

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. IVANA PÁLENÍKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav výživy zvířat a pícninářství



Degradovatelnost vybraných mykotoxinů metodou in vitro

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Pavel Horký, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Ivana Páleníková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Degradovatelnost vybraných mykotoxinů metodou in vitro vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu Ing. Pavlovi Horkému, Ph.D. za odborné vedení a konzultace při vypracování diplomové práce.

Rovněž děkuji své rodině za umožnění studia na této univerzitě a za všestrannou podporu při studiu.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zpracovaná na téma degradovatelnost vybraných mykotoxinů metodou *in vitro*. První část práce se zabývá charakteristikou plísní (mikromycety), produktů jejich sekundárního metabolismu – mykotoxiny, maskovanými mykotoxiny, vlivem mykotoxinů na zdraví skotu a prasat. V závěru literárního přehledu se zaměřuje na možnosti degradace mykotoxinů a metabolismem u skotu.

Ve druhé části je popsána vlastní práce zabývající se stravitelností vybraných druhů mykotoxinů v bacherové tekutině metodou *in vitro*. Do pokusu byly zařazeny tři skupiny ječmenů s rozdílným fungicidním ošetřením. První skupina sloužila jako kontrolní bez fungicidního ošetření. Druhá skupina ječmene (varianta A) byla ošetřena přípravkem Hutton (0,8 l/ha, v BBCH 36) + Zantara (1,5 l/ha, v BBCH 65). Třetí skupina ječmenů (varianta B) byla ošetřena pomocí kombinace Hutton (0,8 l/ha, v BBCH 36) + Prosaro EC250 (0,75 l/ha, v BBCH 65). V původní hmotě ječmenů byla stanovena hladina deseti mykotoxinů. Následně byly vzorky inkubovány v přístoji Daisy II po dobu 24 hodin. K inkubaci byly použity enzymy celulóza a pepsin. V inkubační tekutině byly stanoveny následující mykotoxiny: dexynivalenol, zearalenon, deoxynivalenol-3-glukosid a 3-acetyl-deoxynivalenol. U varianty A byla hladina dexynivalenolu vyšší o 36 %, zearalenonu o 2%, deoxynivalenol-3-glukosid o 12% a 3-acetyl-deoxynivalenol o 39 %. Nejnižší koncentrace uvedených mykotoxinů byly nalezeny u varianty B. Hladina deoxynivalenolu byla nižší o 19 %, zearalenonu o 30 %, deoxynivalenol-3-glukosid o 37 % ($P < 0,05$) a 3-acetyl-deoxynivalenol byl vyšší o 12 % v porovnání s kontrolní skupinou.

Z dosažených výsledků je patrné, že fungicidní ošetření a trávící enzymy mohou eliminovat přechod mykotoxinů do inkubační (bacherové) tekutiny a tím snížit riziko zatížení organismu těmito toxiny.

Klíčová slova: mykotoxiny, *in vitro* stravitelnost, maskované mykotoxiny, degradovatelnost mykotoxinů

ABSTRAKT

This diploma thesis focuses on the topic of degradability of mycotoxins in vitro method. The first part covers a brief description of mold (micromycetes) and the products of secondary metabolism – mycotoxins, masked mycotoxins and negatives effect on cattle and pigs health.

The second part description own work dealing digestibility selected mycotoxins was tested in rumen fluid in vitro. The three groups of barley crop with different fungicide treatment were included in the experiment. The first group served as the control one without fungicide treatment. The second group of barley (variant A) was treated with Hutton (0,8 L/ha at BBCH 36) + Zantar (1,5 L/ha at BBCH 65). The third group of barley (variant B) was treated with the combination of Hutton (0,8 L/ha at BBCH 36) + Prosaro EC250 (0,75 L/ha at BBCH 65). In the original mass of barely, ten levels of mycotoxins were established. Subsequently, the samples were incubated in the machine Daisy II for 24 hours. The cellulase and pepsin enzymes were used in the incubation. Following mycotoxins were determined in the incubation fluid such as deoxynivalenol, zearalenone, deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol. In the variant A, the level of deoxynivalenolu was higher by 36%, zearalenone by about 2%, deoxynivalenol-3-glucoside by 12%, and 3-acetyl-deoxynivalenol by 39%. Low levels of the mycotoxins were found out in the variant B. Deoxynivalenol level was lower by 19%, zearalenone by 30%, deoxynivalenol-3-glucoside by 37% ($p < 0,05$). The 3-acetyl-deoxynivalenol level was higher by 12% in a comparison with the control group.

The obtained results showed that the fungicidal treatment and digestive enzymes could eliminate the transition of mycotoxins into incubative (rumen) liquid, and thereby to reduce the risk of the load of the organism by the mycotoxins.

Keys words: mycotoxins, in vitro description, masked mycotoxins, degradation mycotoxins

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1	Charakteristika plísní a mykotoxinů	10
2.1.1	Vláknité mikroskopické houby	10
2.1.2	Mykotoxiny	10
2.1.3	Faktory ovlivňující aktivitu plísní	11
2.2	Rody plísní	12
2.2.1	Rod <i>Aspergillus</i>	12
2.2.2	Rod <i>Fusarium</i>	13
2.2.3	Rod <i>Penicillium</i>	14
2.3	Mykotoxiny produkované plísněmi	14
2.3.1	Deoxynivalenol (DON)	14
2.3.2	Enniatin	15
2.3.3	Fumonisin	15
2.3.4	Ochratoxin A (OTA)	16
2.3.5	Patulin	17
2.3.6	T-2 toxin	17
2.3.7	Zearalenon (ZEA)	18
2.4	Maskované mykotoxiny	19
2.5	Metabolismus mykotoxinů	20
2.6	Vliv mykotoxinů na zdraví zvířat	20
2.6.1	Vliv mykotoxinů na zdraví skotu	22
2.6.1.1	Toxicita deoxynivalenolu (DON) u skotu	22
2.6.1.2	Toxicita ochratoxinu A (OTA) u skotu	22
2.6.1.3	Toxicita patulinu u skotu	22
2.6.1.4	Toxicita T2-toxinu u skotu	23
2.6.1.5	Toxicita zearalenonu (ZEA) u skotu	23
2.6.2	Vliv mykotoxinů na zdraví prasat	23
2.6.2.1	Toxicita deoxynivalenolu (DON) u prasat	23
2.6.2.2	Toxicita ochratoxinu A (OTA) u prasat	24

2.6.2.3	Toxicita T2-toxinu u prasat	24
2.6.2.4	Toxicita zearalenonu (ZEA) u prasat	24
2.7	Stanovení mykotoxinů	24
2.7.1	Metoda analýzy ELISA	25
2.7.2	Metoda analýzy HPLC.....	25
2.8	Normy mykotoxinů	25
2.9	Prevence kontaminace mykotoxiny	27
2.10	Dekontaminace mykotoxinů.....	27
2.10.1	Fyzikální způsoby dekontaminace.....	28
2.10.1.1	Absorbenty – bentonit	28
2.10.1.2	Absorbenty - zeolity	29
2.10.1.3	Absorbenty – aktivní uhlí	29
2.10.2	Chemické způsoby dekontaminace.....	29
2.10.3	Biologické způsoby dekontaminace	29
2.11	Degradace mykotoxinů v bacheru skotu	30
3	CÍL PRÁCE	31
4	MATERIÁL A METODIKA.....	32
5	VÝSLEDKY	37
6	DISKUZE	40
7	ZÁVĚR.....	42
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43
9	SEZNAM TABULEK A GRAFŮ	48
9.1	Seznam tabulek	48
9.2	Seznam grafů.....	48
10	SEZNAM ZKRATEK	49
11	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	50

1 ÚVOD

V České republice i ve světě jsou kladeny stále vyšší požadavky na kvalitu potravin rostlinného a živočišného původu, tak i krmiv pro hospodářská zvířata. Z tohoto důvodu je důležité zabezpečit zvířatům kvalitní hygienicky nezávadné krmivo. Komponenty krmných směsí musí být vysoké kvality, musí obsahovat potřebné živiny a je nutné zabezpečit jejich zdravotní bezpečnost. Nekvalitní a závadné komponenty snižují kvalitu krmiva, tím se snižuje užitkovost zvířat, zhoršuje se zdraví zvířat a snižuje se kvalita produktu. Od zdravotní nezávadnosti bezpečnosti siláží a jadrných komponentů v TMR se odráží produkce mléka ale i masa. Mykotoxiny obsažené v kompletních krmných směsích pro prasata zhoršují přírůstky, kvalitu produktu a především zhoršují reprodukční schopnosti prasniček a prasnic. Z těchto důvodů je nutné předcházet jejich výskytu v zemědělských komoditách správnou zemědělskou praxí.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristika plísní a mykotoxinů

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní. V dalších kapitolách se zaměříme na následující problematiku.

2.1.1 Vlákňité mikroskopické houby

Vlákňité mikroskopické houby neboli mikromycety, jsou eukaryotní, vícebuněčné, pokročile heterotrofní, parazitické nebo saprofytické mikroorganismy, známé také jako plísně. Velká morfoloická rozmanitost a schopnost vláknitých hub přizpůsobit se nejrůznějším ekologickým podmínkám umožňuje jejich výskyt všude tam, kde existuje organická hmota. Mají přísně aerobní povahu, a proto se nejčastěji rozmnožují na povrchu napadeného materiálu. Rozmnožují se i při nízké aktivitě vody. K rozvoji plísní stačí 15% vody. Spory mikromycet jsou jednobuněčné či vícebuněčné výtrusy sloužící k jejich rozmnožování a přežívání. Jsou přítomny v ovzduší, půdě, vodě, na povrchu živých a odumřelých organismů, na různých předmětech apod. Velmi vhodným substrátem pro růst a rozmnožování těchto plísní jsou krmiva a potraviny (OSTRÝ, 2000, ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Kmeny potenciálně toxinogenních plísní nejsou vždy toxinogenní. Produkce mykotoxinů není přímo úměrná s intenzitou růstu plísní, a proto nelze pro jejich detekci použít orientační metody, indikátorové metody (stanovení ergosterolu nebo metoda imunofluorescence) nebo mikroskopické stanovení počtu spor. Jsou to pouze metody orientační, které musí být doplněny speciálními diagnostickými analýzami, například metoda HPLC a ELISA, (ZEMAN *et al.*, 2006, SCHNEIDEROVÁ, 2008, OSTRÝ 2000).

Mezi nejvýznamnější toxinogenní plísně v souvislosti s potravinami patří rody *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Dalšími producenty mykotoxinů jsou rody *Trichoderma* a *Alternaria* (PITT, 2000).

2.1.2 Mykotoxiny

Jde o sekundární metabolity mikromycet, jejichž produkce závisí na mnoha faktorech. Mykotoxiny se vyznačují značnou proměnlivostí svých metabolických pochodů i při zcela obdobných růstových podmínkách. Za určitých podmínek kmen

daného druhu plísně produkuje mykotoxiny a za jiných podmínek k produkci nedochází (SUDAKIN a FALLAH, 2008). Mykotoxiny jsou škodlivé chemické látky produkované plísněmi rostoucími na krmivu nebo krmných složkách a vážně škodí zdraví zvířat a lidí (SKLÁDANKA *et al.*, 2013). Metabolity plísní jsou chemicky velmi stálé a při výrobě a zpracování krmiv se neničí (SCHNEIDEROVÁ, 2008). Za vysoce stabilní z tohoto pohledu lze pokládat aflatoxiny, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenon, fumonisiny a další (ZEMAN *et al.*, 2006). Mykotoxiny jsou produkovány myceliem mikromycet a jsou vylučovány do substrátu, mohou však být obsaženy také ve sporách, které kontaminují prostředí (OSTRÝ, 2000). Mykotoxiny tvoří různorodou skupinu toxických sekundárních metabolitů hub, které saprofytický koexistující na krmných surovinách nebo se vyskytují ve směsných krmivech (ŠIMBERDA a STRYK, 2010). Je známo více než 500 druhů mykotoxinů produkovaných asi 350 druhy toxinogenních plísní. Různé druhy plísní mohou metabolizovat více než jeden druh mykotoxinu, naopak jeden typ mykotoxinu může být metabolizován více druhy plísní (ZEMAN *et al.*, 2006).

