

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Stanovení aflatoxinů v potravinových a krmných
surovinách z vybraných oblastí Austrálie a Indonésie
metodou Aflatoxin Quicktest™

Diplomová práce

Autor: Bc. Kateřina Kotalová
Studijní program: N1501 - Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Zadání diplomové práce

Autor: Kateřina Kotalová

Studium: S15BI005NP

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název diplomové práce: Stanovení aflatoxinů v potravinových a krmných surovinách z vybraných oblastí Austrálie a Indonésie metodou Aflatoxin Quicktest™

Název diplomové práce AJ: Determination of aflatoxins in foodstuffs and feedstuffs materials from selected regions of Australia and Indonesia by Aflatoxin Quicktest™

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Cílem práce je screeningové stanovení aflatoxinů ve vybraných vzorcích surovinových komodit (kukuřice, čirok a další obiloviny, arašídů). Jedná se o vzorky pocházející z Austrálie z oblastí New South Wales a Queensland a z Indonésie z ostrova Timor. Screeningové stanovení aflatoxinů bude prováděno pomocí tzv. Quicktestu, který slouží k semikvantitativnímu měření koncentrací aflatoxinů v daných vzorcích. Naměřené hodnoty budou následně porovnány vzhledem k platné legislativě v Austrálii a EU a dále s tzv. expozičními limity ve vztahu k jejich možnému vlivu na zdraví obyvatel.

MALÍŘ, František a OSTRÝ, Vladimír. Aflatoxiny- toxické účinky u člověka. Kontakt. 2012, 14(1), 85-93. ISSN 1212-4117. GUEVARA-GONZÁLEZ, Ramon Gerardo, 2011. Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology. Croatia: InTech (Rieka). 478 s. ISBN 978-953-307-395-8. KENSLER, Thomas W., ROEBUCK, Bill D., WOGAN, Gerald N. and GROOPMAN, John D. Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. Toxicological Sciences. 2011, 120 (Suppl), 28-48.

Anotace:

Aflatoxiny jsou po celém světě běžně se vyskytující mykotoxiny, produkované toxigenními vláknitými houbami rodu *Aspergillus*. Cílem práce je screeningové stanovení aflatoxinů ve vybraných vzorcích surovinových komodit, jako jsou např. kukuřice, čirok, případně další obiloviny a konečně arašídů z oblastí New South Wales a Queensland v Austrálii a z ostrova Timor v Indonésii. Screeningové stanovení aflatoxinů ve výše zmiňovaných surovinách bude prováděno pomocí tzv. Quicktestu, který slouží k rychlému semikvantitativnímu měření koncentrací aflatoxinů ve sledovaných vzorcích. Naměřené hodnoty budou porovnány vzhledem k platné legislativě v Austrálii a v EU a dále s tzv. expozičními limity ve vztahu k jejich možnému vlivu na zdraví obyvatel.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Oponent: doc. Vladimír Ostrý, CSc.

Datum zadání závěrečné práce: 6.1.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

v Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, odborný dohled a cenné rady.

Dále bych ráda poděkovala Univerzitě Hradec Králové za možnost výjezdu na zahraniční stáž do Austrálie, kde jsem se mohla věnovat výzkumu aflatoxinů. V neposlední řadě děkuji panu prof. Ivanu Kennedymu a Dr. Franciscu Sánchez-Bayovi za odborné vedení při výzkumu dané problematiky na Univerzitě v Sydney.

Anotace

KOTALOVÁ, K. *Stanovení aflatoxinů v potravinových a krmných surovinách z vybraných oblastí Austrálie a Indonésie metodou Aflatoxin Quicktest™*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce František Malíř. 82 s.

Aflatoxiny jsou po celém světě běžně se vyskytující mykotoxiny, produkované toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami rodu *Aspergillus*. Cílem práce je screeningové stanovení aflatoxinů ve vybraných vzorcích potravinových a krmných surovin, jako jsou např. kukuřice, čirok, případně další obiloviny a konečně arašíd, z oblastí Nový Jižní Wales a Queensland v Austrálii a z ostrova Timor v Indonésii. Screeningové stanovení aflatoxinů ve výše zmiňovaných surovinách bude prováděno pomocí Aflatoxin Quicktestu™, který slouží k rychlému semikvantitativnímu měření koncentrací aflatoxinů ve sledovaných vzorcích. Naměřené hodnoty budou porovnány vzhledem k platné legislativě v Austrálii a v EU.

