau *et al.*, 1990).

2.3.4 Rozšíření a historie

Pšenici setou nelze pěstovat ve vyšších polohách (např. v jižních Alpách), mimoto se však vyskytuje v podstatě ve všech kulturních oblastech světa. Hranice rozšíření pšenice směrem na sever setrvává za hranicí výskytu jiných obilovin např. žita a ječmene (Grau *et al.*, 1990). Pšenice obecná patří mezi nejrozšířenější plodiny ve světě, i u nás (Tichá & Vyzínová, 2006). Nejstarší nálezy pšenice lze datovat stejně jako u žita do sedmého století před Kristem do doby kamenné v Turecku a Sýrii,

navíc ještě v Íránu a v Iráku (Grau *et al.*, 1990). I když je pšenice setá sice starobylá obilovina, ve střední Evropě byla vysévána zpočátku jen výjimečně (Beranová *et Kubačák*, 2010) např. v okolí Göttingenu (Grau *et al.*, 1990). První čisté kultury pšenice je možno datovat zhruba v době 3600 let před Kristem díky nálezům z okolí Magdeburku. Není však jednoznačné zda lze nalezený materiál zařadit k okruhu dnešní pšenice seté či pšenice tvrdé (Grau *et al.*, 1990). Beranová *et Kubačák* (2010) a Faměra (2016) uvádějí, že ve větším množství pěstovali pšenici především Keltové, ale jako hlavní obilovinou se stala až s příchodem Slovanů. Dále uvádějí, že koncem středověku se pšenici přestalo dařit (zaplevelená a vyčerpaná půda) a vystřídalo ji žito, poté však ve 20. století, díky novým způsobům obdělávání půdy a hnojení, byl umožněn její návrat.

2.3.5 Ekologie

Jedná se o druhou nejstarší obilovinu, hned po ječmenu, z hlediska pěstování. V podstatě jde o nenáročnou obilovinu. Je pěstována spíše na výhřevných, jen mírně suchých místech jako ozim, ale i jako jařina (Grau *et al.*, 1990). Vyžaduje strukturní půdy, většinou jílovité a hlinité s neutrální až slabě kyselou půdní reakcí, s dobrým zásobováním živinami. Nevhodné půdy jsou kyselé, písčité a trvale zamokřené (Tichá & Vyzínová, 2006). Kořeny dosahují hloubky až 1 metru. Pšenice je rostlina dlouhodobní, tedy čím je delší den, tím rychleji nastupuje reprodukční fáze – kvetení, jenž probíhá v červnu. Kromě dnešních pšenic s dlouhými klasy existují i odrůdy pšenic s klasy kratšími a téměř kulovitými. Všechny odrůdy se z genetického hlediska pokládají za příslušníky stejného druhu *Triticum aestivum*, avšak v praxi jsou rozdělovány. Pšenice setá, jak ji známe dnes je hexaploid – obsahuje 6 chromozomových sad (Grau *et al.*, 1990). V současnosti asi 95% pšenice pěstované po celém světě je právě hexaploidní pšenice setá (chlebová), zbývajících 5% zaujímá tetraploidní pšenice tvrdá (těstovinová), která je více přizpůsobená suchému klimatu a slouží k výrobě regionálních potravin, např. kuskus a bulgur (Shewry, 2009).

3 Ekologické zemědělství

V České Republice je ekologické zemědělství (EZ) dle zákona o ekologickém zemědělství č. 242/2000 Sb. charakterizováno následovně: „*Ekologickým*

zemědělstvím se rozumí zvláštní druh zemědělského hospodaření, který dbá na životní prostředí a jeho jednotlivé složky. Stanovuje omezení či zákazy používání látek a postupů, které zatěžují, znečišťují nebo zamořují životní prostředí nebo zvyšují rizika kontaminace potravního řetězce, a který zvýšeně dbá na vnější životní projevy a chování a na pohodu chovaných hospodářských zvířat.“ Ekologické zemědělství dále využívá šetrné zpracovatelské postupy bez použití chemicko-syntetických látek při výrobě potravin. Výroba biopotravin je pak kontrolována specializovanou nezávislou kontrolou a po jejich certifikaci dochází k označení a odlišení od ostatních potravin. Ekologické zemědělství se v jiných zemích označuje např. jako zemědělství biologické - v německy mluvících zemích či zemědělství organické - v anglicky mluvících zemích (Dvorský & Urban, 2014).

Podle definice nařízení Rady (ES) č. 834/2007 *„je ekologická produkce celkový systém řízení zemědělského podniku a produkce potravin, který spojuje osvědčené environmentální postupy, vysokou úroveň biologické rozmanitosti, ochranu přírodních zdrojů, uplatňování přísných norem pro dobré životní podmínky zvířat a způsob produkce v souladu s požadavky spotřebitelů, kteří upřednostňují produkty získané za použití přírodních látek a procesů.“*

V akčním plánu ČR pro rozvoj EZ v letech 2016 – 2020 se uvádí, že díky komplexnímu přístupu EZ dochází k řešení řady problémů, jako je např. snižující se kvalita půdy, pokles druhové rozmanitosti, zhoršená kvalita vod či zhoršená kvalita ovzduší, která hraničí s riziky změny klimatu. I přes pozitiva, která přináší EZ, není dostatečně využit potenciál možného rozšíření EZ. Nicméně i tak patří ČR mezi dvacet zemí světa s největší výměrou půdy v EZ a mezi deset zemí světa s nejvyšším podílem ploch v EZ z celkové zemědělské půdy. Co se týče EU, ČR si udržuje 4. pozici hned za Rakouskem, Švédskem a Estonskem.

3.1 Historie a rozvoj ekologického zemědělství

Počátky ekologického zemědělství jsou datovány kolem první poloviny dvacátého století. Po druhé světové válce se zemědělství začínalo intenzifikovat a specializovat při tzv. Zelené revoluci (Dvorský & Urban, 2014). U nás se toto období nazývalo spíše „Socializace zemědělství“ (Urban *et al.*, 2003). Během intenzifikace byla lidská práce nahrazena mechanizací a chemickými prostředky

k ošetřování zemědělských plodin a hospodářských zvířat. Intenzivní zemědělství tak zajišťovalo dostatek cenově dostupných potravin, ale vzhledem k množství chemikálií a používaných metod při výrobě, byla jejich kvalita pochybná (Polášková *et al.*, 2011). Docházelo i k likvidaci rodinných farem, tím pádem i ke ztrátě osobní zodpovědnosti zemědělce za vlastní půdu, chovaná zvířata a majetek (Urban *et al.*, 2003). Navíc v takové zemědělské krajině klesá druhová diverzita a půda ztrácí svou úrodnost a zhutňuje se pod těžkou mechanizací, kromě toho ztrácí i jiné důležité vlastnosti (Urban *et al.*, 2003; Polášková *et al.*, 2011). Začaly se projevovat problémy s plodností hospodářských zvířat či s klíčivostí osiv (Urban *et al.*, 2003). Na negativa průmyslového zemědělství začali reagovat zemědělci a spotřebitelé ustanovením zásad kontrolovaného ekologického zemědělství. Vznikly tak metody, které se odlišovaly přístupem k ošetřování půdy a výživy rostlin (Dvorský & Urban, 2014). Jedná se o tradiční zemědělské postupy, které jsou podloženy vědeckými znalostmi a aplikací přírodě blízkých způsobů. Celkově se jedná o komplex moderních metod hospodaření, který zachovává životní prostředí a respektuje přirozené vztahy mezi organismem a člověkem. Ekologické zemědělství má tedy významnou krajinotvornou funkci a pomáhá řešit ztrátu biodiverzity (Polášková *et al.*, 2011).

Organicko-biologické zemědělství v Evropě poskytlo základ mezinárodním normám nevládní organizace IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements – Mezinárodní federace sdružení za organické zemědělství) se sídlem v Německu, která zastřešuje hnutí ekologického zemědělství (Dvorský & Urban, 2014). Základní standardy (Basic standards) stanovující požadavky na úpravu pravidel EZ byly první nadnárodní směrnici IFOAM vydané pro období 1982 – 1983 (Urban *et al.*, 2003; Dvorský & Urban, 2014). Teprve až v roce 1985 byla vydána v Rakousku první závazná právní norma upravující EZ. Následně byly vydány obdobné zákony i v jiných zemích. Roku 1991 bylo v členských zemích EU díky rozmachu trhu s biopotraviny vydáno nařízení Rady (EHS) 2092/1991, jakožto první evropská právně závazná norma, která stanovuje minimální požadavky pro označování bioproduktů a biopotravin a jejich následné uvádění na trh. Toto nařízení bylo nahrazeno nařízením Rady ES 834/2007 a k tomu se vztahující prováděcí pravidla: nařízení Komise ES 889/2008, kterými se stanovila podrobná pravidla pro ekologické podnikatele a

nařízení Komise ES 1235/2008 o podrobných pravidlech pro dovozy (Schlüter & Blake, 2009; Dvorský & Urban, 2014). Tyto normy doplňuje v ČR také zákon o ekologickém zemědělství č. 242/2000 Sb. (Dvorský & Urban, 2014).

3.1.1 Ekologické zemědělství v EU

Dle statistiky ekologického zemědělství z roku 2002 se v zemích EU ekologicky obdělávaná zemědělská půda rozšířila během let 1982 – 2002 na plochu cca 5,5 milionů ha. Ekologicky obdělávaná zemědělská půda tvořila 3,4% z celkové výměry zemědělské půdy v EU. Velkého rozvoje dosáhlo ekologické zemědělství v 90. letech, v poslední době však tempo růstu zpomalilo. Prognóza na další dekádu však předpokládala další rozšíření podílu ekologicky obdělávané půdy. Situace v EZ je mezi členskými státy EU velice rozdílná. Rakousko, Dánsko, Finsko, Švédsko a Itálie, která se ve světovém měřítku staví na třetí místo, hned za Austrálií a Argentinou, byli v EZ relativně nejsilnější. Na velmi nízké úrovni bylo EZ v Řecku, Portugalsku dále pak v Irsku. Na Maltě se ekologické zemědělství neprovozovalo vůbec (Javůrková, 2004).

V květnu 2004 bylo do EU přijato deset nových zemí. Toho roku byl přijat „Evropský akční plán pro organické potraviny a zemědělství“, který měl umožnit průběžný rozvoj organického zemědělství v EU. Na konci roku 2004 se ekologicky hospodařilo na 5,7 milionů ha půdy, což představovalo 3,4% celkové plochy zemědělské půdy. Ve srovnání s rokem 2002 se zvýšila plocha ekologicky obhospodařované půdy o 2,4%, avšak klesl počet registrovaných farem o 9,3%, což je přičítáno výraznému úbytku farem v Itálii. Nejsilnější pozici mělo opět Rakousko (Vondrášková, 2006).

V r. 2005 přijala Evropská komise nové nařízení o ekologickém zemědělství s cílem větší srozumitelnosti pro zemědělce i spotřebitele. Na pomyslném prvním žebříčku neustále setrvalo Rakousko, které už hospodařilo ekologicky na 14,5% celkové zemědělské půdy země. Nařízení o ekologickém zemědělství z roku 2006 vzbudilo velké rozpaky. IFOAM se k návrhu vyjádřila, že je značně nedostatečný a že by přijetí návrhu poškodilo budoucí vývoj ekologického zemědělství. Jedním z hlavních problémů byl návrh na povolení kontaminací GMO až do výše 0,9 % v biopotravině, přičemž současný stav nepovoluje žádnou. V tomto roce stálo

překvapivě na prvotním místě Polsko, které se za pouhý rok výrazně zlepšilo v ekologickém zemědělství a výrobě biopotravin (Vondrášková, 2006).

Na konci roku 2015 bylo v EU 6,2% z celkové výměry zemědělské půdy obhospodařováno ekologicky, což odpovídá 11,2 milionům ha ekologické půdy. Rakousko hospodařilo na 21,3% celkové zemědělské půdy země. Země s největšími ekologickými zemědělskými oblastmi byly Španělsko (téměř 2 miliony ha), Itálie (1,5 milionů ha) a Francie (1,4 milionů ha). Největším trhem pro ekologické výrobky bylo v roce 2015 Německo, následovala Francie a Velká Británie (Willer & Lernoud, 2017).