Termín mykotoxin vychází spojením z řeckých slov *mycos* (=houba) a *toxicon* (= jed), (ŠIMBERDA a STRYK, 2010). Jsou to pro organismus toxické látky nebílkovinného charakteru, toxické pro člověka i hospodářská zvířata (ŠIMŮNEK, 2003). Mykotoxiny jsou produkovány vlivem stresových situací, jako jsou např. velké výkyvy teplot nebo nedostatečná aplikace fungicidů na poli, popř. pravidelné pěstování téže plodiny na stejném místě. Díky tomu dochází k hromadění spor v půdě. V našich klimatických podmínkách je produkce mykotoxinů spojena výskytem polních plísní (*Fusarium*, *Alternaria*), proto má počasí během vegetačního období a sklizně významnou roli na výskyt mykotoxinů. Některé mykotoxiny (např. Ochratoxiny, Patulin) se mohou metabolizovat i během skladování krmiv a krmných komponent, tzv. skladištní mykotoxiny (ŠILHÁNKOVÁ, 2002, ZEMAN *et al.*, 2006). V krmivech byly mykotoxiny poprvé diagnostikovány v 60. letech minulého století, první popsána skupina mykotoxinů byly aflatoxiny (SCHNEIDEROVÁ, 2008). Výskyt a produkce mykotoxinů v plodinách a krmivech je celosvětový problém, který se vyskytuje ve všech geografických oblastech (ZEMAN *et al.*, 2006).

2.1.3 Faktory ovlivňující aktivitu plísní

Faktory mající vliv na růst a metabolismus plísní se dají rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Růst plísní je ovlivněn stresem u rostlin vyvolaný suchem nebo

zamořením škůdci. Aplikací fungicidů na poli můžeme redukovat růst plísní, ale nemusí redukovat produkci mykotoxinů. Další růst plísní a tvorba mykotoxinů po sklizni plodin jsou ovlivněny především podmínkami skladování. Hlavními faktory jsou: teplota, vodní aktivita a aktivita hmyzu. Plísně rostou v rozpětí teploty 10–40 °C, při hodnotě pH 4–8 a vodní aktivitě A_w 0,7. Mohou růst na krmivech obsahujících více než 12–15 % vlhkosti. Ve vlhkých krmivech (jako je siláž) umožňuje vyšší hladina vlhkosti růst plísní pouze za přítomnosti kyslíku (většina plísní je aerobních), (SCHNEIDEROVÁ, 2008).

Aktivita plísní v objemových krmivech může být problematická. Ovlivňuje ji kontaminace píce zeminou, vystavení píce dlouhotrvajícím srážkám a nesprávný technologický postup při konzervaci píce (ZEMAN *et al.*, 2006).

2.2 Rody plísní

SCHNEIDEROVÁ (2008) i PITT (2000) ve svých pracích uvádějí, že většinu významných mykotoxinů produkují plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Trichoderma*, které uvádí v tab. 1

Tab. 1. Plísně a mykotoxiny (upraveno dle SCHNEIDEROVÉ, 2008)

TOXIN	PLÍSNĚ
Aflatoxin (B1,B2,G1,G2)	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>)
Ochatoxin A	<i>Aspergillus</i> spp. (<i>A. ochraceus</i>) <i>Penicillium</i> spp. (<i>P. verrucosum</i>)
T-2 toxin, deoxynivalenol	<i>Fusarium</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.
Fumonisin	<i>Fusarium</i> spp. (<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>)
Zearalenon	<i>Fusarium</i> spp. (<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sacchari</i>)

2.2.1 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* je vybaven bohatým enzymatickým systémem, např. amylolytickými, pektolytickými a proteolytickými enzymy, a je schopen snášet nízkou

aktivitu vody (ŠILHÁNKOVÁ, 2002). Mykotoxiny, které rod *Aspergillus* nejčastěji produkuje, patří patulin, cytochalasin E, aflatoxin B1 a B2, cyklopiazonová kyselina, gliotoxin, OTA nebo citrinin. Nalézt ho můžeme v těchto komponentech – obiloviny (ječmen, pšenice), rýže, kukuřice (MALÍŘ *et al.* 2003).

2.2.2 Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* ssp. je významným původcem chorob řady obilovin. Tyto plísně napadají paty stébel. Prvotním příznakem infekce *F. culmorum* jsou zahnědlé plochy a čárkovité pásy na stéblech a způsobují postupné trouchnivění báze stébla i horní partie kořenů. Za vlhkého počasí je na povrchu stébel růžové mycelium. *F. culmorum* může také napadat klasy, kdy dochází k odumírání jednotlivých klásků nebo části klasů. Plíseň napadá pšenice během celé vegetace. Výraznější kontaminace je za teplého a suchého počasí. Napadení *F. culmorum* způsobuje výrazné snížení výnosu zrna (VEJL, *et al.*, 2000). Napadená zrna jsou drobná, svraštělá a při silné infekci porostlá myceliem houby.

Houbový patogen přezimuje na rostlinných zbytcích v půdě. Zdrojem infekce je také napadené osivo. V obilovinách jsou nejzávažnější tři druhy fuzariotoxinů – nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), T-2 toxin – zejména v pšenici a tritikale, dalším důležitým mykotoxinem druhů rodu *Fusarium* je zearalenon (ŠIRUČKOVÁ a KROUTIL, 2007). Klasové fuzariózy se nejčastěji vyskytují na pšenici a to ozimé i jarní, méně časté jsou na žitu a tritikale. Velmi nežádoucí jsou na ječmenech, kde u jarních ječmenů mohou znehodnocovat sladařskou jakost. Na ovsu byla místy zjištěna přítomnost fusarií v obilkách, je však méně častá a vizuálně nenápadná. Obtížnější je i zjišťování přítomnosti fuzarióz v klasech ječmenů (CHRPOVÁ, 2007).

Ochrana plodin proti fuzariózám spočívá ve více krocích, které společně vedou ke snížení výskytu chorob, a tím také k dosažení vysokého výnosu kvalitního zrna. Ke snížení rizika napadení porostů fuzariózami přispívá dodržování osevních postupů, vhodná volba odrůd, které mají vyšší rezistenci. Dále je to zaorávka strniště a slámy, podpora rozkladu posklizňových zbytků, podpora dobrého růstu vyváženou výživou a ochrana před poléháním. Důležitá je i ochrana rostlin pomocí vhodných mořidel (ŠIRUČKOVÁ a KROUTIL, 2007).

2.2.3 Rod *Penicillium*

Tento rod obsahuje asi 150 druhů. Tyto druhy tvoří kolonie s velkým množstvím žlutozelených až modrozelených konidií. Vyskytují se na různých krmivech i jiném materiálu patrné jako nazelenalé, sametové až moučné povlaky. Okraje těchto kolonií jsou bílé, protože už neobsahují spory (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

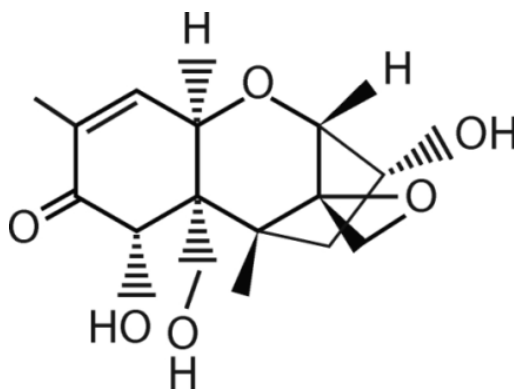
2.3 Mykotoxiny produkované plísněmi

Mykotoxiny jsou jednou z nejvýznamnějších skupin antinutričních látek které se mohou tvořit v krmivech (DOLEŽAL, 2012).

2.3.1 Deoxynivalenol (DON)

Deoxynivalenol je známý též jako vomitoxin (obr. 3). DON produkují hlavně plísně *Fusarium culmorum* a *F. graminearum* (BETINA, 1990). Často je v odebraných vzorcích krmiv determinován téměř na 100 % a je proto považován za marker upozorňující na přítomnost i dalších mykotoxinů.

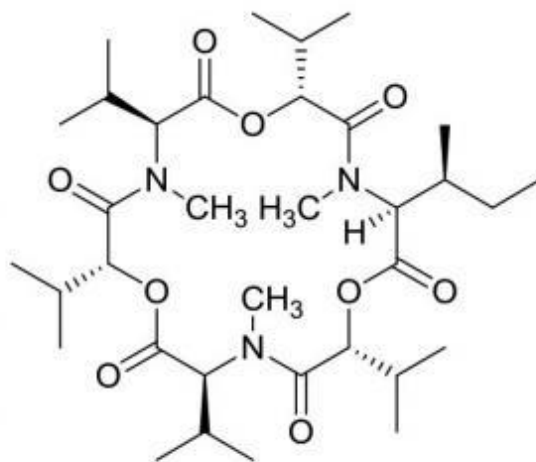
Zaplísňení plodin fusariem podporuje vlhké a deštivé počasí v době kvetení. Výsledkem působení toxinů je hniloba palic kukuřice, strupovitost nebo sněť u ječmene, pšenice, ovesa a žita. Obsah mykotoxinu se může zvýšit ve skladovaném zrně při vyšší vlhkosti (SCHNEIDEROVÁ, 2008). DON patří do rozmanité skupiny mykotoxinů zvanou trichotheceny. Do této skupiny patří i T-2 toxin nebo diacetoxyscirpenol (ŠIMBERDA a STRYK, 2010). Toxiny u zvířat zpomalují nebo zcela zastavují syntézu proteinu na ribozomální úrovni, potlačují imunitu a působí toxicky na buněčné membrány. Toxikóza se projevuje zvracením, průjmy a zánětem střeva. Zvířata odmítají krmivo, zpomalí se růst a jsou zde známé i poruchy reprodukce (SCHNEIDEROVÁ, 2008).



Obr. č. 1 Strukturální vzorec deoxynivalenolu

2.3.2 Enniatin

Působí jako ionofory, které narušují fyziologickou iontovou rovnováhu a pH tím, že vytvoří dimerické struktury, které přepravují monovalentní ionty přes buněčnou membránu. Enniatiny jsou popisovány jako rostlinné toxiny s antibiotickou a insekticidní aktivitou. Jejich případná akutní ani chronická toxicita doposud nebyla potvrzena a toxické působení těchto látek je stále předmětem výzkumu (BENEŠOVÁ *et al.*, 2014).