Klíčová slova

Aflatoxiny, mykotoxiny, potravinové suroviny, krmné suroviny, Aflatoxin Quicktest™, Austrálie, Indonésie

Annotation

KOTALOVÁ, K. *Determination of aflatoxins in foodstuffs and feedstuffs materials from selected regions of Australia and Indonesia by Aflatoxin Quicktest™*. Hradec Králové, 2018. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Diploma Thesis Supervisor František Malíř. 82 p.

Aflatoxins are commonly occurring mycotoxins in the world produced by toxigenic filamentous microfungi of the genus *Aspergillus*. The aim of this thesis is the screening determination of aflatoxins in selected samples of foodstuffs and feedstuffs, such as corn, sorghum or other cereals and finally peanuts, from New South Wales and Queensland in Australia and from Timor Island in Indonesia. Screening determination of aflatoxins in the above-mentioned raw materials will be carried out by using the Aflatoxin Quicktest™, which is being used for the rapid semiquantitative measurement of aflatoxins in the monitored samples. The measured values will be compared with Australian and EU valid legislation.

Key words

Aflatoxins, mycotoxins, foodstuffs, feedstuffs, Aflatoxin Quicktest™, Australia, Indonesia

Obsah

Úvod a cíle práce.....	14
1 Aflatoxiny.....	15
1.1 Historie objevu a izolace	15
1.2 Charakteristika	15
1.3 Chemická a fyzikální charakteristika	17
1.3.1 Aflatoxin B ₁	17
1.3.2 Aflatoxin B ₂	19
1.3.3 Aflatoxin G ₁	20
1.3.4 Aflatoxin G ₂	21
1.3.5 Aflatoxin M ₁	22
1.3.6 Aflatoxin M ₂	23
1.4 Producenti	24
1.4.1 <i>Aspergillus flavus</i>	24
1.4.2 <i>Aspergillus parasiticus</i>	24
1.5 Výskyt v potravinách a krmivech	25
1.6 Toxikologické hodnocení aflatoxinů	28
1.6.1 Karcinogenita	29
1.6.2 Hepatotoxicita	29
1.6.3 Imunotoxicita.....	30
1.6.4 Teratogenita.....	30
1.6.5 Mutagenita.....	30
1.7 Onemocnění vyvolaná aflatoxiny	31
1.7.1 Akutní a chronické účinky	32
1.8 Prevence.....	33
1.9 Expozice.....	35
1.9.1 Expoziční limity	37
1.10 Hygienické limity	38
1.10.1 Evropská Unie	39
1.10.2 Austrálie	39
1.10.3 Queensland.....	40
1.10.4 Nový Jižní Wales.....	41
1.10.5 Svět.....	41
2 Plodiny	43
2.1 Kukuřice	43
2.2 Čirok.....	44
2.3 Podzemnice olejná	44
2.4 Pšenice	44
3 Lokality	45
3.1 Indonésie - Východní Timor	45
3.2 Austrálie	46

3.2.1	Nový Jižní Wales	48
3.2.2	Queensland	48
4	Stanovení aflatoxinů	49
4.1	Odběr vzorku	49
4.2	Extrakce	50
4.3	Čištění	50
4.4	Analytické metody	50
4.4.1	Imunochromatografické metody	50
4.4.2	Imunochemické metody	51
4.4.3	Chromatografické metody	51
5	Aflatoxin Quicktest™	52
5.1	Charakteristika	52
5.2	Vlastní test	54
5.3	Vyhodnocení testu	54
5.4	Validace	54
5.4.1	LOD a LOQ	55
5.4.2	Validace – Austrálie	55
5.4.3	Validace – Východní Timor	57
6	Praktická část	58
6.1	Bezpečnost práce	58
6.2	Metodika	58
6.2.1	Odběr vzorků	58
6.2.2	Materiál	58
6.2.3	Postup	59
7	Výsledky výzkumu	60
8	Diskuze	65
9	Závěr	67
10	Použitá literatura	68