3.1.2 Ekologické zemědělství v České Republice

Ekologické farmy k roku 2002 obdělávaly 5,5% z celkové výměry zemědělské půdy v ČR (Javůrková, 2004). K r. 2010 údajně hospodařilo v ČR už více než 3 500 ekofarmářů (Polášková *et al.*, 2011). Data z r. 2013 uvádějí, že bylo ekologickým zemědělstvím v ČR obhospodařováno 493 394 hektarů, což odpovídá 11,68% z celkové výměry zemědělské půdy (Dvorský & Urban, 2014). Stejní autoři dále uvádějí, že uvedenou výměru obhospodařuje okolo 4 000 ekologických zemědělských podniků a že se ČR v tomto ohledu staví nad průměr EU (Dvorský & Urban, 2014). V akčním plánu ČR pro rozvoj EZ v letech 2016 – 2020 se uvádí, že k červnu roku 2015 ekologicky hospodařilo 4 176 ekofarem na celkové výměře 503 000 hektarů, což odpovídá 12,0% z celkové výměry zemědělské půdy. Dle ročenky ekologického zemědělství v České republice (2015) činila celková výměra ekologicky obhospodařovaných ploch k 31. 12. 2015 téměř 495 000 hektarů, což odpovídá 11,7% z celkové výměry zemědělské půdy v ČR, celkově pak hospodařilo 4 115 ekofarem. I když se hodnoty mírně liší, podstatný je fakt, že výměra ekologicky obhospodařovaných ploch se stále navyšuje.

V České Republice hraje významnou roli PRO-BIO, jakožto celostátní sdružení ekozemědělců, zpracovatelů a prodejců biopotravin (Polášková *et al.*, 2011). Avšak nejdůležitější roli pro rozvoj EZ má Ministerstvo zemědělství, v rámci kterého byl zřízen samostatný Odbor environmentálního a ekologického zemědělství. Ministerstvo má klíčovou roli v garantování a vyplácení dotací, které jsou vypláceny v rámci Programu rozvoje venkova. Dozor nad vyplácenými dotacemi ve formě úředních kontrol provádí ÚKZUZ. V ČR existují 4 pověřené privátní kontrolní

a certifikační organizace: KEZ o.p.s., ABCERT AG, Biokont CZ s.r.o. a Bureau Veritas Czech Republic, spol. s.r.o. (Dvorský & Urban, 2014).

Mezi hlavní rostlinné ekologické produkty patří pšenice, žito, oves, ječmen, brambory a zelenina zatímco v živočišné výrobě se produkuje hlavně mléko, hovězí maso a ovčí maso (Javůrková, 2004). Dle ročenky ekologického zemědělství v České republice (2015) jsou hlavními plodinami na orné půdě píce, hlavně pak víceleté pícniny a dále obiloviny, z nichž nejčastěji pěstovány byly pšenice a oves, v menší míře triticales, ječmen a špalda. Co se týká technických plodin, pak se mírně zvýšila plocha olejnin, jako je slunečnice, hořčice a řepka. Pěstování zeleniny a okopanin trvale zůstává však na stále nízké úrovni. V živočišné výrobě se v r. 2015 zaznamenal nárůst ekologicky chovaných zvířat, při čemž nejvíce dominuje jednoznačně chov skotu následovaný chovem ovcí. V chovu koz byla též pozorována vzestupná tendence, oproti chovu prasat, kde již růstový trend nepokračoval. Je nutno podotknout, že mezi hlavní oblasti ekologického zemědělství se řadí méně příznivé oblasti, zejména pak horské a podhorské oblasti, které zaujímají až 88% výměry (Ročenka ekologického zemědělství v České republice, 2015).

3.2 Cíle a zásady ekologického zemědělství

Hlavní prioritou ekologického zemědělství je kvalita, nikoli kvantita produkce (Urban *et al.*, 2003). Mezi cíle EZ, kromě zlepšení krajinného rázu a zvýšení biodiverzity, patří výroba a prodej bioproduktů. Mezi hlavní přínosy bioproduktů pro spotřebitele se řadí absence konzervantů, reziduí pesticidů a geneticky modifikovaných organismů (Polášková *et al.*, 2011). Dvorský & Urban (2014) mezi hlavní cíle EZ řadí především:

- zlepšování úrodnosti půdy
- využívání uzavřených koloběhů látek
- minimalizování používání neobnovitelných surovin a fosilních paliv
- ochranu přírody a její diverzity
- uchování přírodních ekosystémů v krajině
- zamezení znečišťování životního prostředí zemědělskou činností

- zamezení používání rychle rozpustných průmyslových hnojiv a chemicko-syntetických pesticidů
- vytvoření vhodných podmínek pro hospodářská zvířata tak, aby vyhovovaly jejich fyziologickým a etologickým potřebám a zároveň i humánním a etickým zásadám
- produkce kvalitních biopotravin a krmiv v dostatečném množství a zároveň s vysokou nutriční hodnotou

Konzument si tak je vědom, že způsob produkce byl ekologický, ohleduplný k chovu hospodářských zvířat, šetrný k životnímu prostředí a neobnovitelným zdrojům surovin a energie z hlediska etického, morálního a environmentálního. Nejde tedy jen o mechanické, chemické či mikrobiologické hodnocení obsahu látek (Urban *et al.*, 2003).

Vybrané body ze zásad pěstování rostlin (Urban *et al.*, 2003):

- struktura plodin musí umožnit střídání plodin
- vegetační kryt půdy má být co nejdelší
- osevní postup musí bránit erozi půdy
- dostatečná druhová pestrost pěstovaných plodin, která umožní přežívání prospěšných organismů
- ochrana rostlin proti chorobám a škůdcům je založena na správné agrotechnice
- hnojení a výživa jsou založeny na správném osevním postupu, používá se organické hnojení, minerální lehce rozpustná hnojiva nejsou povolena

Vybrané body ze zásad chovu zvířat (Urban *et al.*, 2003):

- způsob ustájení musí odpovídat fyziologickým a etologickým potřebám zvířat
- všechna opatření, technologie a technika chovu zvířat musí odpovídat požadavku udržení dobrého zdraví a dlouhověkosti zvířat
- je nutno zajistit pohodu hospodářských zvířat – čerstvý vzduch, dostatek prostoru, podestýlka, ochrana před extrémním počasím

- krmná dávka musí odpovídat fyziologickým potřebám zvířat, lze používat minerální a vitamínové přísady přírodního původu
- používání syntetických léčiv, stimulátorů a hormonálních látek není povoleno
- tělesné poškozování a mrzačení není povoleno

3.3 Pravidla označování bioproduktů, kontrola

Bioprodukty, které mohou nést označení biopotraviny, musejí splňovat několik kritérií, nacházejících se v nařízení Rady (ES) č. 834/2007 o ekologickém zemědělství a v zákonu č. 30/2006 Sb. Výrobek musí obsahovat nejméně 95% přísad, které pocházejí z ekologického zemědělství a musí být dodán zapečetěný a označený (Polášková *et al.*, 2011). Zbývajících 5% musí být suroviny ze seznamu povolených surovin. Jedná se o suroviny, které např. nejsou k dispozici v bio kvalitě v dostatečném množství (Leibl, 2010).

Kromě toho na obalu výrobku musí být uvedeno logo ekologického zemědělství EU, dále může být uvedeno logo národní a kód kontrolního orgánu (Leibl, 2010; Polášková *et al.*, 2011). Právě použití loga EU (obr. č. 7) je vždy doprovázeno kódovým číslem kontrolního orgánu či organizace, kterým podléhá provozovatel, který vykonal poslední fázi produkce či přípravy. Toto logo je jednotné pro všechny balené biovýrobky, které byly vyrobeny v jednom z členských států EU a splňují stanovené normy (Dvorský & Urban, 2014).



Obrázek č. 7 – logo EU



Obrázek č. 8 – národní logo „biozebra“

Národní logo (obr. č. 8) tzv. biozebra je používáný v ČR jako celostátní ochranná známka pro biopotraviny (Urban *et al.*, 2003). V České republice kontrolu a certifikaci provádí akreditované organizace BOKONT, ABCERT a KEZ – kontrola ekologického zemědělství (Polášková *et al.*, 2011; Dvorský & Urban, 2014).

Certifikace neboli ověření, že daná biopotravina splňuje daná pravidla, se vydává jako výstup kontroly a je platná max. 15 měsíců (Leibl, 2010). Na celý systém pak dohlíží Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (Polášková *et al.*, 2011). Řádné kontroly musí být prováděny na každé ekofarmě alespoň jednou ročně (Urban *et al.*, 2003). Kontrola tedy probíhá pravidelně a dokládá fakt, že výrobce plní dané nařízení. Díky tomu může producent své výrobky označovat slovem bio (Leibl, 2010). Každý podnikatel v ekologickém zemědělství má základní povinnost dodržovat pravidla pěstování či chovu a zpracování produktů v produkčním a výrobním řetězci dle příslušných dokumentů a pravidel. Pokud by se tak nestalo a došlo by k neoprávněnému užívání označení bio- či eko-, hrozí až milionové pokuty (Polášková *et al.*, 2011).

3.4 Financování ekologického zemědělství

První finanční prostředky na podporu vzniku ekologicky hospodařících podniků v ČR byly uvolněny v letech 1990 – 1992. Po roce 1998 díky obnovení státní podpory nastal výrazný rozkvět EZ. Po vstupu ČR do EU (od roku 2004) byla finanční podpora ekologického zemědělství zajištěna v rámci AEO. V členských státech EU jsou podmínky finanční podpory zajišťovány ze strany státu tzv. programovým dokumentem, kterým byl v ČR „Horizontální plán rozvoje venkova (2004 - 2006)“ a „Program rozvoje venkova (2007 – 2013)“. Od roku 2015 vstoupil v platnost nový Program rozvoje venkova (2014 – 2020), ve kterém bude nově podpora dostupná pouze pro uzavřené ekofarmy bez souběžného konvenčního hospodaření na zemědělské půdě. Od roku 2004 je rozvoj EZ podporován prostřednictvím „Akčních plánů ČR pro rozvoj EZ“ (Akční plán ČR pro rozvoj EZ v letech 2016 - 2020).

Ekologičtí zemědělci, stejně jako kterýkoliv jiný registrovaný zemědělský subjekt mají nárok na přímé platby a národní doplňkové platby. Platby jsou však podmíněny dodržováním pravidel Cross – Compliance a zároveň podřízeny se kontrolám podřízenosti, které jsou prováděny dozorovými organizacemi (např. ÚKZUZ) a platební agenturou SZIF. Při kontrole se inspektoři zaměřují na vybrané nejdůležitější požadavky, které si určila ČR tak, aby co nejlépe vystihovali evropské předpisy (SMR) a požadavky na správný zemědělský a environmentální stav (GAEC). A právě Cross – Compliance a GAEC jsou podmínkou pro přímé platby.

Pokud zemědělec dobrovolně plní i některé nadstandardní požadavky má nárok na TOP UP tedy národní doplňkové platby. Dotace jsou vypláceny v rámci Programu rozvoje venkova a vyplácejí se nad rámec základních (přímých) plateb (Dvorský & Urban, 2014).

4 ELISA

V současné době se mykotoxiny stanovují pomocí analytických metod, nejčastěji pak imunochemickými a chromatografickými technikami. Imunochemické metody jsou založené na reakci antigenu s protilátkou (Laciaková *et al.*, 2011). Přesněji se jedná o reakci antigenních determinant (epitopů) a vazebným místem protilátky (Janatková, 2014) s výsledným vznikem imunokomplexu (Cibiček *et al.*, 2014). Pokud mluvíme o ELISE, musí být jedna ze dvou komponent značená, aby byla umožněna spektrofotometrická detekce (Laciaková *et al.*, 2011). Látka, která v tomto případě slouží k označení je enzym (Janatková, 2014). V minulosti se ke značení používaly radioaktivní izotopy, potom by se jednalo o metodu RIA – radioimunoassay (Stejskal *et al.*, 2008). Z naměřené absorbance se posléze určí množství mykotoxinů (Laciaková *et al.*, 2011).

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) neboli enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Stejskal *et al.*, 2008) je heterogenní enzymová imunoanalýza (Crowther, 2009; Cibiček *et al.*, 2014), při které je jedna komponenta reakce adsorbována na povrch pevné fáze, která usnadňuje oddělení vázaných a volných reaktantů (Janatková, 2014). Při tom se využívá promývacích kroků, které zahrnují vyprazdňování jamek a následné přidání kapaliny do jamek, přičemž se celý proces musí opakovat nejméně třikrát pro každou jamku (Crowther, 2009). Pevnou fází mohou být např. jamky mikrotitračních destiček ve formátu 8x12, které jsou dle Crowther (2009) zdaleka nejvíce využívány. Další alternativou může být zkumavka, polystyrenová tyčinka nebo je možno využít magnetických částic (Stejskal *et al.*, 2008). Dále se přidává enzymem značené činidlo pro umožnění kvantifikace. Následuje kvantifikace zesílením barevného produktu po přidání vhodného substrátu. Jakmile je dosaženo barevného produktu, je nutné, aby barva zůstala stabilní, proto se přidá zastavovací činidlo. Jelikož je produkt katalýzy substrátu zbarven, lze jej číst a to dvěma způsoby: vyhodnocení pomocí očí nebo

použitím spektrofotometru, při čemž je nutné dbát na výběr vhodných filtrů pro detekci správných vlnových délek (Crowther, 2009). Jedná se o jednu z nejpoužívanějších imunologických metod, která slouží k detekci a kvantifikaci protilátek a antigenu (Habuštová *et al.*, 2011).