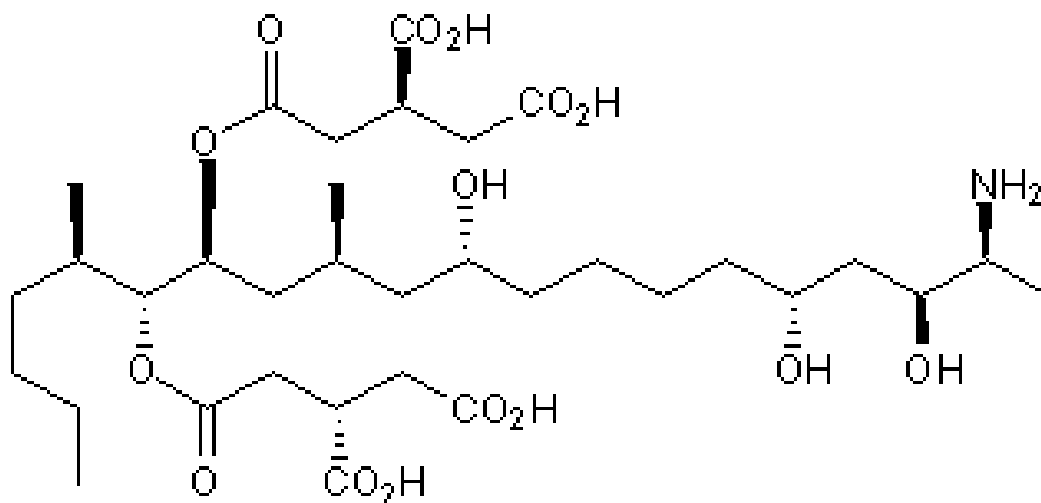


Obr. č. 2 Strukturální vzorec Enniatinu

2.3.3 Fumonisin

Fumonisin představují skupinu toxinů produkovaných nejčastěji *Fusarium verticillioides* a *Fusarium proliferatum*, které jsou nejčastěji přítomné v kukuřici. Fumonisin B1, B2 a B3 jsou toxiny v plísňových kulturách nebo v přirozeně kontaminované kukuřici (SCHNEIDEROVÁ, 2008). Podstatou jejich toxických účinků je ovlivňování metabolismu sfingolipidů a tím naruší membránové struktury (ŠIMŮNEK, 2003). Fumonisin B1 je považován za nejvíce toxický, hlavním nebezpečím je jeho karcinogenní účinek. Pro některé druhy hospodářských zvířat je hepatotoxický a nefrotoxický (SCHNEIDEROVÁ, 2008). Bylo potvrzeno, že nejcitlivější druhy na fumonisin jsou koňovití a prasata, s vývojem druhově specifických klinických syndromů, jako jsou koňská leukoencefalomalacie a prasečí plicní edém. Na fumonisin jsou méně citliví přežvýkavci a drůbež. Přežvýkavci jsou

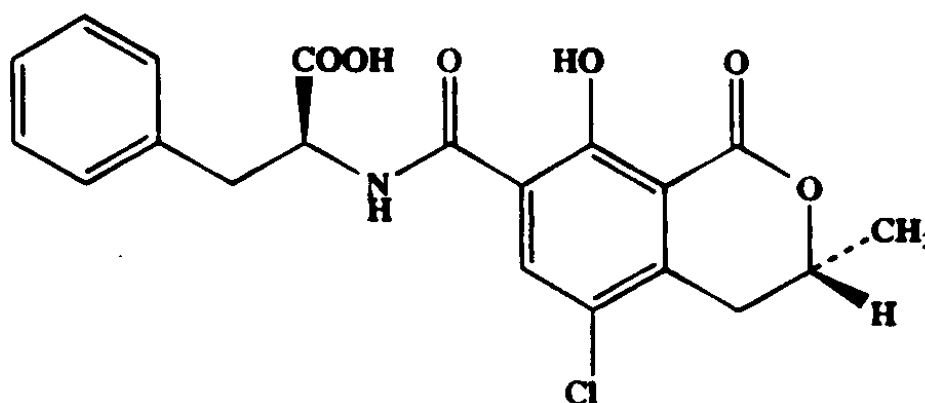
méně citlivý, protože v průběhu bachorové fermentace dochází k degradaci Fumonisinu B1 (SCHNEIDEROVÁ, 2008).



Obr. č. 3 Strukturální vzorec fumonisinu B1

2.3.4 Ochratoxin A (OTA)

Nejvýznamnějším mykotoxinem ze skupiny ochratoxinů je ochratoxin A (OTA), (BETINA, 1990). Podle SCHNEIDEROVÉ (2008) a ŠIMBERDY a STRYKA (2010) je ochratoxin A (obr. 4) produkován plísněmi rodu *Penicillium* a *Aspergillus*. V rámci skupiny ochratoxinů je nejrozšířenější. Toxin má nefrotoxické, imunotoxické, mutagenní, karcinogenní a teratogenní účinky. Limitní hodnota OTA v obilovinách je 5,0 µg/kg.

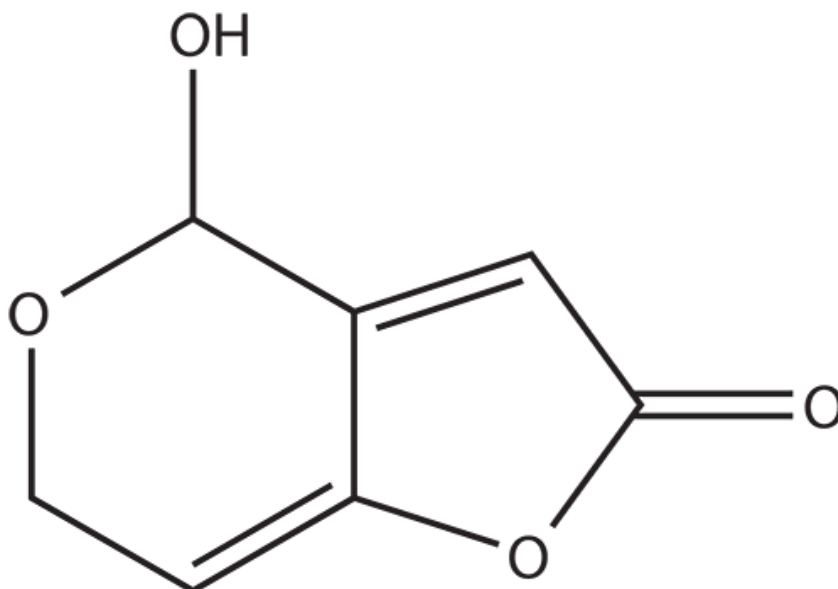


Obr. č. 4 Strukturální vzorec ochratoxinu A

2.3.5 Patulin

Patulin produkují různé rody plísní, který mi jsou *Aspergillus (A.clavatus)*, *Byssochlamys* a *Penicillium (P.patulum, P.aspergillus a P.expansum)*. Mykotoxin se nejčastěji vyskytuje v kazícím se ovoci. Byl ale také zjištěn v ječmeni, kukuřici a pšenici. V organismu patulin působí jako inhibitor enzymů. Akutní otravy u dobytka se mohou projevit poškozením plic.

Patulin je dobře detoxikovatelný, jako jeden z mála mykotoxinů. Jeho rozklad byl prokázán při alkoholickém kvašení. Chemickou podstatou eliminace mykotoxinu je reakce patulinu s thiolovými skupinami (ŠIMŮNEK, 2003).

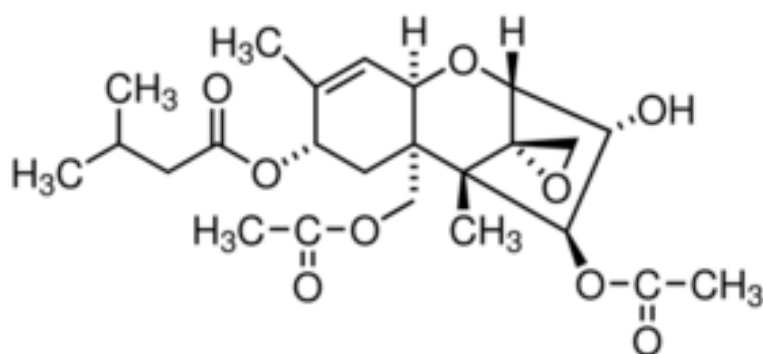


Obr. č. 5 Strukturální vzorec patulinu

2.3.6 T-2 toxin

Producenti T2-toxinu jsou především plísně rodu *Fusarium*, hlavně *F.sporotrichioides* a *F. poae*. Toxin se vyskytuje často u ovsa, v ječmeni, pšenici a prosu. T2-toxin plísněmi nejvíce produkují při zvýšené vlhkosti a teplotě mezi 6-24°C (SCHNEIDEROVÁ, 2008). ŠIMBERDA a STRYKA (2010) a SCHNEIDEROVÁ (2008) se shodují, že T2-toxin způsobuje gastroenteritidu, střevní hemoragie až úhyn. Důsledkem toho dochází k výraznému snížení příjmu krmiva a následné zhoršení užitkovosti, reprodukce. Zvýšená je i náchylnost k dalším nemocem. Dále může mít

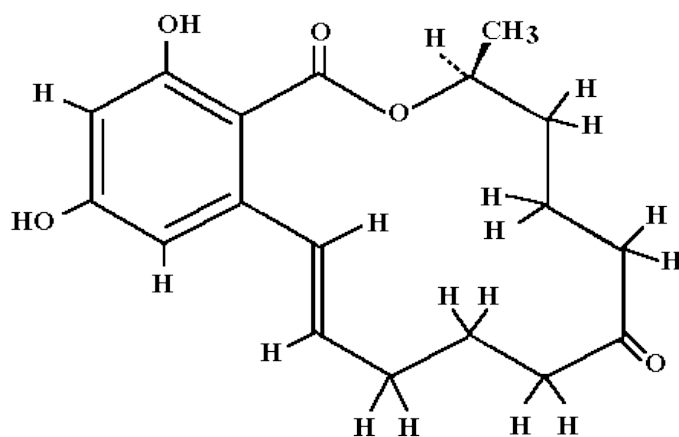
dermatotoxické a emetické účinky. Jeho limit není v potravinách stanovený. Je stanovený pouze kombinovaný limit a to 0,6 µg/kg tělesné hmotnosti.



Obr. č. 6 Strukturální vzorec T-2 toxinu

2.3.7 Zearalenon (ZEA)

Zearalenon je produkován několika druhy plísně *Fusarium*. Hlavními producenty jsou *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum* a další (BETINA, 1990). Přestože je jeho struktura nesteroidní, jsou jeho účinky stejné jako steroidní hormony estrogenu (ŠIMŮNEK, 2003). Toxin způsobuje hnilobu kukuřice, vyskytuje se i v ostatních obilovinách, v senu a v siláži. Hladina ZEA v kukuřici se zvyšuje v důsledku vlhkého počasí, které udržuje její vlhkost v rozmezí 22 -25% nebo při prodloužené sklizni (SCHNEIDEROVÁ, 2008). ŠIMBERDA a STRYK (2010) ve své publikaci uvádí, že zearalenon má nižší toxicitu než jiné mykotoxiny. Jeho intoxikace nemá akutní klinické příznaky toxicity. Jeho účinek je spíše chronický. Způsobuje hyperestrogenismus u prasat, skotu a drůbeže. Při zkrmování kontaminovaného krmiva krávám může přecházet toxin do mléka, což může být značné riziko u dětí.



Obr. č. 7 Strukturální vzorec zearalenonu

2.4 Maskované mykotoxiny

Kromě volných forem mykotoxinů se mohou v obilovinách nacházet i formy vázané, tzv. „maskované“ mykotoxiny (HAJAŠOVÁ *et al.*, 2009). Na konjugované nebo maskované mykotoxiny se začalo upozorňovat po pozorování zvířat, která byla postižena mykotoxikózami, které byly způsobeny kontaminovanými krmivy. Toxicita začala být přisuzována maskovaným mykotoxinům, protože při běžné analýze krmiv byla hladina mykotoxinů nízká. Mykotoxiny, které jsou metabolizovány rostlinami na konjugované formy, jsou v trávicím traktu zvířat hydrolyzovány a jejich toxicita je srovnatelná s toxicitou nekonjugovaných mykotoxinů (RAI, 2010)

Problematikou maskovaných mykotoxinů se začalo zabývat až v posledních letech. V České republice se maskovanými mykotoxiny nejvíce zabývala prof. Hajšlová (HAJŠLOVÁ *et al.*, 2009). GALAVERNA *et al.* (2008) zkoumal přítomnost maskovaných forem fusariových mykotoxinů (deoxynivalenolu, zearalenonu a fumonisinu B1, B2 a B3) u pšenice a kukuřice. Významné množství těchto forem zjistil jak u zrn, tak i ve výrobcích z nich. Deoxynivalenol-3-glykosidu byla v pšenici až 30% vyšší koncentrace DON. Vázané formy fumonisinů představovaly často i vyšší množství ve srovnání s volnými formami.

Existence maskovaných mykotoxinů byla zjištěna při sledování rozvoje toxinů v pšenici. Vzorek byl cíleně infikován fusariovými plísněmi, kdy byl pozorován nárůst a následně pokles množství deoxynivalenolu. Pokles byl nejspíše způsoben přeměnou původního DON na jeho metabolity. Rostliny napadené toxinogenními plísněmi mají schopnost použít své ochranné mechanismy na deaktivaci škodlivých mykotoxinů. Mykotoxiny přemění na jiné látky, které potom mohou ukládat do vakuol. Tyto přeměny probíhají v různých částech a organelách rostlin za pomoci rozmanitých enzymatických reakcí. Při nich dochází k narušení funkčních skupin mykotoxinů navázáním aminokyselin, sulfátových skupin a sacharidů za vzniku konjugátů a derivátů mykotoxinů. Konjugáty mykotoxinů s glukózou a glutationem se označují jako maskované mykotoxiny (BERTHILLER *et al.*, 2013).