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. č. 1 – Strukturní vzorec aflatoxinu B ₁	18
Obr. č. 2 – Strukturní vzorec aflatoxinu B ₂	19
Obr. č. 3 – Strukturní vzorec aflatoxinu G ₁	20
Obr. č. 4 – Strukturní vzorec aflatoxinu G ₂	21
Obr. č. 5 – Strukturní vzorec aflatoxinu M ₁	22
Obr. č. 6 – Strukturní vzorec aflatoxinu M ₂	23
Obr. č. 7 – Mapa zobrazení regulace mykotoxinů ve světě.....	38
Obr. č. 8 – kukuřice setá (<i>Zea Mays</i>).....	43
Obr. č. 9 – čirok (<i>Sorghum</i> sp.)	44
Obr. č. 10 – podzemnice olejná (<i>Arachis hypogaea</i>)	44
Obr. č. 11 – pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>).....	45
Obr. č. 12 – Mapa Východního Timoru.....	46
Obr. č. 13 – Mapa Austrálie.....	47
Obr. č. 14 – Klimatické stupně podle Köppenovy klasifikace podnebí v Austrálii... 48	
Obr. č. 15 – Klimatické stupně podle Köppenovy klasifikace podnebí v Indonésii včetně Východního Timoru	49
Obr. č. 16 – Schematický diagram zařízení s laterálním průtokem	53
Obr. č. 17 – příjezdová cesta do Plant Breeding Institute – Grains research Center ve městě Narrabri	78
Obr. č. 18 – International Grains Research Center ve městě Narrabri	79
Obr. č. 19 – Tamworth Agricultural Institute	79
Obr. č. 20 – Vzorky kukuřice	80
Obr. č. 21 – Měření vzorku plodiny na laboratorní váze.....	80
Obr. č. 22 – Fosfátový pufr: PBS, 50mM, pH 7,4	81
Obr. č. 23 – Mixování směsi v mixéru	81
Obr. č. 24 – Aflatoxin Quicktest™ Reader.....	82
Obr. č. 25 – Ukázka vzorků arašídů (P = peanuts) a jejich výsledků na kazetách Aflatoxin Quicktest™.....	82
Tabulka č. 1 - Druhy rodu <i>Aspergillus</i> schopné produkovat aflatoxiny	25
Tabulka č. 2 – Výskyt aflatoxinů v potravinách	27
Tabulka č. 3 – Nejpravděpodobnější primární biochemické poškození buňky AFB ₁ a následná kaskáda vedoucí k apoptóze.....	29
Tabulka č. 4 - Onemocnění u lidí spojovaná s aflatoxiny	32
Tabulka č. 5 – LD ₅₀ AFB ₁ u různých zvířat po orálním podání	32
Tabulka č. 6 - Metody prevence primární a sekundární kontaminace aflatoxiny... 34	
Tabulka č. 7 – Odhad dietární expozice aflatoxinů pro populaci v ČR v 90. letech.. 37	
Tabulka č. 8 - Maximální limity aflatoxinů v potravinách v EU	39
Tabulka č. 9 - Maximální limity aflatoxinů v potravinách v Austrálii	40

Tabulka č. 10 - Maximální limity AFB ₁ v krmivech pro zvířata v Queenslandu v Austrálii	40
Tabulka č. 11 - Maximální limity AFB ₁ ve skladovaných potravinách v Novém Jižním Walesu v Austrálii	41
Tabulka č. 12 - Porovnání maximálních limitů aflatoxinů v různých zemích světa	42
Tabulka č. 13 - Materiál potřebný pro studii aflatoxinů metodou Aflatoxin Quicktest™	58
Tabulka č. 14 - Příprava fosfátového pufru (PBS, 50 mM, pH 7,4).....	59
Tabulka č. 15a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích arašídů metodou Aflatoxin Quicktest™	60
Tabulka č. 15b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích arašídů	60
Tabulka č. 16a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích čiroku metodou Aflatoxin Quicktest™	61
Tabulka č. 16b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích čiroku	62
Tabulka č. 17a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích kukuřice metodou Aflatoxin Quicktest™.....	63
Tabulka č. 17b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích kukuřice.....	63
Tabulka č. 18a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích pšenice metodou Aflatoxin Quicktest™	63
Tabulka č. 18b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích pšenice	64
Tabulka č. 19 - Procentuální vyjádření množství aflatoxinů dle typu plodiny.....	64
Tabulka č. 20 - Procentuální vyjádření množství aflatoxinů dle místa výskytu vzorků	64
Graf č. 1 (A, B) – Validace přístroje Aflatoxin Quicktest™ s použitím vzorků arašídů shromážděných firmou Peanut Company v Austrálii v roce 2015 (A) a 2016 (B) ..	56
Graf č. 2 (A, B) – Validace přístroje Aflatoxin Quicktest™ s použitím vzorků arašídů (A) a kukuřice (B) z trhů ve Východním Timoru	57