Metody ELISA jsou považovány za velmi citlivé a specifické (Sýkorová & Nedělník, 2004; Cibiček *et al.*, 2014). Výhodou této metody je schopnost vizuálně rychle oddělit negativní vzorky od vzorků podezřelých z positivity, které se následně musí prověřit jinou analytickou metodou (Laciaková *et al.*, 2011). Výhodou je i zpracování velkého množství vzorků (Stejskal *et al.*, 2008). Sýkorová & Nedělník (2004) uvádějí jako další výhody dostupnost hotových komerčních kitů, snadnou extrakci a minimální nutnost čištění extraktu. Dále se ELISA vyznačuje tím, že vyžaduje jen nízké objemy vzorků a příprava vzorků je také rychlejší, než u jiných metod (Dohnal *et al.*, 2013). Sýkorová & Nedělník (2004) a Dohnal *et al.*, (2013) se shodují, že výsledky získané pomocí ELISA metody jsou srovnatelné s chromatografií.

Pro zajímavost, existuje nový mobilní systém ELISA (MELISA). Jedná se o zařízení založené na mobilním telefonu, které zjednodušuje a snižuje náklady současných postupů ELISA, a je např. schopné změřit koncentraci progesteronu ve vzorcích krve (Zhdanov *et al.*, 2018). Další novinkou je jednoduché, cenově výhodné a citlivé zařízení na bázi mikrofluidního papíru v kombinaci s testem ELISA. Tato metoda slouží pro kolorimetrickou detekci klenbuterolu (nelegálně využíván jako růstový promotor) ve vodě a v mléce. Jedná se o alternativu mikrotitrační destičky ELISA s 96 jamkami. Výhodou je celková doba trvání testu (přibližně 1 hodina), dále je snížen objem potřebných činidel a celkově se tak snižují náklady. Tato metoda má potenciál být používána v mlékárenském průmyslu jako rychlá detekční technika pro předběžný screening různých chemických rizik (Ma *et al.*, 2018).

4.1 Základní složky ELISA testů

4.1.1 Antigen

Jedná se o makromolekuly jak přirozeného, tak syntetického původu. Mají dvě základní vlastnosti a to, že navozují specifickou imunitní odpověď a specificky reagují s produkty této odpovědi, tedy protilátkami. Na povrchu molekuly antigenu

se nacházejí epitopy, což je skupina atomů, která má schopnost reagovat s vazebným místem protilátky (Janatková, 2014).

4.1.2 Protilátka

Proteiny, které jsou produkované bílými krvinkami obratlovců jako reakce při vniknutí chemické sloučeniny či napadení mikroorganismem se nazývají protilátky (Stejskal *et al.*, 2008). Můžeme je rozdělit na monoklonální, které jsou namířené pouze proti jednomu epitopu daného antigenu a jsou charakteristické výraznou specifitou. Druhý typ jsou protilátky polyklonální, které jsou namířené proti více epitopům antigenu (Janatková, 2014). Tyto protilátky naopak snižují specifčnost stanovení a také vyžadují promývací kroky (Cibiček *et al.*, 2014).

4.1.3 Konjugát

Sekundární protilátka, na kterou je navázán enzym. Reaguje s primární protilátkou. Primární protilátka se vůči sekundární protilátce chová jako antigen (Habuštová *et al.*, 2011).

4.1.4 Substrát

Chemická sloučenina, která reaguje s enzymem za vzniku barevného komplexu (Habuštová *et al.*, 2011). Výsledný komplex je poté měřen pomocí spektrofotometru, při čemž platí, že absorbance je přímo úměrná koncentraci výsledného produktu (Laciaková *et al.*, 2011).

4.2 Přímé a nepřímé imunochemické metody

Dle jedné definice se metody dělí na přímé a nepřímé podle přítomnosti makromolekulárního nosiče. Pokud je nosič přirozeně přítomen v analyzovaném vzorku jedná se o metody přímé. Pokud se však nosič ve vzorku nevyskytuje a musí být přidán do reakční směsi uměle, jedná se i nepřímou metodu. Jiná definice pohlíží na přímé a nepřímé metody odlišně. V tomto případě se jedná o přímou metodu, pokud se konjugát váže přímo na detekovaný antigen, který je součástí pevné fáze, přesněji je na ni fixován. U nepřímé metody se nejdříve na antigen váže primární stanovovaná neznačená protilátka a následně dochází k vazbě konjugátu na tuto protilátku (Cibiček *et al.*, 2014).

4.3 Kompetitivní ELISA

Pokud je značenou komponentou antigen jedná se o kompetitivní ELISA metodu (Laciaková *et al.*, 2011). Využívá se jen jedna protilátka, která je přítomna pouze v omezeném množství (Habuštová *et al.*, 2011). Provádí se v nadbytku antigenu. K séru, které obsahuje neznámé množství antigenu, se přimíchá známé množství stejného antigenu označeného enzymem tzv. konjugát. Na pevné fázi je navázáno jen omezené množství specifických protilátek, o jejichž vazebná místa soutěží antigen a konjugát (Janatková, 2014). Měří se poté množství navázaného značeného antigenu popř. množství komplexu antigen s protilátkou (Laciaková *et al.*, 2011). Kompetitivní ELISA metoda se využívá pro detekci reziduí mykotoxinů či pesticidů a dalších látek (Stejskal *et al.*, 2008).

4.4 Nekompetitivní ELISA

Též nazývaná sendvičová metoda (Janatková, 2014). Pokud je značenou komponentou protilátka jedná se o metodu nekompetitivní (Laciaková *et al.*, 2011). Podmínkou je přítomnost alespoň dvou vazebných míst na antigenu. Antigen je zachycován mezi dvě protilátky a vytvoří tak „sedvič“. Na imobilizované protilátce se zachytí antigen, po promytí se přidá druhá značená protilátka. Dalším promytím se pak odstraní nenavázané značené protilátky (Stejskal *et al.*, 2008). Měří se množství navázané značené protilátky (Laciaková *et al.*, 2011).

5 Odběr vzorků

Dle metodických pokynů pro ekologické zemědělství jsou odběr vzorků a jejich analýza na možnou přítomnost účinných látek nepovolených v ekologické produkci ustanoveny dle Nařízení Komise (EU) č. 392/2013 (ES). *„Odběry vzorků musí probíhat podle ustálené metodiky a způsobem, který nezavdá příčinu k pochybnosti o obhajitelnosti kvality a průkaznosti odebraných vzorků v případném správním řízení.“*

Definice pojmů dle vyhlášky č. 415/2009 Sb., resp. směrnice Komise č. 2002/63/ES:

- Dílčí vzorek – množství odebrané z jednoho náhodně vybraného místa v partii.

- Souhrnný vzorek – celek vzniklý sloučením a pečlivým promísením dostatečně velkých dílčích vzorků odebraných z partie.
- Laboratorní vzorek – reprezentativní množství materiálu odebrané ze souhrnného vzorku a zasláné do laboratoře, případně souhrnný vzorek nebo jeho část.

Nehomogenní distribuce mykotoxinů ve vzorcích primárně kontaminovaných je velmi dobře známou skutečností. Heterogenita úrovně kontaminace surovin, např. cereálií vyžaduje specifický vzorkovací plán (Ruprich, 1997). Princip vzorkování byl založen na obecném rozdělení chyb testovací procedury na 3 části: celková chyba analýzy: chyba vzorkování, chyba subvzorkování a chyba analytická. Hlavní položkou ve variabilitě výsledků je chyba vzorkování (až 91 %), chyba subvzorkování a analytická jsou podstatně nižší (Whitaker & Whitten, 1977).

Ideální by bylo zanalyzovat celou šarži obilí, což v praxi není realizovatelné a nelze. Vztah mezi hygienickou přijatelností vyšetřované šarže zboží a hygienickým limitem koncentrace mykotoxinů se nazývá tzv. operační charakteristika, která se stanovuje na základě výsledků analýz. Z toho následně plynou dvě možná rizika chyb: podnikatelské riziko, kdy hodnota koncentrace mykotoxinů nepřekračuje stanovený hygienický limit a šarže chybně nebude akceptována a konzumentské riziko, při kterém dochází k překročení hygienických limitů stanovených pro mykotoxiny, avšak šarže bude chybně akceptována. Zvyšování hmotnosti analyzovaného vzorku omezuje riziko obou chyb. Snižování hmotnosti vzorku, který reprezentuje šarži, vede zákonitě ke zvýšení rizika chybné akceptace šarže, protože mykotoxin není zpravidla homogenně distribuován (Ruprich, 1997).

Velikost vzorku u hrubozrnných materiálů s nehomogenní distribucí silně ovlivňuje výsledek rozhodnutí o akceptaci. Proto celý velký odebraný vzorek musí být kompletně zhomogenizován a pak může být provedeno subvzorkování a analýza. Velikost subvzorku k analýze je obvykle redukována na hmotnost 20 - 100 g. Z každé šarže nepřesahující 50 tun by se vzorek měl skládat ze 100 subvzorků na každých 20 tun šarže (Ruprich, 1997).

Odběr vzorků pro tento výzkum byl uskutečněn od půlky srpna roku 2017 a probíhal do začátku června roku 2018 po celé České Republice. Firma (anonymní

z důvodu ochrany spotřebitele) odebírá vzorky rostlinného původu celkem od 108 ekozemědělců. Vzorky žita a pšenice potřebné pro výzkum byly odebrány zhruba od 27 ekozemědělců, přičemž ne všechny vzorky se dostaly až do konečné fáze zpracování. Celkem bylo zhodnoceno 135 vzorků, z toho 45 při sklizni, 45 během skladování a 45 z hotových výrobků. Odběr vzorků probíhal dle metodického pokynu pro ekologické zemědělství č. 3/2013. Při příjmu surovin ve firmě se odebralo 3 – 5 kg daného vzorku, následoval postup pro přípravu laboratorního vzorku, jehož výsledkem byl vzorek o hmotnosti cca 0,5 – 1 kg, který byl pak přepraven do laboratoře. Následovala homogenizace – umletí vzorku pomocí laboratorního mlýnku a důkladné promíchání a odběr subvzorku k analýze na základě kvartace. Pro vlastní stanovení byla využita navážka 5 g vzorku. Kromě jiného se v laboratoři provádí také mikrobiologické testy všech vzorků. Pro ověřování kvality práce v laboratoři se využívá kruhový test.

6 Metodika stanovení obsahu mykotoxinů

Jak je popsáno v kapitole 4, byla využita enzymová imunoanalýza na pevné fázi (kompetitivní ELISA), jejímž principem je reakce antigenu s protilátkou. V případě mykotoxinu přítomného ve vzorku či standardu se jedná o kompetici mezi volným a vázaným enzymem značeným mykotoxinem (antigenem) o vazebné místo na protilátce.

Stanovení proběhlo pomocí testovací sady RIDASCREEN FAST a to pro mykotoxiny: aflatoxiny, OTA a DON. Pro vyhodnocení byl použit přístroj Absorbanční reader ELx 800 Bio Tek. Měření absorbance probíhalo fotometricky při 450 nm.

5.1 Stanovení aflatoxinů

5.1.1 Princip testu

Principem je reakce antigenu a protilátky. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickými protilátkami vůči anti-aflatoxin protilátkám. Po přidání standardu nebo roztoku vzorku se přidá enzymový konjugát a anti-aflatoxin protilátky. Volný aflatoxin a aflatoxin enzymový konjugát soutěží o vazebná místa na protilátkách (kompetitivní enzymová imunoanalýza). Ve stejné době jsou anti-

aflatoxin protilátky vázané na mikrotitrační destičku. Nenavázaný enzymový konjugát se poté promýváním odstraní. Do jamek se přidá substrát/chromogen a navázaný enzymový konjugát změní chromogen na modrý produkt. Přidání zastavovacího roztoku způsobí změnu barvy z modré na žlutou. Měření probíhá fotometricky při 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci aflatoxinu ve vzorku.