Deaktivací mykotoxinu DON může vznikat jeho konjugovaná (maskovaná) forma deoxynivalenol-3-glukosid (D3G) nebo 3(15)-acetyl deoxynivalenol (NAGL *et al.*, 2014).

Metabolismem rostlin může vzniknout ze zearalenonu maskovaný zearalenon glykosid, který není při rutinní analýze zjistitelný. Hydrolyzuje se během trávení za vzniku aglykonu a zearalenonu. Je tedy pravděpodobné, že způsobuje mykotoxikózy. Citlivá na přítomnost ZEA jsou především prasata, kde má estrogení účinek (GEYS *et al.*, 2012).

2.5 Metabolismus mykotoxinů

SUCHÝ a HERZIG (2005) ve své publikaci uvádí, že při intoxikaci mykotoxiny má organismus své ochranné mechanismy. Detoxikace probíhá v játrech. Například u detoxikace aflatoxinů se uplatňují oxidoredukční reakce, za využitím glutathionu. Ten je tvořen methioninem a cysteinem. Toxický účinek aflatoxinu nastává až po vyčerpání metabolické hladiny methioninu, následné působení toxinu má negativní dopad na zdraví a užitkovost zvířat. Lepší obranyschopnost organismu lze tedy ovlivnit vyšší dotací methioninu.

2.6 Vliv mykotoxinů na zdraví zvířat

Intoxikace mykotoxiny mohou mít příznaky viditelné na první pohled, můžeme pozorovat snížený příjem krmiva, abnormální opeření a zhoršenou kvalitu srsti. Při podrobnější analýze skupiny se může jednat zejména o snížení užitkovosti, poruchy reprodukce, potlačení imunity a příznaky různých infekčních onemocnění (SCHNEIDEROVÁ, 2008). ŠIMŮNEK (2003) a ZEMAN *et al.* (2006) se shodují, že v závislosti na skladovacích podmínkách, není kontaminace krmiv mykotoxiny rovnoměrná, ale velmi heterogenní. Dlouhodobé vystavování organismu působení mykotoxinů má velmi silný kumulativní účinek. Toxicita jednotlivých mykotoxinů je dána jejich chemickou strukturou a fyzikálními vlastnostmi, ale také působením stresových faktorů. Toxické koncentrace jednotlivých mykotoxinů v krmivu jsou uvedeny v tab. 3 (ŠIMŮNEK, 2003, ZEMAN *et al.*, 2006). Účinek každé skupiny toxinů je specifický a jen zřídka se kryje s účinky ostatních mykotoxinů. Tolerance zvířat na jejich působení je různá. Intoxikace probíhají buď ve formě akutní, nebo chronické. Akutní mykotoxikózy jsou vyvolány vysokým obsahem mykotoxinů v krmné dávce. Vlivem vysokých dávek dochází k rozsáhlému poškození jater, ledvin,

gastrointestinálního traktu a CNS. Dlouhodobé přijímání nízkých dávek toxinů v krmivu má v organismu teratogenní, mutagenní a karcinogenní účinky. Dále způsobuje oslabení imunitního systému a vede k dlouhodobému snižování užitkovosti (ŠIMBERDA a STRYK, 2010). ŠIMŮNEK (2003) uvádí, že mykotoxiny můžeme rozdělit dle toxicity kvalitativně na hepatotoxiny, nefrotoxiny, neurotoxiny, myotoxiny, toxiny zažívacího traktu, toxiny dýchacího aparátu, dermatoxiny, genitotoxiny a imunotoxiny (tab. 2)

Tab. 2: Rozdělení mykotoxinů dle toxicity - kvalitativní (upraveno dle ŠIMŮNKA, 2003)

PŮSOBENÍ	MYKOTOXIN
hepatotoxicky	aflatoxiny, sporidesminy
neurotoxicky	Tremogeny
nefrotoxicky	ochratoxin A, Carinin
toxiny zažívacího traktu	T2-toxin
toxiny dýchacího aparátu	Patulin
dermatotoxicky	Trichotgeceny
Genitotoxicky	Zearalenon
imunotoxicky	aflatoxiny, ochratoxin A

Tab. 3: Toxické koncentrace vybraných mykotoxinů v krmivech (ZEMAN *et al.*, 2006).

MYKOTOXIN	
Aflatoxiny	200 - 500 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Fumonisin	5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ – nepřezvýkavci 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ - přezvýkavci
deoxynivalenol	2 -10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

T2-toxin	100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Zearalenon	200 – 300 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

2.6.1 Vliv mykotoxinů na zdraví skotu

Vliv mykotoxinů na skot je spojen s významnými ekonomickými ztrátami. Krmnou dávku pro skot tvoří různé druhy objemné píce (siláže, seno a sláma), které mohou být kontaminovány plísněmi dále pak jaderným krmivem, v němž se mykotoxiny mohou vyskytovat také. Z tohoto důvodu je zvýšeno riziko vlivu mykotoxinů na skot v porovnání s ostatními zvířaty. Trávicí trakt přežvýkavců je tvořen předžaludkem, ve kterém probíhá mikrobiální trávení. Mikroorganismy v bacheru tráví velké množství vlákniny, dusíkatých látek a sacharidů v různé formě. Přirozená bacherová mikroflóra chrání organismus před vlivy cizorodých mikroorganismů a také se podílí na metabolismu toxinů rostlin. Přežvýkavci díky mikroorganismům jsou odolnější vůči působení mykotoxinů oproti monogastrům (DIAZ, 2005).

2.6.1.1 Toxicita deoxynivalenolu (DON) u skotu

SCHNEIDEROVÁ (2008) udává, že u dojnic je působení DON spojován se sníženou užitkovostí stáda. Dále uvádí, že DON způsobuje snížení příjmu krmiva u dojnic v období stání na sucho.

U přežvýkavců dochází ke sníženému příjmu krmiva a následně i ke snížení užitkovosti. V bacheru dochází k degradaci asi 50 % za 24 hod. Uvádí se, že jeho vylučování mlékem představuje 0,0001 % jeho dávky v krmivu (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

2.6.1.2 Toxicita ochratoxinu A (OTA) u skotu

Citlivost přežvýkavců vůči OTA je nižší, než například u kuřat, která jsou vůči působení OTA vysoce citlivá. Snížená citlivost je způsobena působením bacherové mikroflóry, která je schopna přeměnit OTA na méně toxický alfa ochratoxin. Při resorpci se v organismu váže na sérové bílkoviny (albuminy), (SUCHÝ a HERZIG 2005, DIAZ 2005).

2.6.1.3 Toxicita patulinu u skotu

Při krmení kontaminovanou siláží může u skotu vyvolat vnitřní krvácení. Mezi charakteristické klinické příznaky intoxikace patří špatná koordinace, paralýza a

degenerace neuronů mozkové kůry. Při akutní otravě patulinem byl zjištěn plicní edém (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

2.6.1.4 Toxicita T2-toxinu u skotu

SUCHÝ a HERZIG (2005) a SCHNEIDEROVÁ (2008) uvádí, že u skotu se intoxikace T2- toxinem projevuje gastroenteritidou, intestinální hemoragií, hematomy v oblasti pohlavních orgánů, poruchou imunity a krvetvorby. Sníží se příjem krmiva a následně se sníží i užitkovost. U telat se sníží koncentrace imunoglobulinů a některých proteinů v krevním séru.

2.6.1.5 Toxicita zearalenonu (ZEA) u skotu

Přežvýkavci mají vůči ZEA určitou toleranci, kdy v bachoru dochází k jeho degradaci. I přes tuto odolnost byly pod jeho vlivem pozorovány u dojnic poruchy plodnosti, zvýšení výskytu onemocnění mléčné žlázy (zvýšený počet somatických buněk v mléce), paznehtů a zhoršení vitality narozených telat (SUCHÝ a HERZIG, 2005). K další reakcím na ZEA patří zánět vagíny, špatná reprodukční schopnost a zvětšení mléčné žlázy u nezabřezlých jalovic (SCHNEIDEROVÁ, 2008).

2.6.2 Vliv mykotoxinů na zdraví prasat

Prasata jsou na výskyt mykotoxinů více citlivá než přežvýkavci. Jeden z důvodů je, že prasata mají jen jednoduchý žaludek. Nejčastěji na intoxikaci reagují zpomalením růstu a snížením imunity. Důležité je proto prokázat kontaminaci krmiva plísněmi a následně i mykotoxiny (JONES, 2007).

2.6.2.1 Toxicita deoxynivalenolu (DON) u prasat

U prasat je citlivost na DON vysoká. SUCHÝ a HERZIG (2005) uvádí, že se sníží, až úplně zastaví příjem krmiva, a sníží se přírůstek. Při vyšší koncentraci DON mohou prasata zvracet.

Podle SCHNEIDEROVÉ (2008) ovlivňuje DON serotogenní aktivitu nebo receptory serotoninu. I v nízké koncentraci mykotoxin způsobuje poruchy reprodukce u prasat.

Existují četné důkazy o tom, že přítomnost DON v krmivech pro prasata může způsobit zhoršení příjmu krmiva i hmotnostních přírůstků, zvracení, poškození zažívacího traktu. Údaje získané při nekropsii prasat konzumujících v přirozeně kontaminovaném krmivu až 4 ppm DON svědčí také o tom, že mykotoxiny způsobují podráždění žaludeční sliznice.

2.6.2.2 Toxicita ochratoxinu A (OTA) u prasat

OTA je příčinnou onemocnění ledvin u prasat, tzv. prasečí mykotoxinová nefropatie. Hlavní toxický vliv je v inhibici syntézy proteinu. Mykotoxin může snižovat přírůstek hmotnosti (SCHNEIDEROVÁ, 2008). Nefropatie se projevuje nadměrným příjmem tekutin (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

2.6.2.3 Toxicita T2-toxinu u prasat

Působení T2 – toxinu na prasata se projevuje sníženým příjmem krmiva, neplodností spojenou s poškozením vaječníků a dělohy (SCHNEIDEROVÁ, 2008). Dalšími charakteristickými příznaky jsou kožní a slizniční léze v horní části trávicího traktu (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

2.6.2.4 Toxicita zearalenonu (ZEA) u prasat

SUCHÝ a HERZIG (2005) a SCHNEIDEROVÁ (2008) uvádí, že prasata jsou nejcitlivější vůči působení mykotoxinu ZEA. U prepubertálních prasnic se intoxikace zevně projevuje otokem mléčné žlázy, zduřením a zjizvením struků, dále pak otokem vulvy. Může způsobit až vyhřeznutí vulvy a rekta. Vnitřně potom dochází vlivem estrogenního působení ke snížené reprodukci, perzistenci žlutého tělíska a k narušení říjového cyklu. U prasnic dochází k hyperestrogenitě, poruše reprodukčního cyklu a vulvovaginitidě. U vykrmovaných prasat může způsobovat vyhřeznutí rekta.

2.7 Stanovení mykotoxinů

Stanovení mykotoxinů v krmivu je poměrně nákladná záležitost. Je nutné zajistit taková vyšetření, která budou mít co nejvyšší vypovídací schopnost. Je velmi důležité uvědomit si, že kontaminace mykotoxiny není rozšířena rovnoměrně nebo homogenně. Z tohoto důvodu, je technika vzorkování rozhodující. Vzorkování vyžaduje odebrat několik menších vzorků (optimálně 20 dílčích vzorků, dle množství kontrolovaného krmiva), jejich sloučení a důkladné promíchání před získáním konečného, k analýzám použitelného vzorku. Pokud jde o stanovení mykotoxinů jsou metody, které vyžadují odlišné metodické postupy a jsou limitovány i vybavením laboratoří, např. semikvantitativní stanovení s koncovkou na kapalinovém chromatografu, nebo stanovení na tenké vrstvě (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

Pro stanovení mykotoxinů v obilovinách se nejvíce používají metody typů ELISA - imunochemická metoda a HPLC - chromatografická metoda (KŘÍŽOVÁ, 2013, SCHNEIDEROVÁ, 2008).