Seznam zkratek

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	Aflatoxin M ₂
ALARA	As Low As Reasonably Achievable - v co nejnižší dosažitelné míře
AuNP-IgG	Gold nanoparticles IgG – nanočástice zlata IgG
CAC	Codex Alimentarius Commission – sbírka mezinárodně uznávaných standardů, směrnic, postupů a dalších doporučení vztahujících se k bezpečnosti potravin
CAS	Chemical Abstracts Services Registry No. - mezinárodně uznávaný registrační číselný kód používaný v chemii pro chemické látky, polymery, směsi apod.
DNA	Deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina
EFSA	European Food Safety Authority – Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay - imunoenzymatická metoda stanovení aflatoxinů
ER	Endoplazmatické retikulum
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organizace pro výživu a zemědělství
GFC	Gelová filtrace
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie vhodná pro stanovení aflatoxinů B ₁ , B ₂ , G ₁ a G ₂ v krmivech s hmotnostní detekcí
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
IAC	Imunoafinitní chromatografie

IARC	International Agency for Research on Cancer - Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
LD ₅₀	Označení pro dávku látky podávané testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 hodin
LFD	Lateral flow device – zařízení pro detekci přítomnosti cílového analytu v tekutém vzorku
LOD	Limit of Detection – mez detekce
LOQ	Limit of Quantification - mez stanovitelnosti
NACMA	National Agricultural Commodities Marketing Association - Národní zemědělská komodita marketingové asociace v Austrálii
NK	Nukleová kyselina
PTWI	Provizorní tolerovatelný týdenní příjem
SPE	Extrakce na pevnou fázi
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TVMH	Toxinogenní vláknité mikroskopické houby
UV	Ultrafialové záření
VMH	Vláknité mikroskopické houby

Terminologický slovník

Adsorbce	Hromadění (vázání) částic na povrchu
Aflatoxin	Toxická látka řadící se mezi mykotoxiny
Apoptóza	Naprogramovaná buněčná smrt
Expozice	Míra působení toxické látky na živý organismus
Fagocytóza	Schopnost buněk pohlcovat cizorodé částice a mikroorganismy
Gastrointestinální	Týkající se trávicí soustavy
Hepatocelulární karcinom	Zhoubný nádor jater
Hepatotoxický	Poškozující játra
Homogenita	Stejnorodost
Hydroxylace	Enzymová reakce spočívající ve vnesení hydroxylové skupiny do sloučeniny

Imunotoxický	Poškozující imunitní systém
Intoxikace	Otrava toxickými látkami
Intraperitoneální	Podaný do dutiny břišní
Karcinogen	Látka vyvolávající zhoubné rakovinné bujení
<i>In vivo</i>	V živém nebo na živém organismu
Konjugace	Spájení
Malformace	Znetvoření, vrozená úchylka vzniklá za nitroděložního vývoje zárodku
Mikrocefalie	Těžká vývojová porucha spojená s předčasným ukončením růstu mozku a obvykle i celé hlavy
Mutagenní	Schopný vyvolat genetickou mutaci
Mykotoxin	Toxická látka produkovaná toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami
Perkutánní	Procházející kůží
Pesticid	Přípravek určený k tlumení a hubení rostlinných a živočišných škůdců a k ochraně rostlin
Screening	Testování, zobrazení
Spóry	Jednobuněčné či vícebuněčné výtrusy hub sloužící k jejich rozmnožování a přežívání
Supernatant	Tekutina nad sedimentem
Teratogenní	Schopný vyvolat vrozenou vývojovou vadu u vyvíjejícího se plodu
Toxinogenní	Schopný tvořit toxiny