5.1.2 Dodávaná činidla

Každá testovací sada RIDASCREEN FAST Aflatoxin SC obsahuje materiál postačující na 47 měření (plus 1 standard). Sada se musí skladovat při 2 – 8°C. Sada obsahuje:

- 1x mikrotitrační destičku s 48 jamkami pokrytá protilátkami vůči anti-aflatoxin protilátkám
- 1x aflatoxin standard, 1,3 ml – 0 ppm metanol/voda, připravené na použití
- 1x konjugát, 3 ml (červený uzávěr) – peroxidázový konjugát aflatoxinu, připravené na použití
- 1x anti-aflatoxin protilátky, 3 ml (černý uzávěr) – připravené na použití
- 1x substrát/chromogen, 10 ml (hnědý uzávěr)
- 1x zastavovací roztok, 14 ml (žlutý uzávěr) – obsahuje 1M kyselinu sírovou
- 1x promývací roztok (sůl) na přípravu 10 mM fosfátového pufru

5.1.3 Další potřebný materiál

Přístroje: mlýnek, centrifuga, fotometr (ELISA reader), stopky.

Laboratorní pomůcky: základní laboratorní sklo, mikropipety 100 µl a 1000 µl, jednorázové pipety, absorpční papír.

Všechny zde zmiňované přístroje a laboratorní pomůcky, které byly použity pro stanovení aflatoxinů, byly rovněž využity i pro stanovení mykotoxinů OTA a DON.

Chemikálie a použité roztoky: 70% metanol (70 ml metanolu (100%) + 30 ml destilované vody), destilovaná voda, promývací pufr (sůl dodaná v sadě se rozpustila ve 100 ml destilované vody a následně se ředila 10x).

Před zahájením zkoušky je nutné vytáhnout chemikálie z chladničky a nechat je temperovat na pokojovou teplotu 20 – 25°C.

5.1.4 Příprava vzorku

Do nádoby bylo naváženo 5 g rozemletého vzorku (v tomto případě pšenice či žita), následně se přidalo 25 ml 70% metanolu. Vzorek se důkladně promíchal ručně po dobu 3 minut. Poté byl přelit do centrifugální kyvety a nechal se centrifugovat při 4000 otáčkách 2 minuty. Po centrifugaci se odebralo 1 ml supernatantu do zkumavky, do které se přidal 1 ml destilované vody. Z takto vzniklého roztoku se následně použilo 50 μ l na jamku.

5.1.5 Provedení testu

Bylo nachystáno potřebné množství jamek na vzorky a standardy. Jamky byly vloženy do mikrotitračního držáku. Označila se pozice standardu a vzorků. Posléze bylo napipetováno 50 μ l standardu nebo připraveného roztoku do jednotlivých jamek (vždy se použila nová špička pipety pro každý standard či vzorek). Do každé jamky bylo přidáno 50 μ l enzymového konjugátu a 50 μ l roztoku anti-aflatoxin protilátek. Jemně se promíchalo manuálním potřesením destičky a nechalo se inkubovat 10 minut (+/- 1 minuta) při pokojové teplotě (20 – 25°C). Po inkubaci byla tekutina z jamek vylita a držák s jamkami otočený vrchní stranou dolů, byl prudce a důkladně vyklepán na absorpční papír (3x za sebou), aby se odstranila zbytková tekutina z jamek. Následně byly všechny jamky naplněny promývacím pufrem. Jamky se opět vyprázdnily a vyklepaly. Promývání bylo opakováno ještě minimálně dvakrát. Po promytí se přidalo do každé jamky 100 μ l substrátu/chromogenu. S destičkou se manuálně promíchalo a nechalo se inkubovat ve tmě 5 minut (+/- 0,5 minuty) při pokojové teplotě. Po 5 minutách se přidalo 100 μ l zastavovacího roztoku, opět se jemně promíchalo. Následně už byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Výsledky se musely odečíst do 10 minut od přidání zastavovacího roztoku.

5.1.6 Vyhodnocení testu

Hodnota výsledku byla odečtena dle zabarvení kalibrátorů. K výpočtu kalibrační křivky a množství mykotoxinu ve vzorcích byl využit softwarový program RIDA SOFT Win. Průběh kalibrační křivky je znázorněný v certifikátu kvality (přiložený v každé testovací sadě). Po zapnutí spektrofotometru se následně pracovalo na počítači ve zmíněném programu. Do pravé části tabulky byly zadány standardy vzestupně od č. 7 do č. 2 uvedené v certifikátu kvality a počet vzorků do levé části

tabulky od č. 1 dle umístění a počtu na destičce. Potvrdilo se a přístroj začal měřit. Před samotným vyhodnocením bylo nutné znovu zadat hodnoty standardů. Následně už byla vypočítána kalibrační křivka. Nakonec byly popsány jednotlivé vzorky a celý protokol byl vytisknut.

5.2 Stanovení ochratoxinu A

5.2.1 Princip testu

Principem je reakce antigenu a protilátky. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickými protilátkami vůči anti-OTA protilátkám. Po přidání standardu nebo roztoku vzorku se přidá enzymový konjugát a anti-OTA protilátky. Volný OTA a OTA enzymový konjugát soutěží o vazebná místa na protilátkách (kompetitivní enzymová imunoanalýza). Ve stejné době jsou anti-OTA protilátky vázané na mikrotitrační destičku. Nenavázaný enzymový konjugát se poté promýváním odstraní. Do jamek se přidá substrát/chromogen a navázaný enzymový konjugát změni chromogen na modrý produkt. Přidání zastavovacího roztoku způsobí změnu barvy z modré na žlutou. Měření probíhá fotometricky při 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci OTA ve vzorku.

5.2.2 Dodávaná činidla

Každá testovací sada RIDASCREEN FAST OTA obsahuje materiál postačující na 43 měření (včetně 5 standardů). Sada se musí skladovat při 2 – 8°C. Sada obsahuje:

- 1x mikrotitrační destičku s 48 jamkami pokrytá protilátkami
- 5x OTA standardů, 1,3 ml – 0 ppm, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb OTA v metanol/voda, připravené na použití
- 1x konjugát, 3 ml (červený uzávěr) – peroxidázový konjugát OTA, připravené na použití
- 1x anti-OTA protilátky, 3 ml (černý uzávěr) – připravené na použití
- 1x substrát/chromogen, 10 ml (hnědý uzávěr)
- 1x zastavovací roztok, 14 ml (žlutý uzávěr) – obsahuje 1M kyselinu sírovou

5.2.3 Další potřebný materiál

Chemikálie a použité roztoky: 70% metanol (70 ml metanolu (100%) + 30 ml destilované vody), destilovaná voda.

Před zahájením zkoušky je nutné vytáhnout chemikálie z chladničky a nechat je temperovat na pokojovou teplotu 20 – 25°C.

5.2.4 Příprava vzorku

Do nádobky bylo naváženo 5 g rozemletého vzorku (v tomto případě pšenice či žita), následně se přidalo 12,5 ml 70% metanolu. Vzorek se důkladně promíchal ručně po dobu 3 minut. Poté byl přelit do centrifugální kyvety a nechal se centrifugovat při 4000 otáčkách 2 minuty. Po centrifugaci se odebralo 1 ml supernatantu do zkumavky, do které se přidal 1 ml destilované vody. Z takto vzniklého roztoku se následně použilo 50 µl na jamku.

5.2.5 Provedení testu

Bylo nachystáno potřebné množství jamek na vzorky a standardy. Jamky byly vloženy do mikrotitračního držáku. Označila se pozice standardů a vzorků. Posléze bylo napipetováno 50 µl standartu nebo připraveného roztoku do jednotlivých jamek (vždy se použila nová špička pipety pro každý standard či vzorek). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl enzymového konjugátu a 50 µl roztoku anti-OTA protilátek. Jemně se promíchalo manuálním potřesením destičky a nechalo se inkubovat 10 minut (+/- 1 minuta) při pokojové teplotě (20 – 25°C). Po inkubaci byla tekutina z jamek vylita a držák s jamkami otočený vrchní stranou dolů, byl prudce a důkladně vyklepán na absorpční papír (3x za sebou), aby se odstranila zbytková tekutina z jamek. Následně byly všechny jamky naplněny destilovanou vodou. Jamky se opět vyprázdnily a vyklepaly. Promývání bylo opakováno ještě minimálně dvakrát. Po promytí se přidalo do každé jamky 100 µl substrátu/chromogenu. S destičkou se manuálně promíchalo a nechalo se inkubovat ve tmě 5 minut (+/- 0,5 minuty) při pokojové teplotě. Po 5 minutách se přidalo 100 µl zastavovacího roztoku, opět se jemně promíchalo. Následně už byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Výsledky se musely odečíst do 10 minut od přidání zastavovacího roztoku.

5.2.6 Vyhodnocení testu

Hodnota výsledku byla odečtena dle zabarvení kalibrátorů. K výpočtu kalibrační křivky a množství mykotoxinu ve vzorcích byl využit softwarový program RIDA SOFT Win. Průběh kalibrační křivky je znázorněn v certifikátu kvality (přiložený v každé testovací sadě). Po zapnutí spektrofotometru se následně pracovalo na

počítači ve zmíněném programu. Do tabulky byl zadán počet vzorků od č. 1 dle umístění a počtu na destičce. Potvrdilo se a přístroj začal měřit. Zde se hodnoty standardů zadávat nemusely, z toho důvodu, že se už od začátku pracuje s 5 standardy. Následně už byla vypočítána kalibrační křivka. Nakonec byly popsány jednotlivé vzorky a celý protokol byl vytisknut

5.3 Stanovení deoxynivalnolu

5.3.1 Princip testu

Principem je reakce antigenu a protilátky. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickými protilátkami vůči anti-DON protilátkám. Po přidání standardu nebo roztoku vzorku se přidá enzymový konjugát a anti-DON protilátky. Volný DON a DON enzymový konjugát soutěží o vazebná místa na protilátkách (kompetitivní enzymová imunoanalýza). Ve stejné době jsou anti-DON protilátky vázané na mikrotitrační destičku. Nenavázaný enzymový konjugát se poté promýváním odstraní. Do jamek se přidá substrát/chromogen a navázaný enzymový konjugát změní chromogen na modrý produkt. Přidání zastavovacího roztoku způsobí změnu barvy z modré na žlutou. Měření probíhá fotometricky při 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci DON ve vzorku.

5.3.2 Dodávaná činidla

Každá testovací sada RIDASCREEN FAST DON SC obsahuje materiál postačující na 47 měření (plus 1 standard). Sada se musí skladovat při 2 – 8°C. Sada obsahuje:

- 1x mikrotitrační destičku s 48 jamkami pokrytá protilátkami vůči anti-DON protilátkám
- 1x DON standard, 1,3 ml – 0 ppm ve vodě, připravené na použití
- 1x konjugát, 3 ml (červený uzávěr) – peroxidázový konjugát DONu, připravené na použití
- 1x anti-DON protilátky, 3 ml (černý uzávěr) – připravené na použití
- 1x substrát/chromogen, 10 ml (hnědý uzávěr)
- 1x zastavovací roztok, 14 ml (žlutý uzávěr) – obsahuje 1M kyselinu sírovou
- 1x promývací roztok (sůl) na přípravu 10 mM fosfátového pufru

5.3.3 Další potřebný materiál

Chemikálie a použité roztoky: destilovaná voda, promývací pufr (sůl dodaná v sadě se rozpustila ve 100 ml destilované vody a následně se ředila 10x).

Před zahájením zkoušky je nutné vytáhnout chemikálie z chladničky a nechat je temperovat na pokojovou teplotu 20 – 25°C.

5.3.4 Příprava vzorku

Do nádoby bylo naváženo 5 g rozemletého vzorku (v tomto případě pšenice či žita), následně se přidalo 100 ml destilované vody. Vzorek se důkladně promíchal ručně po dobu 3 minut. Poté byl přelit do centrifugální kyvety a nechal se centrifugovat při 4000 otáčkách 2 minuty. Po centrifugaci se odebralo 1 ml supernatantu do zkumavky, do které se přidal 1 ml destilované vody. Z takto vzniklého roztoku se následně použilo 50 µl na jamku.