2.7.1 Metoda analýzy ELISA

Nejrozšířenější využívanou imunochemickou metodou je především metoda ELISA, a to především pro její vysokou citlivost, rychlost, selektivitu, přizpůsobivost a snadné rutinní postupy (OPLETAL, 2010). Častou chybou a příčinou rozdílů mezi výsledky získanými pomocí imunochemických a referenčních metod bývá kvantitativní interpretace výsledků, ležící mimo rozsah kvantifikace použitých kitů. Je třeba vždy zohlednit deklarovaný limit kvantifikace i hodnotu nejvyššího standardu kitu a v případě výsledků nad nebo pod tyto hranice analýzy opakovat za použití kitu s jiným kvantifikačním limitem nebo analyzovat ředěné vzorky. Vzhledem ke své podstatě, využívající antigenní reakci proteinu a z ní vyplývající citlivosti, jsou imunochemické metody velmi náročné na splnění podmínek prostředí, dodržení doporučených postupů, na kalibraci a validaci zařízení i na erudici laboratorního personálu. Značný vliv má druh analyzované matrice (POLIŠENIKÁ, 2011).

2.7.2 Metoda analýzy HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se řadí mezi analytické separační metody a využívá k separaci široké škály analytů. Během analýzy dochází k distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fázi (DOHNAL, 2013). Je to metoda, která je vysoce automatizovaná a velice citlivá (CLARK, 2007).

2.8 Normy mykotoxinů

Doporučené limity vybraných mykotoxinů dle Doporučení komise EU

Tab. 4: Deoxynivalenol

krmivo (88% sušina)	mg/kg
obiloviny a produkty z obilovin	8
Kukuřice	12
doplňková a kompletní krmiva	5

doplňková a kompletní krmiva pro prasata	0,9
doplňková a kompletní krmiva pro telata, jehňata a kůzlata	2

Tab. 5: Zearalenon

Krmivo (88% sušina)	mg/kg
obiloviny a produkty z obilovin	2
Kukuřice	3
doplňková a kompletní krmiva pro selata a prasničky	0,1
doplňková a kompletní krmiva pro prasnice a výkrm prasat	0,25
doplňková a kompletní krmiva pro telata, dojnice, ovce (jehňata) a kozy (kůzlata)	0,5

Tab. 6: Ochratoxin A

krmivo (88% sušina)	mg/kg
obiloviny a produkty z obilovin	0,25
doplňková a kompletní krmiva pro prasata	0,05
doplňková a kompletní krmiva pro drůbež	0,1

Tab. 7: Fumonisin B1 + B2

krmivo (88% sušina)	mg/kg
kukuřice a produkty z kukuřice	60
doplňková a kompletní krmiva pro drůbež	20
doplňková a kompletní krmiva pro prasata, koně, králíky	5
doplňková a kompletní krmiva pro telata, jehňata a kůzlata	20
doplňková a kompletní krmiva pro dospělé přežvýkavce	50

2.9 Prevence kontaminace mykotoxiny

Tvorbu mykotoxinů je možno potlačit nebo i úplně eliminovat. Výskyt plísní a následně i mykotoxinů lze ovlivnit během jednotlivých fází procesu výroby krmiv i potravin. Jednoznačně největší význam na růst plísní a následnou produkci mykotoxinů má počasí, dále pak osevní postupy a polní podmínky. Jediný faktor, který nelze ovlivnit, je počasí. Dále záleží na způsobu obdělávání půdy, uskladnění komodit, procesu výroby krmiv, distribuce ke spotřebiteli a následné uskladnění krmiva (FLORIÁN *et al.*, 2013). Je tedy důležité sledovat množství a výskyt mykotoxinů na všech úrovních rostlinné produkce a výroby (HAVLÍK, 2010). Eliminace vzniku optimálních podmínek prostředí pro růst a vývoj plísní je nejlepším způsobem prevence. Za optimální podmínky je považována především vlhkost a teplota. Mohou to být i další faktory, jako například odolnost rostliny, množství počátečního infekčního substrátu a další. Všeobecně platí, že dodržování zásad správné zemědělské a zpracovatelské praxe, je základem prevence výskytu mykotoxinů (PRUGAR *et al.*, 2008).

Množství mykotoxinů v kontaminované surovině lze snížit jen omezeně, protože to jsou sloučeniny velmi stabilní. V závislosti na druhu mykotoxinů se během zpracování rozkládají částečně nebo vůbec. Výjimkou může být patulin, který je do určité míry termolabilní, a proto lze tepelnou úpravou značně snížit (PRUGAR *et al.*, 2008, SCHNEIDEROVÁ, 2008). V roce 2001 vydala FAO (Food & Agriculture Organization) směrnici o aplikaci postupů HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) za účelem prevence a likvidace mykotoxinů (SCHNEIDEROVÁ, 2008).

HACCP je systém stanovení kritických kontrolních bodů, který je nástrojem zajištění a řízení kvality a zdravotní nezávadnosti potravin během všech činností, které souvisejí s výrobou, zpracováním, skladováním, manipulací, přepravou a prodejem finálnímu zákazníkovi, tedy spotřebiteli. Tento systém je založený na prevenci. (SOVJAK a RESNEROVÁ, 2001)

2.10 Dekontaminace mykotoxinů

Dekontaminace je proces, který řeší již přítomnost mykotoxinů v krmivu. V dnešní době je nutné se intenzivně zabývat zkoumáním všech dekontaminačních metod, neboť neexistuje způsob prevence, který by úplně zabránil růstu plísní a následné produkce

mykotoxinů. V současnosti neexistují univerzální metody dekontaminace pro inaktivaci mykotoxinů. Je to dáno širokou škálou druhů mykotoxinů a jejich různorodé odolnosti vůči fyzikálním, chemickým a biologickým faktorům (DOLEŽAL, 2012).

K neutralizaci již kontaminovaného krmiva mykotoxiny se dnes využívá fyzikálních, chemických a biologických metod. Mykotoxiny jsou látky stabilní, ale i přes tuto stabilitu je lze degradovat (RADA, 2012).

U čerstvých a konzervovaných objemných krmiv jsou jen omezené možnosti využití metod dekontaminace. Toto omezení je dáno především vysokou ekonomickou náročností, která je spojená s dekontaminací velkého množství konzervovaných objemných pícnin. Proto se používají jen ty, které jsou ekonomicky únosné (DOLEŽAL, 2012).

2.10.1 Fyzikální způsoby dekontaminace

Většina mykotoxinů má pevnou chemickou strukturu, díky které mají velkou stabilitu vůči působení vysokých teplot nebo při nízkých hodnotách pH. Některé mykotoxiny lze rozložit horkem (citrin, patulin) nebo kombinací tlaku a tepla. Ostatní druhy mykotoxinů (DON, ZEA, OTA) jsou termostabilní.

Ultrafialové a ionizující záření může být při degradaci některých mykotoxinů účinné, ale zároveň dochází ke ztrátě živin v krmivu.

Sorbenty jsou minerální látky, které mají schopnost vázat nebo absorbovat molekuly mykotoxinů. Takto vyvázané mykotoxiny nemohou být ve střevě vstřebány a jsou vyloučeny z těla výkaly. Lze použít syntetické zeolity a minerální jíly. Účinnost sorbentů je dána absorpční kapacitou, druhem mykotoxinu, molekulární struktúře sorbentu (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

2.10.1.1 Absorbenty – bentonit

Bentonit je vysoce absorpční hornina, která je směsí jílových nerostů. Jeho struktura je dvojrozměrná vrstevnatá. Mezi vrstvami SiO_2 a $\text{Al}(\text{OH})_3$ poutá vodu a různé ionty. Jeho podstatou je montmorillonit, hydratovaný křemičitan hlinitý, nerost příbuzný kaolinitu. Bentonit se může přidávat ve 2-3% ze sušiny krmné dávky (ZEMAN *et al.*, 2006).

2.10.1.2 Absorbenty - zeolity

Zeolity jsou účinnější než bentonit. Jsou to aluminosilikátové horniny obsahující trojrozměrné krystaly s póry. Ve velkých mezerách krystalové mřížky se nachází molekuly vody, které se dají snadno vypudit, aniž by se poškodila struktura. Dovnitř krystalové mřížky se vážou ionty (ZEMAN *et al.*, 2006).

2.10.1.3 Absorbenty – aktivní uhlí

Aktivní uhlí je ve vodném roztoku schopné za *in vitro* podmínek, což znamená v laboratorních podmínkách ve zkumavce, lze efektivně absorbovat většinu mykotoxinů. V případě však *in vivo* podmínek, což znamená v organismu zvířete, žádný vliv u různě aktivovaného uhlí pozorován nebyl (RADA, 2012)

2.10.2 Chemické způsoby dekontaminace

Chemická dekontaminace zahrnuje extrakci s použitím organických rozpouštědel, uplatnění vodných roztoků chloridu vápenatého nebo bikarbonátu sodného, horké vody se solí apod. Tato relativně ekonomická opatření, ale způsobují určité problémy ve výživě zvířat. Ošetření amoniakem a monomethylaminem a hydroxidem vápenatým může být efektivní za kontrolovaných podmínek. Mezi účinná a ekonomická opatření patří čpavkování, které rozkládá aflatoxiny, ale vznikají mutagenní produkty, které zvířatům škodí (SUCHÝ a HERZIG, 2005).

2.10.3 Biologické způsoby dekontaminace

Jako biologickou dekontaminaci lze využít antagonistické mikroorganismy a jejich produkty, např. kvasinkové kultury (*Saccharomyces cerevisiae*, pивní kvasinky). Využit se dají i sorpční schopnosti buněčných stěn kvasinek (olygosacharidy zejména ze skupiny glukomananů). Lze využít i některé bakteriální kultury *Lactobacillů* (*Lactobacillus rhamnosus* schopnost vázat aflatoxiny a trichotheceny). Patulin se rozkládá při alkoholickém kvašení účinkem kvasinek rodu *Saccharomycetes*. Zvýšený obsah vlákniny v krmivu může částečně vázat např. zearalenon a T-2 toxin (DOLEŽAL, 2012)

Adsorpce a enzymatická detoxikace mykotoxinů byla popsána u řady mikroorganismů, jak např. půdních hub, tak i některých mikroorganismů přirozeně se vyskytujících v trávicím traktu zvířat (RADA, 2012).

2.11 Degradace mykotoxinů v bachoru skotu

V porovnání s monogastry je skot vůči některým mykotoxinům odolnější, protože jejich bachorová mikroflóra tyto látky rozkládá a likviduje (NEDĚLNÍK a MORAVCOVÁ, 2005). Uvádí se, že DON je zcela transformován na de-epoxy-DON mikroflórou bachoru a střev (AWAD *et al.*, 2005). Skot má díky pufrovací schopnosti a aktivitě bachorové mikroflóry určitou schopnost redukovat a tolerovat i vyšší hladiny mykotoxinů, zejména ochratoxinu a zearalenonu. Bachorové mikroorganismy dokáží metabolizovat tyto toxiny na neškodné netoxické metabolity. I přes tyto schopnosti aflatoxiny u přežvýkavců snižují produkci těkavých mastných kyselin v bachoru a tím negativně ovlivňují využití krmiva a produkci mléka, dále pak poruchy metabolismu, kdy inhibují proteosyntézu, metabolismus lipidů, zvyšují procento zmetání, výhřezů rekta. U telat vedou k anorexii, průjmům a zpomalení růstu (DOLEŽAL *et al.*, 2006).

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovení degradovatelnosti vybraných mykotoxinů metodou *in vitro* na přístroji Daisy II.

4 MATERIÁL A METODIKA

Do experimentu byly zařazeny vzorky ječmene z lokality Libčany (Czech Republic) ze sklizně 2012. Ječmen byl uměle ošetřen *Fusarium culmorum* (W.G.Sm. Sacc. kmen KM16902; DON chemotyp.). Inokulace suspenzí konidií patogenního izolátu druhu *F. culmorum* (koncentrace 0,5 mil. konidií/1 ml inokula; postřiková dávka 200 l.ha⁻¹) byla provedena podle metodiky Tvarůžek *et al.* (2012) v optimální vegetační fázi. Pokud v období inokulace panovalo suché a slunečné počasí, byl před inokulací proveden postřik porostů čistou vodou. Následně bylo na ječmen aplikováno chemické ošetření pomocí fungicidů. První skupina byla bez ošetření a sloužila jako kontrolní. Druhá skupina ječmenů (varianta A) byla ošetřena přípravkem Hutton (0,8 l/ha, v BBCH 36) + Zantara (1,5 l/ha, v BBCH 65). Třetí skupina ječmenů (variant B) byla ošetřena pomocí kombinace Hutton (0,8 l/ha, v BBCH 36) + Prosaro EC250 (0,75 l/ha, v BBCH 65).

Složení fungicidů:

Hutton - účinné látky:

Prothiokonazol 100 g/l (RS)-2-[2-(1-chlorcyklopropyl)-3-(2-chlorfenyl)-2-hydroxypropyl]-2,4-dihydro-1,2,4-triazol-3-thion

Spiroxamin 250 g/l [(8-terc-butyl-1,4-dioxaspiro[4.5]dekan-2-yl)methyl]ethyl(propyl)amin

Tebukonazol 100 g/l (RS)-1-p-chlorofenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-pentan-3-ol

Prosaro 250 EC - účinné látky:

Prothiokonazol 125 g/l (RS)-2-[2-(1-chlorcyklopropyl)-3-(2-chlorfenyl)-2-hydroxypropyl]-2,4-dihydro-1,2,4-triazol-3-thion

Tebukonazol 125 g/l (RS)-1-p-chlorofenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-pentan-3-ol

Zantara - účinné látky:

Bixafen 50 g/l N-(3,4-dichloro-5-fluorobiphenyl-2-yl)-3-(difluoromethyl)-1-methylpyrazole-4-carboxamide

Tebukonazol 166 g/l (3-1-(4-chlorfenyl)-4,4-dimethyl-3-[(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)]pentan-3-ol

Před samotnou inkubací (v Daisy II) byl u všech vzorků ječmene proveden rozbor na obsah jednotlivých mykotoxinů. Z každé skupiny ječmenů byly odebrány tři vzorky, které byly analyzovány. Výsledky průměrných koncentrací mykotoxinů jsou uvedeny v tabulce 8.

Vzorky ječmene byly pomlety na laboratorním mlýnku velikosti ok 1 mm. Pro inkubaci byl použit přístroj Daisy II Incubator - ANKOM Technology, New York. Na inkubaci byly použity 4 gramy pomletého vzorku, které byly rozděleny do inkubačních sáčků – F57 (Ankom, Makedonie) v množství 0,25 g na jeden inkubační sáček. Inokulace byla 30 dní.

Příprava roztoků

Na jednu inkubaci bylo použito 1,5 litru roztoku. Při přípravě roztoku pepsinu se 3 gramy pepsinu (*Pepsin from porcine gastric mucosa* 800 – 2500 units/mg protein – (Sigma-Aldrich, Germany) rozpustily v 1,5 litru 0,1 M – HCl ohřáté na 40 °C a ihned se použily k inkubaci. Acetátový pufr (pH 4,6): 1,2 g octanu sodného (3 H₂O) bylo rozpuštěno v 1,5 l destilované vody. Hodnota pH byla upravena kyselinou octovou, nebo roztokem NaOH. Při přípravě roztoku celulázy bylo rozpuštěno 1,5 g celulázy (*Cellulase Trichoderma viride*, 3-10 units/mg solid - Sigma Aldrich, Germany) v 1,5 litru acetátového pufru ohřátého na 40 °C následně byla zahájena inkubace. Inkubace trvala 24 hodin při teplotě 37°C. Získané kultivované tekutiny byly podrobeny analýzám na koncentraci mykotoxinů.

Tab. 8: Koncentrace detekovaných mykotoxinů v kontrolní, A a B variantě fungicidního ošetření

Mykotoxiny	Varianta fungicidní ošetření		
	Kontrola	A	B
Deoxynivalenol	12360,9 ± 2045,5	19852,7 ± 2173,8	11287,2 ± 2718,8
deoxynivalenol-3-glukosid	6774,5 ± 502,5	9042,7 ± 678,3	5035,3 ± 494,9
3-acetyl-deoxynivalenol	1449,4 ± 219,4	1969,8 ± 257,4	1135,8 ± 230,3
Zearalenon	3737,5 ± 880,3	4096,3 ± 702,9	2947,2 ± 704,0
Beta-zearalenon	89,9 ± 18,2	107,3 ± 16,5	58,8 ± 8,1
Alternariol	56,3 ± 12,1	13,5 ± 5,2	12,1 ± 4,2
Alternariol-methylether	2,3 ± 0,9	2,6 ± 0,9	2,4 ± 0,1
Enniatin B	391,5 ± 102,7	432,4 ± 109,2	460,3 ± 104,3
Enniatin A	4,5 ± 2,8	4,7 ± 3,3	5,5 ± 3,0
Enniatin A1	25,8 ± 12,4	27,7 ± 18,3	32,4 ± 13,0

Stanovení mykotoxinů

Pevné vzorky - extrakce

2 g vzorku ječmene byly naváženy do PTFE centrifugační kyvety (50 ml), následoval přídavek 10 ml okyselené destilované vody (0,2% kyselina mravenčí), vzorek se protřepal, uzavřel a nechal 30 minut stát z důvodu důkladného smočení matrice. Ke vzorku s vodou se poté přidalo 10 ml acetonitrilu následovaná extrakcí na laboratorní třepače po dobu 30 min (240 RPM). Do kyvety byly přidány 4 g MgSO₄ a 1 g NaCl a intenzivně protřepáno po dobu 1 minuty. Takto připravený vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut (10,000 RPM). Po odstředění byl odebrán vzorek (cca 1,5 ml) pro přečištění pomocí mikrofiltru s pórovitostí 0,2 μm (centrifugace 2 min, 5,000 RPM). Takto připravený vzorek byl převeden do vialky a připraven k analýze. Vzorky ve skleněných vialkách byly před analýzou skladovány při teplotě -18°C. Pro

identifikaci a kvantitativní stanovení stanovovaných mykotoxinů je využito instrumentace ultra-účinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC® System (Waters, Milford, MS, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® (AB Sciex, Toronto, ON, Kanada). Ke zpracování naměřených dat se používá program Analyst® (Thermo Fisher Scientific).

Kapalné vzorky

Kapalné vzorky byly před vlastní instrumentální analýzou přečištěny pomocí mikrofiltru s pórovitostí 0,2 µm (centrifugace 2 min, 5,000 RPM). Dále byly stejně jako pevné vzorky skladovány při teplotě -18°C a měřeny s využitím instrumentace sestávající se z ultra-účinného kapalinového chromatografu Acquity UPLC® System (Waters, Milford, MS, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® (Applied Biosystems, Toronto, ON, Kanada).

Stanovované mykotoxiny

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

Statistika

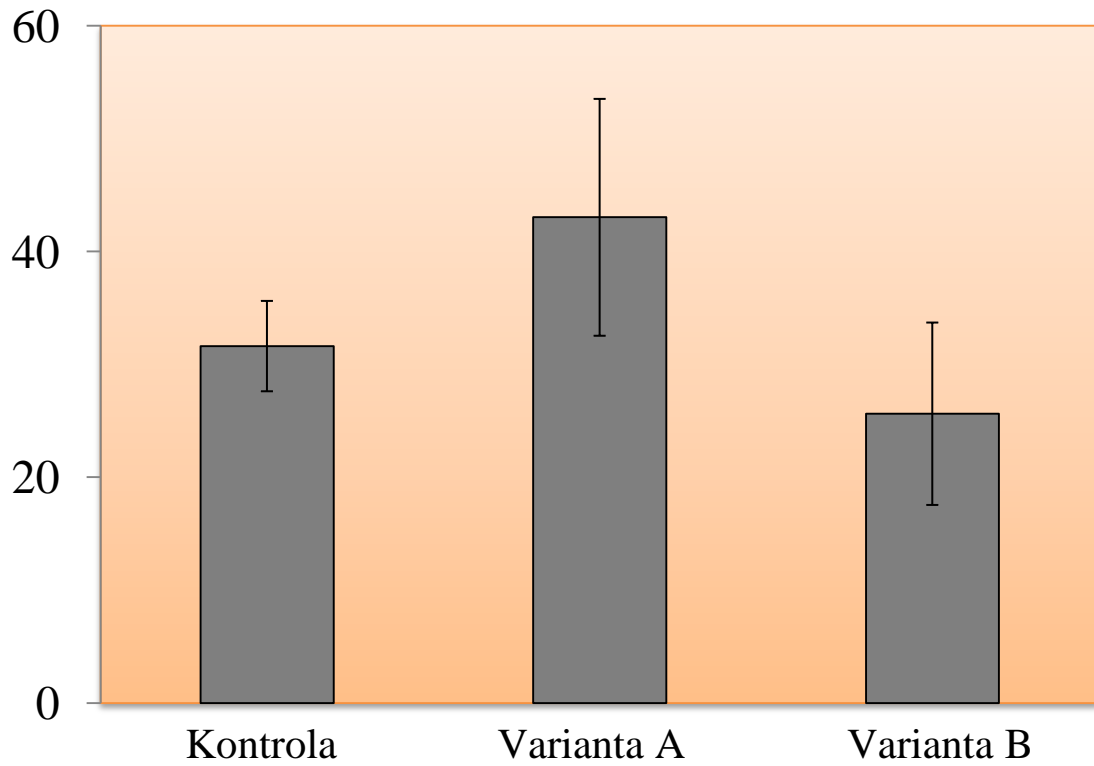
Údaje byly zpracovány statisticky pomocí STATISTICA.CZ, verze 10.0 (Česká republika). Výsledky jsou vyjádřeny jako střední hodnota z měření +/- směrodatná odchylka. Statistická významnost byla stanovena porovnáním základní rozdíly mezi jednotlivými skupinami pomocí ANOVA a Scheffe metoda pro vybrané mykotoxiny. Rozdíly $P < 0,05$ byly považovány za významné.

5 VÝSLEDKY

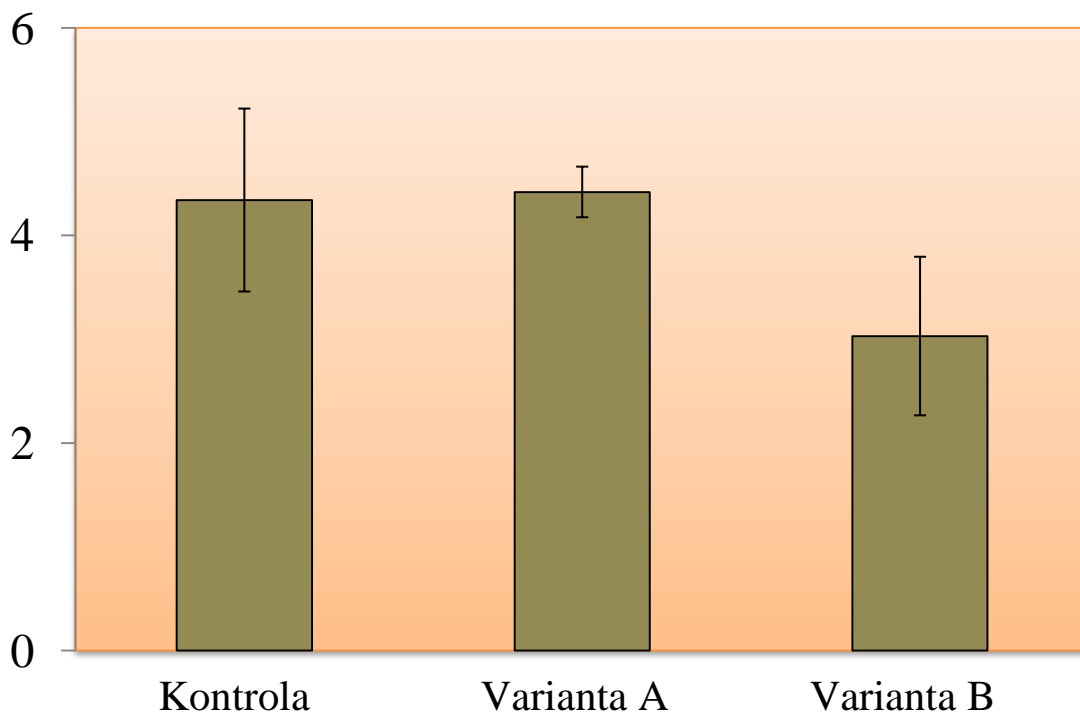
Při analýze inkubovaných tekutin byly detekovány tyto mykotoxiny: deoxynivalenol, zearalenon, deoxynivalenol-3-glukosid, 3-acetyl-deoxynivalenol. Mykotoxiny, které byly analyzovány v původní hmotě ječmene beta-zearalenol, alternariol, alternariol-methylether, enniatin B, enniatin A, enniatin A1 byly pod hranicí detekce, což vypovídá o skutečnosti, že uvedené mykotoxiny jsou trávicími enzymy z velké části eliminovány.