5.3.5 Provedení testu

Bylo nachystáno potřebné množství jamek na vzorky a standardy. Jamky byly vloženy do mikrotitračního držáku. Označila se pozice standardu a vzorků. Posléze bylo napipetováno 50 µl standartu nebo připraveného roztoku do jednotlivých jamek (vždy se použila nová špička pipety pro každý standard či vzorek). Do každé jamky bylo přidáno 50 µl enzymového konjugátu a 50 µl roztoku anti-DON protilátek. Jemně se promíchalo manuálním potřesením destičky a nechalo se inkubovat 5 minut (+/- 1 minuta) při pokojové teplotě (20 – 25°C). Po inkubaci byla tekutina z jamek vylita a držák s jamkami otočený vrchní stranou dolů, byl prudce a důkladně vyklepán na absorpční papír (3x za sebou), aby se odstranila zbytková tekutina z jamek. Následně byly všechny jamky naplněny promývacím pufrem. Jamky se opět vyprázdnily a vyklepaly. Promývání bylo opakováno ještě minimálně dvakrát. Po promytí se přidalo do každé jamky 100 µl substrátu/chromogenu. S destičkou se manuálně promíchalo a nechalo se inkubovat ve tmě 3 minuty (+/- 0,5 minuty) při pokojové teplotě. Po 3 minutách se přidalo 100 µl zastavovacího roztoku, opět se jemně promíchalo. Následně už byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Výsledky se musely odečíst do 10 minut od přidání zastavovacího roztoku.

5.3.6 Vyhodnocení testu

Hodnota výsledku byla odečtena dle zabarvení kalibrátorů. K výpočtu kalibrační křivky a množství mykotoxinu ve vzorcích byl využit softwarový program RIDA SOFT Win. Průběh kalibrační křivky je znázorněn v certifikátu kvality (přiložený v každé testovací sadě). Po zapnutí spektrofotometru se následně pracovalo na počítači ve zmíněném programu. Do pravé části tabulky byly vzestupně zadány standardy uvedené v certifikátu kvality a počet vzorků do levé části tabulky od č. 1 dle umístění a počtu na destičce. Potvrdilo se a přístroj začal měřit. Před samotným vyhodnocením bylo nutné znovu zadat hodnoty standardů. Následně už byla vypočítána kalibrační křivka. Nakonec byly popsány jednotlivé vzorky a celý protokol byl vytisknut.

7 Výsledky

Celkově bylo pro všechny zkoumané mykotoxiny zhodnoceno 10 vzorků pšenice seté a 5 vzorků žita setého ve třech stupních stanovení od doby sklizně po výrobu.

7.1 Výsledky stanovení aflatoxinů

Pšenice, Aflatoxiny			
Naměřené hodnoty obsahu aflatoxinů (µg/kg)			
Číslo vzorku	vzorky z pole	vzorky ze skladu	vzorky z výroby
1	< LOD	< LOD	< LOD
2	< LOD	< LOD	< LOD
3	< LOD	< LOD	< LOD
4	3,04	< LOD	< LOD
5	2,22	2,41	< LOD
6	3,04	< LOD	< LOD
7	< LOD	< LOD	< LOD
8	2,33	< LOD	< LOD
9	2,33	< LOD	< LOD
10	< LOD	< LOD	< LOD

Tabulka č. 1 – výsledky stanovení aflatoxinů v pšenici

Dle výrobce: u ELISA je LOD = 2,00 µg/kg (Derzsi, 2018)

Žito, Aflatoxiny			
Číslo vzorku	Naměřené hodnoty obsahu aflatoxinů (μg/kg)		
	vzorky z pole	vzorky ze skladu	vzorky z výroby
1	< LOD	< LOD	< LOD
2	< LOD	< LOD	< LOD
3	< LOD	< LOD	< LOD
4	< LOD	< LOD	< LOD
5	< LOD	< LOD	< LOD

Tabulka č. 2 – výsledky stanovení aflatoxinů v žitě

Dle výrobce: u ELISA je LOD = 2,00 μg/kg (Derzsi, 2018)

Zjišťovala se zde suma aflatoxinů, pro kterou je maximální přípustné množství 4 μg/kg. Žádný ze vzorků nepřesáhl toto maximální přípustné množství. Mez detekce byla stanovena na hodnotu 2 μg/kg. Téměř všechny vzorky pšenice a všechny vzorky žita se nacházely pod mezí detekce. Zvýšené množství aflatoxinů lze vidět už v prvních fázi na poli zejména pak u pšenice, což značí fakt, že se nejedná pouze o skladištní mykotoxin.

7.2 Výsledky stanovení OTA

Pšenice, OTA			
Číslo vzorku	Naměřené hodnoty obsahu OTA (μg/kg)		
	vzorky z pole	vzorky ze skladu	vzorky z výroby
1	< LOD	< LOD	< LOD
2	< LOD	< LOD	< LOD
3	< LOD	< LOD	< LOD
4	< LOD	< LOD	< LOD
5	< LOD	< LOD	< LOD
6	< LOD	< LOD	< LOD
7	< LOD	< LOD	< LOD
8	< LOD	2,5	< LOD

9	< LOD	2,5	< LOD
10	< LOD	< LOD	< LOD

Tabulka č. 3 – výsledky stanovení OTA v pšenici

Dle výrobce: u ELISA je LOD = 5,00 µg/kg; pro vzorky č. 8, 9 a 10 ve druhé a třetí fázi platí LOD 2,5 µg/kg (Derzsi, 2018)

Žito, OTA			
Číslo vzorku	Naměřené hodnoty obsahu OTA (µg/kg)		
	vzorky z pole	vzorky ze skladu	vzorky z výroby
1	< LOD	< LOD	< LOD
2	< LOD	< LOD	< LOD
3	< LOD	< LOD	< LOD
4	< LOD	< LOD	2,93
5	< LOD	< LOD	< LOD

Tabulka č. 4 – výsledky stanovení OTA v žitě

Dle výrobce: u ELISA je LOD = 5,00 µg/kg; pro vzorek č. 4 ve druhé a třetí fázi platí LOD 2,5 µg/kg (Derzsi, 2018)

Mez detekce byla stanovena na hodnotu 5,00 µg/kg, což je zároveň i maximální přípustný limit pro nezpracované obilniny. Pro produkty, které jsou určeny k přímé spotřebě je maximální limit 3 µg/kg.

Z tabulek lze vidět, že se OTA nachází ve všech třech fázích od sklizně po výrobu. Jedná se tedy o rozšířený mykotoxin, který se i spolu s aflatoxiny šíří už během růstu rostlin na poli, ne jen v podmínkách skladování.

7.3 Výsledky stanovení DON

Pšenice, DON			
Číslo vzorku	Naměřené hodnoty obsahu DON (mg/kg)		
	vzorky z pole	vzorky ze skladu	vzorky z výroby
1	< LOD	< LOD	< LOD

2	< LOD	< LOD	< LOD
3	< LOD	< LOD	< LOD
4	< LOD	< LOD	< LOD
5	< LOD	< LOD	< LOD
6	< LOD	< LOD	< LOD
7	< LOD	< LOD	< LOD
8	< LOD	< LOD	< LOD
9	< LOD	< LOD	< LOD
10	< LOD	< LOD	< LOD

Tabulka č. 5 – výsledky stanovení DONu v pšenici

Dle výrobce: u ELISA je LOD = 0,074 mg/kg (Derzsi, 2018)

Žito, DON			
Číslo vzorku	Naměřené hodnoty obsahu DON (mg/kg)		
	vzorky z pole	vzorky ze skladu	vzorky z výroby
1	< LOD	< LOD	0,483
2	< LOD	< LOD	< LOD
3	< LOD	< LOD	< LOD
4	< LOD	< LOD	< LOD
5	< LOD	< LOD	< LOD

Tabulka č. 6 – výsledky stanovení DONu v žitě

Dle výrobce: u ELISA je LOD = 0,074 mg/kg (Derzsi, 2018)

U DONu byla stanovena mez detekce na 0,074 mg/kg, což je v přepočtu 74 µg/kg, přičemž maximální přípustná limitní koncentrace činí 750 µg/kg, v pečivu a ve snídaňových cereáliích limit činí 500 µg/kg. Z tabulky lze vidět, že ačkoliv je DON udáván spíše jako polní mykotoxin, vyskytoval se ve všech fázích stanovení.

Při stanovení DONu se ve třetí fázi u žita ve vzorku č. 1 vyšší koncentrace. Hodnota DONu však nepřesáhla koncentraci 500 µg/kg.

8 Diskuze

Celá praktická část byla prováděna v této nejmenované firmě od půlky srpna roku 2017 do začátku června roku 2018. Zjišťovalo se množství mykotoxinů v obilovinách metodou ELISA pomocí testovací sady RIDASCREEN FAST ve třech fázích a to při sklizni obilnin z pole. Dále po určité době skladování, která nebyla pevně stanovena. Doba skladování obilnin se pohybovala zhruba v rozmezí od 3 měsíců do půl roku. Obilniny byly skladovány většinou u zemědělců, u kterých byly obilniny zároveň pěstovány. Poslední fáze zpracování probíhala přímo ve firmě (nachází se zde dva mlýny), ve které byl prováděn výzkum. Jako vzorky pro stanovení mykotoxinů už tedy nesloužila zrna obilnin, jak tomu bylo v předchozích dvou fázích, ale přímo hotový výrobek (příprava vzorku byla usnadněna, protože se vzorek nemusel mlet). V tomto smyslu se dala použít pouze pšeničná či žitná mouka. Doba mezi druhou a třetí fází byla též variabilní. Pouze několikrát se stalo, že byly stanovovány mykotoxiny, jak pro druhou tak i třetí fázi v jednom dni. Bylo to však dáno i mou nepravidelnou docházkou do firmy (většinou v pátek). Přičemž pokud bylo málo vzorků (např. dva), stanovení se odložilo na dobu, kdy bylo vzorků více kvůli finanční náročnosti.

Celkového množství stanovovaných vzorků bylo poměrně mnoho, ale do všech tří fází se dostalo pouze 10 vzorků pšenice a 5 vzorků žita. U žita bylo v první fázi na 28 vzorků, u některých z nich se stanovila i druhá fáze, avšak na třetí fázi se už nedostalo. Bylo to způsobeno zejména tím, že se pro výrobu odebraly jen některé vzorky žita, ovšem ve velkém množství, proto nebylo potřeba zpracovávat na výrobky jiné vzorky žit. U pšenice bylo v první fázi 23 vzorků, z nichž do konečné fáze dospělo zmiňovaných 10 vzorků. Celkově pro tuto práci bylo zpracováno pro každý mykotoxin ve všech fázích pro dvě obilniny 135 vzorků.

Pokud se týká aflatoxinů, ve všech fázích stanovení se nacházejí pozitivní vzorky. Lze však vidět, že poměrně hodně pozitivních vzorků, a to i nad mezí detekce, se nacházelo dokonce už i v první fázi – tj. v polních podmínkách, což může představovat změnu dřívějšího tvrzení a znalostech, že v podmínkách ČR se v případě aflatoxinů jedná pouze o skladištní mykotoxiny. Nicméně nelze dělat unáhlené jednoznačné závěry, na základě dosud námi provedených analýz – a to, že v případě aflatoxinů se jedná o mykotoxiny produkované již na poli. Toto by

mělo být během určitého časového období potvrzeno/konfirmováno – a to i s pomocí daleko citlivějších analytických metod. Uvedený posun v těchto závěrech by mohl velmi pravděpodobně souviset s globálním oteplováním, které je v současné době velmi diskutovaným tématem. V důsledku změn klimatu se změnila také ekologie toxigenních VMH rodu *Aspergillus* produkujícího aflatoxiny (Ostrý *et al.*, 2016a). Nejedná se však pouze o tento rod VMH, ale i o další rody např. *Penicillium* či *Fusarium*. Změny klimatu by proto měly představovat apel pro odborníky v oblasti bezpečnosti potravin.

Pokud se podíváme na OTA, opět se ve všech fázích stanovení nacházejí pozitivní vzorky. OTA je opět považován za skladištní mykotoxin, nicméně i zde globální oteplování může sehrát svoji negativní roli, i když se OTA na rozdíl od aflatoxinů nachází v polních podmínkách daleko v menší míře. OTA se nacházel v žitě i v pšenici, v menším množství, což je v souladu s tvrzením Frisvada (2004), že výskyt OTA byl zjištěn spíše v rýži, na rozdíl od ne tak častého výskytu v pšenici či kukuřici.

Údajně hlavní komodity, kde se *Aspergillus ochraceus* vyskytuje a produkuje OTA, jsou právě skladovaná zrna (Creppy, 2002). Stejný autor upozorňuje, jak se vyhnout houbovému napadení zrn, jsou např. rychlé a důkladné sušení, snížení obsahu vlhkosti v zrnech tak, aby byla aktivita vody menší než 0,8. Jako další účinné postupy jsou předkládány provzdušňování, chlazení a fumigace (Creppy, 2002).