Nejvyšší koncentrace deoxynivalenolu byla naměřena u fungicidně ošetřené varianty A (o 36 %) v porovnání s kontrolní skupinou ječmenů. Naopak varianta B měla nižší koncentraci deoxynivalenolu o 19 % (graf 1). Při hodnocení hladiny zearalenonu v inkubační tekutině byla sledována u kontrolní a fungicidní varianty A prakticky shodná hodnota tohoto mykotoxinu. Varianta B měla v porovnání s kontrolní skupinou o 30 % nižší hladinu zearalenonu v inkubační tekutině (graf 2). V inkubační tekutině byly dále detekovány následující dva maskované mykotoxiny deoxynivalenol-3-glukosid a 3-acetyl-deoxynivalenol. Deoxynivalenol-3-glukosid (graf 3) byl u varianty A navýšen o 12 % ve srovnání s kontrolní skupinou. Varianta B měla signifikantně nižší hladinu tohoto mykotoxinu o 37 % ($P < 0,05$). Nejvyšší koncentrace 3-acetyl-deoxynivalenol byla naměřena u varianty A (o 39 %). Varianta B měla množství tohoto mykotoxinu v inkubační tekutině navýšeno o 12 % ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 4).

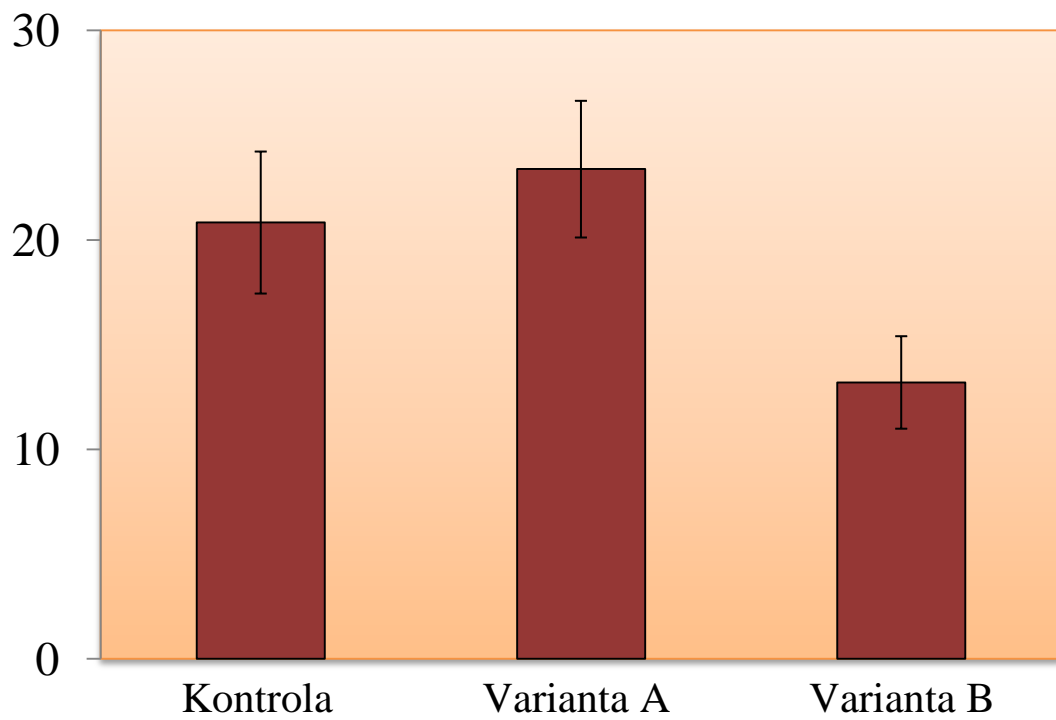
Graf 1: Koncentrace deoxynivalenolu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)



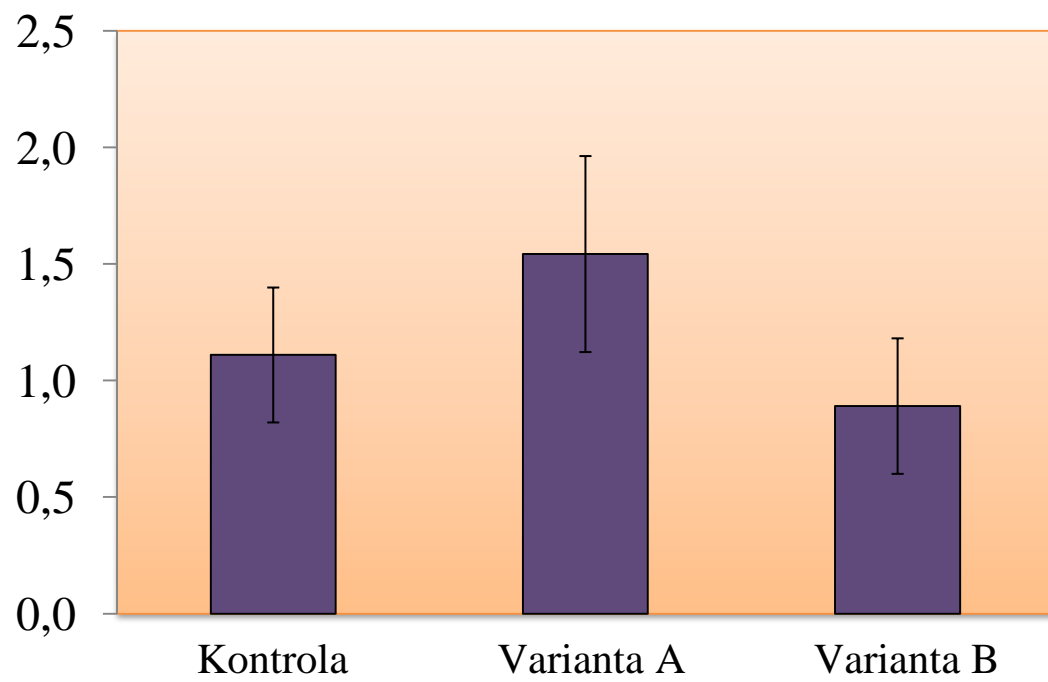
Graf 2: Koncentrace zearalenonu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)



Graf 3: Koncentrace deoxynivalenol-3-glukosidu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)



Graf 4: Koncentrace 3-acetyl-deoxynivalenol ($\mu\text{g}/\text{kg}$)



6 DISKUZE

V našem experimentu byl porovnáván vliv fungicidního ošetření na stravitelnost jednotlivých mykotoxinů v inkubátoru Daisy II. V inkubační tekutině byly detekovány tyto mykotoxiny: deoxynivalenol, zearalenon, deoxynivalenol-3-glukosid, 3-acetyl-deoxynivalenol. V experimentu ve kterém byly fusariové toxiny přidávány do krmné dávky přežvýkavců v množství 60 a 30 %, byla sledována snížená syntéza mikrobiálního proteinu. V bacherovém prostředí došlo k podstatnému snížení fusariových mykotoxinů (Hildebrand *et al.*, 2012). V našem experimentu byl sledován obdobný efekt při působení enzymů (celuláza, pepsin) na uvolňování mykotoxinů do bacherového prostředí. Při inkubaci zaplísňeného krmiva (po dobu 24 hodin) na bázi ječmene, řepkových pokrutin, vojtěškového sena a ječmenné slámy (výskyt plísní 70 %), nebyla ovlivněna degradace sušiny jednotlivých složek diety. Výskyt mykotoxinů v tomto experimentu nebyl sledován (Undi *et al.*, 1996). Podle Zemana *et al.* (2006) jsou mykotoxiny v bacheru degradovány na jejich deriváty s různou účinností aflatoxin 0-30 %, deoxynivalenol 0-50 %, T-2 toxin 0-70 %, zearalenon 0-40 %, fumonisin 0-35 %, ochratoxin A 50-100 %. Vnímavost zvířat k mykotoxinům je rozdílná. Nejméně náchylní jsou přežvýkavci, neboť díky pufrální schopnosti bacheru mají schopnost redukovat a tolerovat i vyšší hladiny mykotoxinů. Bacherové mikroorganismy evidentně metabolizují tyto toxiny na netoxické metabolity. S těmito závěry můžeme souhlasit i v porovnání s naším experimentem. Po inkubaci ve směsi enzymů (pepsin, celuláza) byly s vysokou účinností degradovány tyto mykotoxiny: beta-zearalenol, alternariol, alternariol-methylether, enniatin B, enniatin A, enniatin A1. Deoxynivalenol, zearalenon, deoxynivalenol-3-glukosid, 3-acetyl-deoxynivalenol byly v původní hmotě ječmene ve velmi vysokých koncentracích to je pravděpodobně důvod proč byly analyzovány i v inkubační tekutině. Ze závěrů jiných studií vyplývá, že bacherové prostředí zcela eliminovalo mykotoxin ochratoxin A, kterým byla infikována pšeničná sláma (Abdelahamid *et al.*, 1996). Berthiller *et al.* (2011) zkoumali hydrolyzu deoxynivalenol-3-glucoside v žaludku monogastrů (in vitro) zpět na původní mykotoxin (deoxynivalenol). Deoxynivalenol-3-glucoside byl odolný vůči kyselému prostředí žaludku, zde byl inkubován v 0,2 M kyselině chlorovodíkové po dobu 24 hodin při 37 °C. Naopak některé bakterie mléčného kvašení dokázaly hydrolyzovat deoxynivalenol-3-glucoside zpět na deoxynivalenol. Awad *et al.* (2010) ve své práci uvádí, že složení mikroflóry v bacheru a trávicím traktu je schopno zcela přeměnit deoxynivalenol na de-

epoxy-deoxynivalenol a může snižovat toxické účinky deoxynivalenolu na organismus zvířat. Rodrigues (2014) a Awad *et al.* (2010) se ve svých pracích shodují, že na degradaci mykotoxinů, především tedy deoxynivalenolu, je u skotu závislá na složení bacherové mikroflóry, její stabilitě a hodnotě pH. Hodnota pH následně i složení mikroflóry se odvíjí dle složení krmné dávky. Degradaci zearalenonu v bacheru skotu metodou *in vitro* se zabýval ve své práci Long *et al.* (2012), kdy zjišťoval schopnost *Lactobacillus sp.* detoxikovat zearalenon. V práci potvrdil degradaci, bez produkce vedlejších produktů a bez snížení životaschopnosti bakterií. Dalo by se tedy říci, pokud by náš pokus probíhal metodou *in vivo*, mohly by být výsledky degradace mnohem vyšší než v podmínkách *in vitro*.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit míru uvolňování vybraných druhů mykotoxinů metodou *in vitro* pomocí přístroje Daisy II. Do experimentu byly zařazeny vzorky ječmene, které byly uměle infikovány plísní *Fusarium culmorum*. Následně po uplynutí doby inokulace byl porost rozdělen na tři skupiny. První skupina byla kontrolní, přičemž nebyla ošetřena žádným fungicidem. Druhá skupina ječmenů (varianta A) byla ošetřena fungicidem Hutton + Zantara. Na třetí skupinu ječmenů byl aplikován fungicid Hutton + Prosaro. Po sklizení a uplynutí doby vydýchávání zrn byly z jednotlivých skupin odebrány 3 vzorky, které se analyzovaly na obsah jednotlivých mykotoxinů. Pro inkubaci byl použit přístroj Daisy II Inkubator za použití enzymů celulózy a pepsinu.

Při analýze inkubovaných tekutin byly detekovány mykotoxiny deoxynivalenol, zearalenon, deoxynivalenol-3-glukosid, 3-acetyl-deoxynivalenol. Mykotoxiny, které byly analyzovány v původní hmotě ječmene beta-zearalenol, alternariol, alternariol-methylether, enniatin B, enniatin A, enniatin A1 byly pod hranicí detekce, což vypovídá o skutečnosti, že uvedené mykotoxiny jsou trávicími enzymy z velké části eliminovány. Ječmen druhé skupiny, který byl ošetřen kombinací fungicidů Hutton a Zantara, měl vyšší obsah mykotoxinů než skupina kontrolní a než skupina třetí.

Při použití metody *in vivo* by se dala předpokládat vyšší degradace některých mykotoxinů, protože některé druhy mikroorganismů v bachoru mají schopnost mykotoxiny detoxikovat na neškodné metabolity. Z toho důvodu by bylo dobré pokus zopakovat na živém organismu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDELHAMID, A. M., S. A. EL-AYOUTY a H. H. EL-SAADANY. The influence of contamination with separate mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A, citrinin, patulin, penicillic acid or sterigmatocystin) on the in vitro dry matter and organic matter digestibilities of some roughages (berseem hay and wheat straw). *Archiv für Tierernaehrung*. 1992, **42**(2), 179 - 185.

AWAD, W. A., K. GHAREEB a J. ZENTEK. Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2010, **27**(4), 510 - 520.

BENEŠOVÁ, K., M. BOLECHOVÁ, S. BĚLÁKOVÁ. Studium vybraných „emerging“ mykotoxinů v ječmeni a ve sladu, 2014 [cit. 2016-02-06].

BERTHILLER, F., C. CREWS, C. DALL'ASTA, G. HAESAERT, P. KARLOVSKY, I. OSWALD, W. SEEDELDER, G. SPEIJERS, J. STROKA. Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research* 57.1 (2013): 165- 186.

BETINA V. Mykotoxíny: chémia – biológia – ekológia. Bratislava: Alfa, 1990. 284 s.

CLARK, J. High performance liquid chromatography - HPLC [online]. 2007 [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>

DIAZ, D. E. *The mycotoxin blue book*. Reprinted. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2005. ISBN 19-047-6119-4.

DOHNAL, V. a I. KADLEČKOVÁ. Analýza látek pomocí HPLC [online]. 2013 [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analýza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox17102013.pdf

DOLEŽAL, P., L. ZEMAN, J. SKLÁDANKA, L. KALHOTKA a J. DVOŘÁČEK. Nebezpečí v krmivech má hodně podob. *Zemědělec* [online]. 2006 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/nebezpeci-v-krmivech-ma-hodne-podob/>

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

GALAVERNA, G., C. DALL'ASTA, M. MANGIA, A. DOSSENA a R. MARCHELLI. Masked Mycotoxins: an Emerging Issue for Food Safety. *Czech Journal Food Sciences* [online]. 2009, **27**, 89-92 [cit. 2016-02-06]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/07592.pdf>

GEYS, J., B. HUYBRECHTS a E. GOOSSENS. Simultaneous determination of masked forms of deoxynivalenol and zearalenone after oral dosing in rats by LC-MS/MS. *World mykotoxin journal*. 2012, **5**(3), 303-318.

HAJŠLOVÁ, J., M. ZACHARIÁŠOVÁ, A. MALACHOVÁ, M. KOSTELANSKÁ, V. KOCOUREK. *Mykotoxiny*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2009 [online]. [cit. 2016-1-18]. Dostupné z <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf>

HILDEBRAND, B., J. BOGUHN, S. DANICKE, M. RODEHUTSCORD.. Effect of Fusarium toxin-contaminated triticale and forage-to-concentrate ratio on fermentation and microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2012, **96**: 307-318

CHRPOVÁ, J. *Možnosti snížení rizika napadení obilnin klasovými fuzariózami*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2007, 18 s. ISBN 978-80-87011-33-1.

JONES, F. T., M. B. GENTER a W. M. HAGLER. Understanding and coping with effects of mycotoxins in livestock feed and forage [online]. *North Carolina cooperative extension service*, 2007, [cit. 2016-01-18]. Dostupné z: http://www.cals.ncsu.edu/an_sci/extension/animal/nutr/Understanding_mycotoxins.pdf. Helping people put knowledge to work. North Carolina state University.

KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. české vyd. Praha: Galén, c2005, xv, 654 s. ISBN 80-7262-341-9.

KŘÍŽOVÁ L. Vliv výživy hospodářských zvířat na kvalitu živočišných produktů s důrazem na zdraví člověka. In: *Agrovýzkum: Výzkumný ústav pro chov skotu* [online]. Rapotín, 2013, [cit. 2016-01-18]. Dostupné z: http://www.vuchs.cz/akce/2009-11_2010-03-Vliv-vyzivy-hospodarskych-zvirat-na-kvalitu-zivocisnych-produktu/prezentace.html

LONG, M., P. LI, W. ZHANG, X. LI, Z. WANG a G. LIU. Removal of zearalenone by strains of *Lactobacillus* sp. isolated from rumen in vitro. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012, **14**(11), 2417 - 2422.

MALÍŘ, F. a V. OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, 349 s. ISBN 80-7013-395-3.

NAGL, V., B. WOECHTL, H. E. SCHWARTZ-ZIMMERMANN a I. HENNIG-PAUKA. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicology Letters*. 2014, **229**(1), 190-197.

NEDĚLNÍK, J. a H. MORAVCOVÁ. Problematika výskytu mykotoxinů v krmivech pro dojnice. *Veterinářství* [online]. 2005 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/problematika-vyskytu-mykotoxinu-v-krmivech-pro-dojnice/>

OPLETAL, L. a V. SKŘIVANOVÁ (eds.). *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010, 653 s. ISBN 978-80-246-1801-2.

OSTRÝ, V. Plísňe, potraviny a pokrmy v provozovnách stravovacích služeb [online]. [cit.2015-11-18]. Dostupné z: http://www.khshk.cz/elearning/kurs7/kapitola_47__rod_penicillium.html

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin.*, 2000, vol. 56, no. 1, 184 – 192.

POLIŠENSKÁ I. Doporučení pro laboratorní praxi pro provádění analýz mykotoxinů s využitím elisa kitů [online]. 2011 [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: <http://www.vukrom.cz/doporuceni>

RADA, V. a J. HAVLÍK. Transformace mykotoxinů střevními mikroorganismy. In: VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v. v. i. Transformace mykotoxinů střevními 46 mikroorganismy: Mykotoxiny studie 2012 [online]. Praha, s. 68 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Mykotoxiny%20studie%202012.pdf

RAI, M. a A. VARMA. *Mycotoxins in food, feed and bioweapons*. Heidelberg: Springer, c2010. ISBN 978-3-642-00724-8.

RODRIGUES, I. A.. Review on the effects of mycotoxins in dairy ruminants. *Animal Production Science*. 2014, **54**(9), 1155 -1165.

SCHNEIDEROVÁ P. Bezpečnost krmiv a zdraví zvířat – mykotoxiny [online]. 2008 [cit. 2015-11-12]. Dostupné z: < www.agronavigator.cz >

SKLÁDANKA J., V. ADAM, J. NEDĚLNÍK, R. KIZEK, H. LINDUŠKOVA, J. E. A. MEJIA a A. NAWARATH. How Do Grass Species, Season and Ensiling Influence Mycotoxin Content in Forage?. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013, č. 10.

SOVJAK, R. a H. REISNEROVÁ. *Hygiena a zdravotní nezávadnost potravin*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2001. ISBN 80-213-0716-1.

SUDAKIN, D., P. FALLAH. Toxigenic fungi and mycotoxins in outdoor, recreational environments. *Clin Toxicol*. 2008, **46** (8), 738 – 744.

SUCHÝ, P. a I. HEZIG. Plísně a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech [online]. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby Přátelství 815, Praha - Uhřetěves, PSČ: 104 01, 2005 [cit. 2016-02-07]. Dostupné z: <http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Hezig,%20Such%C3%BD-Plisne%20a%20mykotoxiny.pdf>

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2002, 84, 31 – 313, ISBN 80-200-1024-6.

ŠIMBERDA B. a J. STRYK. Nežádoucí fungální metabolity v krmivech a průmyslové metody jejich eliminace. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010, s. 479-515. ISBN 9788024618012.

ŠIMŮNEK J. Mykotoxiny [online]. 2003 [cit. 20110330]. Dostupné z:
<http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/mtobec.htm>

ŠIRUČKOVÁ, I. a P. KROUTIL. Fuzariózy na obilninách [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, 2007, [cit. 2015-11-18].

TVARŮŽEK, L., P. MATUŠINSKY a M. VYŠOHLÍDOVÁ. *Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s umělou inokulací obilnin fuzariózami klasů*. Kroměříž, 2012, 16 s. ISBN 978-80-87555-08-8.

UNDI, M., K. M. WITTENBERG. Intake, rumen fermentation characteristics, and feedstuff in situ digestion kinetics as influenced by fungal biomass in alfalfa hay fed to cattle, *Animal Feed Science and Technology*. 1996, 61, 291-303.

VEJL, P., S. SKUPINOVÁ a J. VOPRŠAL. Detekce fusarium culmorum v infikovaných klasech a obilkách pšenice pomocí specifické PCR [online]. 2000, 2015-11-18 [cit. 2015-11-18].

ZEMAN L., P. DOLEŽAL, A. KOPŘIVA, E. MRKVICOVÁ, J. PROCHÁZKOVÁ, P. RYANT, J. SKLÁDANKA, E. STRAKOVÁ, P. SUCHÝ, P. VESELÝ, J. ZELENKA. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. Praha: Profi Press, 2006. 360 s.

9 SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

9.1 Seznam tabulek

Tab. 1. Plísňe a mykotoxiny

Tab. 2: Rozdělení mykotoxinů dle toxicity - kvalitativní

Tab. 3: Toxické koncentrace vybraných mykotoxinů v krmivech

Tab. 4: Deoxynivalenol

Tab. 5: Zearalenon

Tab. 6: Ochratoxin A

Tab. 7: Fumonisy B1 + B2

Tab. 8: Koncentrace detekovaných mykotoxinů v kontrolní, A a B variantě fungicidního ošetření

9.2 Seznam grafů

Graf 1: Koncentrace deoxynivalenolu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Graf 2: Koncentrace zearalenonu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Graf 3: Koncentrace deoxynivalenol-3-glukosidu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Graf 4: Koncentrace 3-acetyl-deoxynivalenol ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

10 SEZNAM ZKRATEK

DON - deoxynivalenol

ZEA - zearalenon

OTA – ochratoxin A

NIV – nivalenol

D3G - deoxynivalenol-3-glukosid

ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay

HPLC - high-performance liquid chromatography

FAO - Food & Agriculture Organization

HACCP - Hazadr Analysis and Critical Control Points

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1 Strukturální vzorec deoxynivalenolu

Obr. č. 2 Strukturální vzorec Enniatinu

Obr. č. 3 Strukturální vzorec fumonisinu B1

Obr. č. 4 Strukturální vzorec ochratoxinu A

Obr. č. 5 Strukturální vzorec patulinu

Obr. č. 6 Strukturální vzorec T-2 toxinu