V případě DONu lze vidět jeho výskyt opět ve všech fázích, i přesto, že je DON uváděn spíše jako polní mykotoxin. U jednoho vzorku ve třetí fázi v žitě byl DON dokonce ve velmi vysoké koncentraci, což mohlo být způsobeno špatným zacházením s vyrobeným produktem. V práci Placinta *et al.* (1999) se dospělo k závěru, že existují jednoznačné důkazy o globální kontaminaci obilných zrn a krmiv mykotoxiny rodu *Fusarium*, zejména pak trichoteceny, zearalenonem a fumonisiny. VMH rodu *Fusarium* jsou pravděpodobně nejvíce převládající a produkující toxiny v severních mírných oblastech Ameriky, Evropy a Asie, které se běžně vyskytují u pěstovaných obilnin (Creppy, 2002). Z tohoto důvodu by se měla provádět dekontaminace. Mezi metody používané k dekontaminaci obilnin obsahující trichoteceny, jako je např. DON, patří různé formy tepelného zpracování

(pražení, pečení – při pečení pšeničných výrobků se ztráty DON pohybovaly v rozmezí 15 – 65%, což je trochu překvapivé, protože je známo, že DON patří mezi velmi termostabilní mykotoxiny), mechanické odstraňování napadených částic (Radová-Sypecká & Hajšlová, 2003). Způsobem detoxikace je i mletí, zde však záleží na stupni kontaminace endospermu. Při nízké kontaminaci lze obsah DON v pšeničné mouce snížit až o 30 – 80% (Radová-Sypecká & Hajšlová, 2003).

Je známo, že jsou pro detekci DON dobrými prostředky tenkovrstvá chromatografie a metoda ELISA. Creppy (2002) uvádí studii, ve které bylo mnoho akutních onemocnění lidí v Asii způsobeno kontaminací zrn DON při hlášené koncentraci 3 – 93 mg/kg v obilí pro lidskou spotřebu. Dále také uvádí, že v jiných dvou studiích nebyly způsobeny žádné účinky na zdraví lidí po konzumaci zrn obsahující DON při 0,02 – 3,5 mg/kg. A konečně zjištění, že je DON velmi častým kontaminantem velkého počtu vzorků obilných zrn, např. u pšenice 57% vzorků pozitivních, je v souladu s naší studií a v ní zjištěnými výsledky. Dále uvádí, že průměrné koncentrace v datových sadách, ve kterých byl nalezen DON, dosahovaly hodnot u pšenice 1 – 5 700 µg/kg a u žita 13 – 240 µg/kg (Creppy, 2002).

Od roku 2000 do roku 2002 probíhal v ČR projekt, ve kterém se zjišťovalo, jaké hladiny DONu se nacházejí ve vzorcích pšenice, ječmene a žita české provenience. Byly využity mykologické rozbory a množství DONu se zjišťovalo pomocí ELISA testu. Ze sklizně roku 2000 bylo analyzováno 56 vzorků pšenice s průměrným obsahem DONu 0,135 ppm, dále 33 vzorků ječmene s průměrným obsahem DONu 0,22 ppm a 22 vzorků žita s průměrným obsahem DONu 0,136 ppm. Ze sklizně roku 2001 bylo analyzováno 55 vzorků pšenice s průměrným obsahem DONu 0,177 ppm, přičemž byla překročena limitní hodnota u jednoho vzorku, dále 32 vzorků ječmene s průměrným obsahem DONu 0,283 ppm a 15 vzorků žita s průměrným obsahem DONu 0,124 ppm. V posledním roce se počet vzorků u pšenice zvýšil na 95, přičemž průměrný obsah DONu činil 0,142 ppm, dále 30 vzorků ječmene s průměrnou hodnotou 0,237 ppm a 32 vzorků žita s průměrným obsahem DONu 0,126 ppm (Sýkorová & Nedělník, 2004).

Dále bylo v práci zmíněno, že aby zemědělci mohli provozovat ekologické zemědělství, nesmějí používat fungicidy (Berek *et al.*, 2000). Mnoho lidí se tak domnívá, že rostliny jsou více napadány VMH a posléze i mykotoxiny. Ve studii

D'Mello *et al.*, (1998) je však uvedeno, že i při použití fungicidů se může zvýšit tvorba mykotoxinů (kromě jiného i v souvislosti s nedodržením doporučené příslušné koncentrace fungicidu). Pokusy byly zaměřeny zejména na VMH rodů *Aspergillus* a *Fusarium*. Poprvé zde byly předloženy důkazy, které naznačovaly, že rezistence vůči fungicidům u *F. culmorum* může být doprovázena stálějším stavem produkce mykotoxinů. Navíc houbové infekci často předchází poškození hmyzem. Proto se často používají i insekticidy, které se však vyznačují přímým účinkem na vznik mykotoxinů. Stejně tak i Sýkorová & Nedělník (2004) uvádějí, že při testování vhodnosti různých fungicidů proti *F. graminearum* bylo zjištěno, že fungicidy Juwel a Amistar mohou zvyšovat riziko větší koncentrace DONu, což bylo potvrzeno jak v polních pokusech, tak v běžných farmářských podmínkách.

Profesorka Hajšlová (VŠCHT, Praha) uvedla na semináři „Mykotoxiny a zemědělská produkce“ zajímavý fakt, že v ekologicky obhospodařovaných porostech se nachází méně mykotoxinů, než je tomu u produktů obhospodařovaných konvenčně za použití fungicidů, což vysvětlila, že používáním fungicidů jsou VMH více stresovány a díky tomu pravděpodobně vylučují více mykotoxinů (Rytina, 2013).

Na základě výzkumu v Kanadě byl stanoven model pro předpověď obsahu či koncentrace DON podle průběhu počasí, při čemž byla stanovena tři kritická období. Model velmi přesně umožňuje předpovědět očekávaný nízký a střední obsah DON a pomáhá pěstitelům s rozhodnutím, zda mají použít chemickou ochranu či nikoli (Hooker *et al.*, 2002). To, že obsah mykotoxinů v plodinách závisí také na počasí, je doloženo např. z Rakouska. Při výzkumu byl roku 1996 průměrný obsah DON 0,645 mg/kg při chladném a vlhkém létě, roku 1997 činil průměrný obsah DON 0,14 mg/kg, toho roku byl relativně deštivý červenec, zato suché a teplé září. V roce 1998 průměrný obsah DON činil 0,38 mg/kg, kdy i přes deštivý červenec, bylo vegetační období teplejší, než dlouhodobý průměr (Sýkorová & Nedělník, 2004).

Závěr

Mykotoxiny patří k nejzávažnějším přírodním kontaminantům, k jejichž expozici dochází proti vůli a zájmům člověka i zvířat. Kontaminace potravinového řetězce jsou přirozené a nepředvídatelné, často se jim nedá ani zamezit či je odstranit. Mykotoxiny se mohou nacházet v potravinách a krmivech často i ve větším množství a dochází tak mezi nimi k interakcím. Existuje synergismus, tedy souhlasné působení mykotoxinů. Výsledný toxický účinek pak může být prostou sumací (součtem) toxických účinků, daleko horší variantou je potenciace čili zesílení toxických účinků mykotoxinů. Na druhou stranu mluvíme o antagonismu, přičemž je výsledný toxický účinek menší. Mykotoxiny se často podílejí také na onemocnění rostlin, zvířat, ale i lidí. VMH se však kromě negativní produkce mykotoxinů, vyznačují i pozitivním přínosem pro lidstvo. Některé druhy našly uplatnění ve farmaceutickém (antibiotika) či potravinářském průmyslu (výroba plísňových sýrů, výroba fermentovaných potravin – chléb, mléčné a alkoholické nápoje).

Ekologické zemědělství se od počátku svého vzniku značně rozšířilo a to s cílem šetrného hospodaření na zemědělské půdě za účelem dbát na zdraví lidí a zvířat. V tradiční konvenční zemědělské výrobě šlo zejména o dosažení, co největších výnosů a to i za pomoci hnojiv a pesticidů. Postupem času se tak lidé začali obávat nadměrné chemizace a začalo se prosazovat ekologické zemědělství, které se snaží dodržovat biologickou rovnováhu v krajině. Kromě celkové ochrany krajiny a životního prostředí se ekologické zemědělství zaměřuje také na produkci biopotravin a dbá na vhodné životní podmínky hospodářských zvířat.

Pomocí metody ELISA bylo analyzováno celkem 90 vzorků pšenice seté a 45 vzorků žita setého ve třech fázích: v polních podmínkách, v době skladování a z hotového výrobku na obsah mykotoxinů aflatoxinů, DON a OTA. Z celkového počtu 135 vzorků bylo 53 vzorků negativních na mykotoxiny, což nepředstavuje ani polovinu všech vzorků. Z výsledků dokonce již dokonce vyplývá předpoklad, že bychom aflatoxiny již asi neměli posuzovat pouze jako čistě skladištní mykotoxiny, nicméně tento závěr bude ještě dále třeba potvrdit. Nejmenší počet pozitivních vzorků byl stanoven u OTA, naopak nejvíce pozitivních vzorků bylo jak u aflatoxinů, tak u DONu. V tomto případě bylo potvrzeno, že fusariové mykotoxiny

patří mezi nejvíce rozšířené mykotoxiny po celém světě. Velký vliv na rozšíření mykotoxinů má zejména globální oteplování. Z práce vyplývá, že i produkty ekologického zemědělství jsou kontaminované mykotoxiny, stejně jako produkty běžného konvenčního zemědělství. Pro přesné porovnání by však byla potřeba dalších výzkumů. Zajímavý by mohl být i průzkum z hlediska výskytu jednotlivých druhů VMH v polních podmínkách, v době skladování a ve vyrobených produktech.

Z důvodu výskytu mykotoxinů v analyzovaných vzorcích je neustále potřeba zabývat se stanovováním mykotoxinů a monitorovat je jak v surovinách, tak potravinách – a to pomocí moderních laboratorních metod a striktně respektovat příslušnou právní legislativu- s cíli: i) snížení ekonomických ztrát úrody a ii) ochrany zdraví konzumenta.

Seznam použité literatury

- [1] ABARCA, M., L., ACCENSI, F., BRAGULAT, M., R., CASTELLÁ, G., CABAÑES, F., J. 2002: *Aspergillus carbonarius* as the Main Source of Ochratoxin A Contamination in Dried Vine Fruits from the Spanish Market. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No. 3: 504–506.
- [2] Akční plán ČR pro rozvoj ekologického zemědělství v letech 2016 – 2020. Ministerstvo zemědělství, Praha, 2016, 94 s. ISBN 978-80-7434-193-9.
- [3] AKMAN, S. A., ADAMS, M., CASE, D., PARK, G., MANDERVILLE, R. A. 2012: Mutagenicity of Ochratoxin A and Its Hydroquinone Metabolite in the SupF Gene of the Mutation Reporter Plasmid Ps189. *Toxins*, 4: 267–280. ISSN 2072-6651.
- [4] BENDA, V., BABŮREK, I., ŽĎÁRSKÝ, J. 2010: *Biologie II*. Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Praha, třetí vydání, 196 s. ISBN 978-80-7080-402-5.
- [5] BERANOVÁ, M., KUBAČÁK, A. 2010: *Dějiny zemědělství v Čechách a na Moravě*. Praha: Libri, první vydání, 430 s., ISBN 978-80-7277-113-4.
- [6] BEREK, L., PETRI, I., B., MESTERHÁZY, Á., TÉREN, J., MOLNÁR, J. 2000: Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology in Vitro* 15: 25-30.
- [7] BOONEN, J., MALYSHEVA, S., V., TAEVERNIER, L., DI MAVUNGU, J., D., DE SAEGER, S., DE SPIEGELEER, B. 2012: Human skin penetration of selected model mycotoxins. *Toxicology* 301: 21–32.
- [8] CAMPAGNOLLO, F., B., GANEV, K., C., KHANEGHAH, A., M., PORTELA, J., B., CRUZ, A., G., GRANATO, D., CORASSIN, C., H., OLIVEIRA, C., A., F., SANT'ANA, A., S. 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.
- [9] Cereal rye classification, United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service [online]. [citováno 2018-04-17]. Dostupné z WWW: [WWW: https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SECE](https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SECE)

- [10] CIBIČEK, N., VACEK, J., BERÁNEK, M., DŽUBÁK, P., HEŘMANOVÁ, Z., KOSINA, P., KUBALA, M., NOVÁK, M., PAPOUŠKOVÁ, B., SROVNAL, J., VÁVROVÁ, J., VOSTÁLOVÁ, J., ZATLOUKALOVÁ, M., ŽIVNÁ, H. 2014: Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, první vydání, 159 s. ISBN 978-80-244-3951-8.
- [11] CREPPY, E., E. 2002: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19 – 28.
- [12] CROWTHER, J., R. 2009: *The ELISA Guidebook*. Humana Press, part of Springer Science+Business Media, New York, second edition, 566 s. ISBN: 978-1-60327-253-7.
- [13] DERZSI, KAROLINA, ING. 2018. Ústní sdělení. JEMO TRADING spol. s r.o.
- [14] D'MELLO, J., P., F., MACDONALD, A., M., C., POSTEL, D., DIJKSMA, W., T., P., DUJARDIN, A., PLACINTA, C., M. 1998: Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology* 104: 741–751.
- [15] DOHNAL, V., DVOŘÁK, V., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., ROUBAL, T. 2013: A comparison of ELISA and HPLC methods for determinativ of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. *Food and Chemical Toxicology* 62: 427 – 431.
- [16] DVORSKÝ, J., URBAN, J. 2014. *Základy ekologického zemědělství podle nařízení Rady (ES) č. 834/2007 a nařízení Komise (ES) č. 889/2008 s příklady*. Brno: ÚKZUS, druhé aktualizované vydání, 109 s. ISBN 978-80-7401-098-9.
- [17] FAMĚRA, O. 2016: Pšeničné bílkoviny – významná složka potravy v minulosti i v současnosti. In: *Obiloviny v lidské výživě 2016, moderní trendy v mlýnské a pekárenské výrobě*. Potravinářská komora České Republiky, Praha, první vydání, 67 s. ISBN 978-80-88019-16-9.
- [18] FRISVAD, J., C., FRANK, J., M., HOUBRAKEN, J., A., M., P., KUIJPERS, A., F., A., SAMSON, R., A. 2004: New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23–43.

- [19] GRAU, J., KREMER, B. P., MÖSELER, B. M., RAMBOLD, G., a TRIEBEL, D. 1990. Trávy. Lipnicovité, šachorovité, sítinovité a rostliny podobné travám Evropy. Gunter Steinbach. Ikar Praha, spol. s r. o., první vydání, 287 s. ISBN 80-7202-260-1.
- [20] HABUŠTOVÁ, O., SEHNAL, F., SVOBODOVÁ, Z., HUSSEIN, H., M. 2011: Optimalizace metodiky ELISA pro stanovení obsahu Cry3Bb1 toxinu v různých částech kukuřice pomocí komerčního kitu. Biologické Centrum AV ČR v.v.i, Entomologický ústav, České Budějovice, 24 s. ISBN: 978-80-86668-11-6.
- [21] HIBI, D., SUZUKI, Y., ISHII, Y., JIN, M., WATANABE, M., SUGITA-KONISHI, Y., YANAI, T., NOHMI, T., NISHIKAWA, A., UMEMURA, T. 2011: Site-Specific In Vivo Mutagenicity in the Kidney of gpt Delta Rats Given a Carcinogenic Dose of Ochratoxin A. *Toxicological Sciences*, 122(2): 406–414.
- [22] HOOKER, D., C., SCHAAFSMA, A., W., TAMBURIC-ILINCIC, L. 2002: Using weather variables pre-and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Disease* 86: 611-619
- [23] IARC (International Agency for Research on Cancer). 2012: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chemical agents and related occupations, A review of human carcinogens, Vol. 100 F. 599 s. ISBN 978 92 832 1323 9.
- [24] JANATKOVÁ, I. 2014: Imunochemické metody. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky [online]. [citováno 2018-06-20]. Dostupné z WWW: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>
- [25] JAVŮRKOVÁ, J. 2004. Stav ekologického zemědělství v 25 členských státech EU. *Agra Focus* 101: 11-14.
- [26] JI, CH., FAN, Y., ZHAO, L. 2016: Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition* 2: 127–133.
- [27] JIN, Z., ZHOU, B., GILLESPIE, J., GROSS, T., BARR, J., SIMSEK, S., BRUEGGEMAN, R., SCHWARZ, P. 2018: Production of deoxynivalenol (DON) and DON-3-glucoside during the malting of Fusarium infected hard red spring wheat. *Food Control* 85: 6-10.

- [28] KENSLER, T. W., ROEBUCK, B. D., WOGAN, G. N., GROOPMAN, J. D. 2010: Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences*, 120(S1): 28–48.
- [29] KHANEGHAH, A., M., MARTINS, L., M., VON HERTWIG, A., M., BERTOLDO, R., SANT'ANA, A., S. 2018: Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing - A review. *Trends in Food Science & Technology* 71: 13–24.
- [30] KOPÁČOVÁ, O. 2007: Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 55 s. ISBN 978-80-7271-184-0.
- [31] LACIAKOVÁ, A., ČONKOVÁ, E., MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., PIPOVÁ, M., MÁTĚ, D., PIECKOVÁ, E., TKÁČIKOVÁ, S., VÝROSTKOVÁ, J. 2011: Mikroskopické vláknité huby a mykotoxiny v potravinách a krmivách. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. Viena s. r. o., Košice, prvé vydanie, 298 s. ISBN 978-80-8077-252-9.
- [32] LEIBL, M. 2010: Kontrola a označování biopotravin z pohledu státu. In: *Biopotraviny bez mýtů, ekologické zemědělství pohledem odborníků z praxe. PRO-BIO LIGA ochrany spotřebitelů potravin a přátel ekologického zemědělství*, vydáno jako součást projektu Panelové diskuse o ekologickém zemědělství, Praha, 11s.
- [33] MA, L., NILGHAZ, A., CHOI, J., R., LIU, X., LU, X. 2018: Rapid detection of clenbuterol in milk using microfluidic paper-based ELISA. *Food Chemistry* 246: 437–441.
- [34] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., BÁRTA, I., BUCHTA, V., DVOŘÁČKOVÁ, I., PAŘÍKOVÁ, J., SEVERA, J., ŠKARKOVÁ, J. 2003: Vlákenné mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.
- [35] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., NOVOTNÁ, E. 2013: Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Reviews*, 32(2): 19–33. ISSN: 1556–9551.

- [36] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., MALÍŘ, J., TOMAN, J. 2016: Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, 8, 191.
- [37] MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., TOMAN, J., BAZIN, I., ROUBAL, T. 2014: Transfer of Ochratoxin A into Tea and Coffee Beverages. *Toxins*, 6: 3438–3453. ISSN 2072-6651.
- [38] MALLY, A. 2012: Ochratoxin A and Mitotic Disruption: Mode of Action Analysis of Renal Tumor Formation by Ochratoxin A. *Toxicological Sciences* 127(2): 315–330.
- [39] Metodický pokyn č. 3/2013, kterým se stanovují pravidla pro: odběr, analýzu a následné vyhodnocení vzorků z ekologického zemědělství.
- [40] MILICEVIC, D., NESIC, K., JAKSIC, S. 2015: Mycotoxin contamination of the food supply chain – Implications for One Health programme. International 58th Meat Industry Conference “Meat Safety and Quality: Where it goes?”. *Procedia Food Science* 5: 187–190.
- [41] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách.
- [42] NEME, K., MOHAMMED, A. 2017: Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control* 78: 412–425.
- [43] OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., JEFREMOVA, M., RUPRICH, J. 2016a: Global warming, climate change and food safety of animal origin. *Časopis Maso ročník XXVII/číslo 1*. Brno. ISSN 1210-4086.
- [44] OSTRÝ, V., MALÍŘ, F., TOMAN, J., GROSSE, Y. 2017: Mycotoxins as human carcinogens – the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33: 65–73. ISSN 0178-7888.
- [45] PFOHL-LESZKOWICZ, A. 2009: Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arh Hig Rada Toksikol*, 60: 465-483.

- [46] PLACINTA, C., M., D'MELLO, J., P., F., MACDONALD, A., M., C. 1999: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78: 21-37.
- [47] POLÁŠKOVÁ, A. a kolektiv, 2011: Úvod do ekologie a ochrany životního prostředí. Karolinum. Univerzita Karlova v Praze, první vydání, 283 s. ISBN 978-80-246-1927-9.
- [48] Právní předpisy pro ekologické zemědělství a produkci biopotravin 2015. Ministerstvo zemědělství, Praha, 167 s. ISBN 978-80-7434-240-0.
- [49] PŘÍHODA, J. 2016: Použití a výživový význam tmavé žitné mouky. In: *Obiloviny v lidské výživě 2016, moderní trendy v mlýnské a pekárenské výrobě*. Potravinářská komora České Republiky, Praha, první vydání, 67 s. ISBN 978-80-88019-16-9.
- [50] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. 2006: *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, první vydání, vydavatelství VŠCHT Praha, 200 s. ISBN 80-7080-530-7
- [51] RADOVÁ-SYPECKÁ, Z., HAJŠLOVÁ, J. 2003: *Mykotoxiny v zemědělské produkci ve vazbě na agrární systém*. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, Praha, 51 s.
- [52] *Ročenka 2015. Ekologické zemědělství v České Republice*. Ministerstvo zemědělství, Praha, 2016, 84 s. ISBN 978-80-7434-333-9.
- [53] ROVENSKÁ, B. 1973: *Anatomický atlas žita*. Academia Praha, první vydání, 136 s.
- [54] RUPRICH, J. 1997: *Mycotoxin ochratoxin A: hodnocení nebezpečnosti a zdravotního rizika*, *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica (AHM)*, ISSN 0862-5956.
- [55] RYTINA, L. 2013: *Mykotoxiny v zemědělské produkci*. Odborný týdeník *Zemědělec* 13: 29.

- [56] SAGE, L., GARON, D., SEIGLE-MURANDI, F. 2004: Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5764-5768.
- [57] SAMSON, R., A., HOUBRAKEN, J., A., M., P., KUIJPERS, A., F., A., FRANK, J., M., FRISVAD, J., C. 2004: New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45–61.
- [58] SHEWRY, P., R. 2009: Wheat. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 6: 1537–1553.
- [59] SCHLÜTER, M., BLAKE, F. 2009: Historický vývoj ekologického nařízení EU a jeho nedávná revize. In: *Nové nařízení EU o biopotravinách a ekologickém zemědělství: (ES) č. 834/2007. Pozadí, hodnocení, interpretace*. Bioinstitut, 66 s.
- [60] SLUKOVÁ, M., SKŘIVAN, P. 2016: Obiloviny. In: *Jak poznáme kvalitu? Obiloviny a luštěniny. Sdružení českých spotřebitelů, z. ú. a Potravinářská komora ČR v rámci priorit České technologické platformy pro potraviny, svazek 14, první vydání, 31 s.* ISBN 978-80-87719-35-0.
- [61] SLUKOVÁ, M., SKŘIVAN, P., JURKANINOVÁ, L. 2016: Moderní trendy zpracování různých obilnin. In: *Obiloviny v lidské výživě 2016, moderní trendy v mlýnské a pekárenské výrobě*. Potravinářská komora České Republiky, Praha, první vydání, 67 s. ISBN 978-80-88019-16-9.
- [62] SMÝKAL, P. 2009: Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Nakladatelství Academia, časopis Živa* 1: 6-9.
- [63] STEJSKAL, V., HAJŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V. 2008: Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů. *Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí, Praha*, 52 s.
- [64] SUCHÝ, P., HERZIG, I. 2005: Plísňe a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech. *Vědecký výbor výživy zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, Praha – Uhřetěves*, 25 s.

- [65] SÝKOROVÁ, S., NEDĚLNÍK, J. 2004: Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě. Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí, Praha, 34 s.
- [66] ŠOBROVÁ, P., ADAM, V., VAŠÁTKOVÁ, A., BEKLOVÁ, M., ZEMAN, L., KIZEK, R. 2010: Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, Vol. 3(3): 94–99. ISSN 1337-9569.
- [67] TICHÁ, M., VYZÍNOVÁ, P. 2006: Polní plodiny. Veterinární a farmaceutická univerzita, Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Brno, 41 s.
- [68] *Triticum Taxonomy, Gramene* [online]. [citováno 2018-04-19]. Dostupné z WWW: http://archive.gramene.org/species/triticum/wheat_taxonomy.html
- [69] Úplné znění nařízení Rady (ES) 834/2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů a o zrušení nařízení (EHS) č. 2092/91.
- [70] URBAN, J., ŠARAPATKA, B., ČÍŽKOVÁ, S., DUKÁT, V., DIVIŠ, J., HEJÁTKOVÁ, K., HEJDUK, S., HLUCHÝ, M., HRABĚ, F., HRADIL, R., MACHÁČ, R., MOUDRÝ, J., PETR, J., PLÍŠEK, B., POKORNÝ, E., PRAŽAN, J., ROZSYPAL, R., SEDLO, J., ŠARAPATKOVÁ, H., ŠKEŘÍK, J., TEKSL, M., VEVERKA, A. 2003: Ekologické zemědělství: učebnice pro školy i praxi, I. díl (Základy ekologického zemědělství, agroenvironmentální aspekty a pěstování rostlin). Ministerstvo životního prostředí ČR a PRO-BIO Svaz ekologických zemědělců, Praha, první vydání, 280 s. ISBN: 80-7212-274-6.
- [71] VONDRÁŠKOVÁ, Š. 2006: Vývojové trendy ekologického zemědělství. Informační přehledy, UZPI, Praha, 63 s.
- [72] WHITAKER, T., B., WHITTEN, M., E. 1977: Evaluation of cottonseed aflatoxin testing programs. *J American Oil Chemists Society*, 54(10): 436-44.
- [73] WILD, CH. P., GONG, Y. Y. 2010: Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health isme. *Carcinogenesis*, Vol. 31 no.1: 71–82.
- [74] WILLER, H., LERNOUD, J. (EDS.) 2017: *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2017*. FiBL & IFOAM – Organic International, Frick and Bonn, 332 s. ISBN 978-3-03736-041-5.

[75] WU, Q., KUČA, K., HUMPF, H. U., KLÍMOVÁ, B. 2016: Fate of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during cereal-based thermal food processing: a review study. *Mycotoxin Research*. Springer.

[76] ZAIN, M., E. 2011: Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15: 129–144.

[77] ZHDANOV, A., KEEFE, J., FRANCO-WAITE, L., KONNAIYAN, K., R., PYAYT, A. 2018: Mobile phone based ELISA (MELISA). *Biosensors and Bioelectronics* 103: 138–142.

[78] ZHOU, H., GEORGE, S., HAY, C., LEE, J., QIAN, H., SUN, X. 2017: Individual and combined effects of Aflatoxin B1, Deoxynivalenol and Zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 103: 18-27.

Seznam použitých obrázků

Obr. č. 1: *strukturní vzorce aflatoxinů*: ZAIN, M., E. 2011: Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15: 129–144.

Obr. č. 2: *Aspergillus westerdijkiae*: FRISVAD, J., C., FRANK, J., M., HOUBRAKEN, J., A., M., P., KUIJPERS, A., F., A., SAMSON, R., A. 2004: New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23–43.

Obr. č. 3: *Aspergillus steynii*: FRISVAD, J., C., FRANK, J., M., HOUBRAKEN, J., A., M., P., KUIJPERS, A., F., A., SAMSON, R., A. 2004: New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23–43.

Obr. č. 4: *strukturní vzorec ochratoxinu A*: ZAIN, M., E. 2011: Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15: 129–144.

Obr. č. 5: *strukturní vzorec deoxynivalenolu*: ZAIN, M., E. 2011: Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15: 129–144.

Obr. č. 6: *podélný řez obilkou (a – oplodí, b – osemení, c – vrstva aleuronových buněk, d – výživná tkáň, e – klíček*: TICHÁ, M., VYZÍNOVÁ, P. 2006: *Polní plodiny*. Veterinární a farmaceutická univerzita, Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Brno, 41 s.

Obr. č. 7: *logo EU*: Právní předpisy pro ekologické zemědělství a produkci biopotravin 2015. Ministerstvo zemědělství, Praha, 167 s. ISBN 978-80-7434-240-0.

Obr. č. 8: *národní logo „biozebra“*, Právní předpisy pro ekologické zemědělství a produkci biopotravin 2015. Ministerstvo zemědělství, Praha, 167 s. ISBN 978-80-7434-240-0.

Obr. č. 9: *mlýnek*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 10: *centrifuga*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 11: *stanovení aflatoxinů, napipetované vzorky, přidaný konjugát*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 12: *stanovení aflatoxinů, zbarvení po přidání anti-aflatoxin protilátek*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 13: *stanovení aflatoxinů, po promývání a přidání substrát/chromogenu*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 14: *stanovení aflatoxinů, po přidání substrát/chromogenu, inkubace ve tmě*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 15: *stanovení aflatoxinů, výsledné zbarvení po inkubaci ve tmě*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obr. č. 16: *stanovení aflatoxinů, výsledné zbarvení po přidání zastavovacího roztoku*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Obrázek č. 17: *stanovení aflatoxinů pomocí spektrofotometru*, vlastní fotografie, pořízeno dne 14. 2. 2018

Seznam použitých tabulek

Tab. č. 1: výsledky stanovení aflatoxinů v pšenici

Tab. č. 2: výsledky stanovení aflatoxinů v žitě

Tab. č. 3: výsledky stanovení OTA v pšenici

Tab. č. 4: výsledky stanovení OTA v žitě

Tab. č. 5: výsledky stanovení DON v pšenici

Tab. č. 6: výsledky stanovení DON v žitě

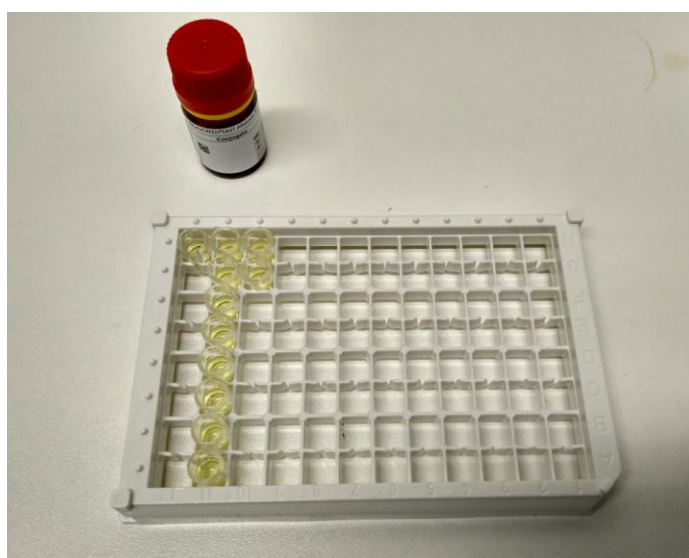
Přílohy



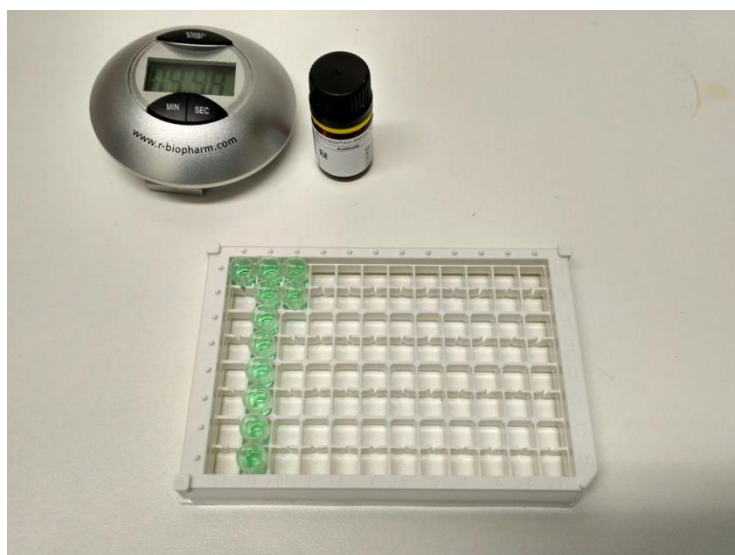
Obrázek č. 9 – mlýnek



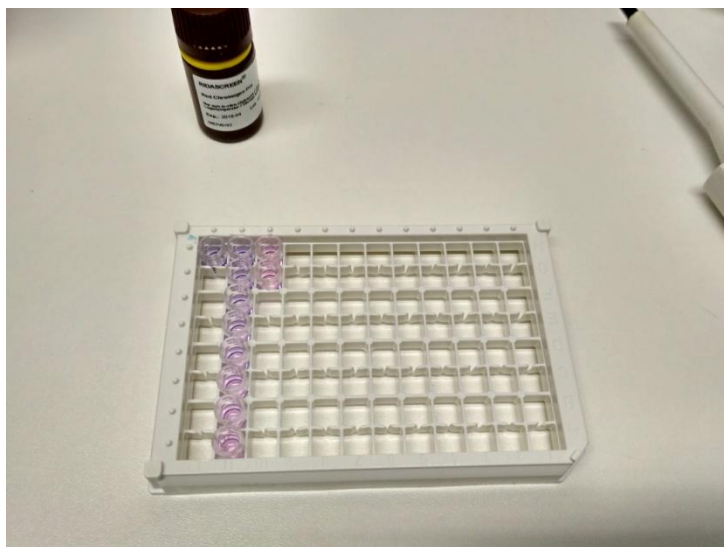
Obrázek č. 10 – centrifuga



Obrázek č. 11 - stanovení aflatoxinů, nepipetované vzorky, přidány konjugát



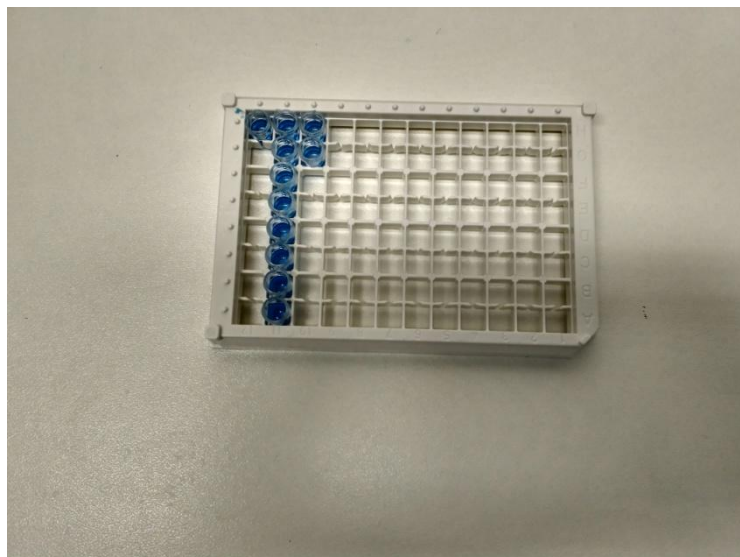
Obrázek č. 12 – stanovení aflatoxinů, zbarvení po přidání anti-aflatoxin protilátek



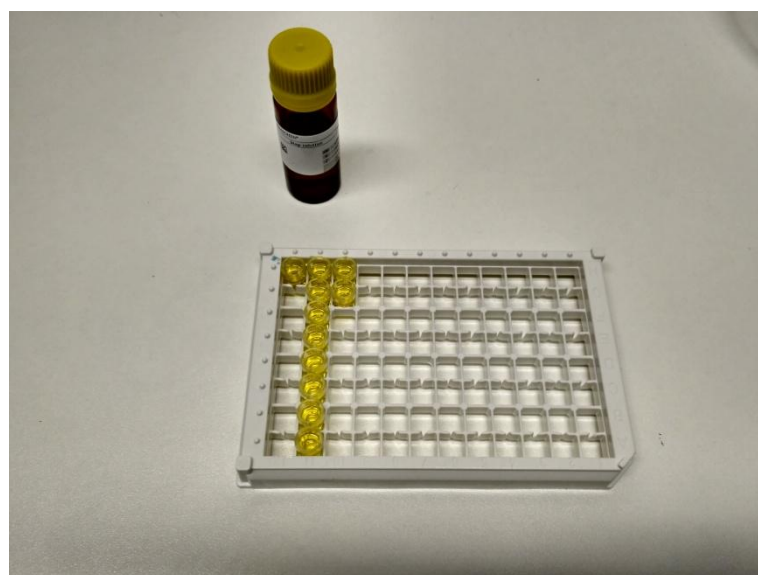
Obrázek č. 13 – stanovení aflatoxinů, po promývaní a přidání substrát/chromogenu



Obrázek č. 14 – stanovení aflatoxinů, po přidání substrát/chromogenu, inkubace ve tmě



Obrázek č. 15 – stanovení aflatoxinů, výsledné zbarvení po inkubaci ve tmě



Obrázek č. 16 – stanovení aflatoxinů, výsledné zbarvení po přidání zastavovacího roztoku



Obrázek č. 17 – stanovení aflatoxinů pomocí spektrofotometru