Úvod a cíle práce

V dnešní době je kladen velký důraz na výzkum a kontrolu všech mykotoxinů, a to z důvodu jejich vysoké toxicity vůči člověku a hospodářským zvířatům. Jedná se o účinné látky mikroskopických hub, k jejichž expozici dochází proti vůli a zájmům člověka. Mezi významné mykotoxiny, které kontaminují potravinový řetězec, patří aflatoxiny (B, G, M), ochratoxin A, trichotheceny (DON, T-2 toxin, zearalenon), fumonisiny, patulin nebo např. citrinin (Malíř 2010). Konkrétně aflatoxiny se řadí mezi ty nejvíce zdravotně škodlivé, a proto je na ně zaměřena tato práce.

Houby *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* jsou hlavními producenty aflatoxinů. Útočí na plodiny převážně tropických a subtropických oblastí (Anfossi et al. 2011), kde jsou ideální klimatické podmínky pro jejich výskyt (Sánchez-Bayo et al. 2017), a to během jejich růstu i skladování převážně z důvodu vysoké vlhkosti, kterou ke svému životu potřebují (Anfossi et al. 2011). Hlavním substrátem pro tvorbu aflatoxinů je podzemnice olejná neboli arašídy. Jejich další výskyt je znázorněn v tabulce č. 2. Ve své práci se věnuji výskytu aflatoxinů v arašídech, kukuřici, čiroku a pšenici, v plodinách, které pocházejí z Austrálie z oblastí Nový Jižní Wales a Queensland a z Východního Timoru, ostrova v Indonésii.

Kontaminace těchto a dalších plodin aflatoxiny je celosvětovým problémem (Sánchez-Bayo et al. 2017). K získání informací o množství těchto toxických látek v potravinách a krmivech využíváme několik metod: imunologické - ELISA a RIA (Šimůnek 2000), a chromatografické; HPTLC - vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (Malíř, Ostrý et al. 2003), HPLC metoda - vysokoúčinná kapalinová chromatografie, TLC (Šimůnek 2000) – metoda chromatografie na tenké vrstvě (Kaderová 2008) nebo LC-MS - metoda vhodná pro stanovení aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂ v krmivech (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2015). K výzkumu aflatoxinů, který byl prováděn na Univerzitě v Sydney v Austrálii, byla využita metoda Aflatoxin Quicktest™. Ta poskytuje efektivní, spolehlivou a levnější možnost screeningu hladiny aflatoxinu nad regulačními prahovými hodnotami v daných produktech (Sánchez-Bayo et al. 2017).

Aflatoxiny se vyskytují po celém světě. Ve většině zemí jsou obsahy aflatoxinů v potravinách a krmivech kontrolovány a limitovány příslušnými normami. Vzhledem k tomu, že jsou aflatoxiny vysoce toxické a celkově velmi škodlivé pro organismy, je důležitost tohoto tématu velmi vysoká. Cílem práce je seznámit čtenáře s problematikou a závažností těchto toxických látek (od jejich celkové charakteristiky po rady, jak se proti nim chránit) a v praktické části vyzobrazení množství aflatoxinů v australských a timorských plodinách zjišťovaných metodou Aflatoxin Quicktest™. Důležitým prvkem práce je porovnání hygienických limitů aflatoxinů v potravinách v EU a v Austrálii.

Výzkum byl prováděn na australské Univerzitě v Sydney v rámci zahraniční stáže.

1 Aflatoxiny

1.1 Historie objevu a izolace

Významným mezníkem v objevu aflatoxinů byl rok 1960, kdy ve spojitosti s epidemií označovanou jako „onemocnění X“ u krůt byly identifikovány neznámé mykotoxiny. Tehdy uhynuly desetitisíce krůt ať po zkonsumování krmiva s obsahem kontaminované arašídové Rosetti moučky původem z Brazílie (Malíř, Ostrý et al. 2003, Leslie et al. 2008, Santini a Ritieni 2013). Událost se odehrála v okolí Londýna. V tělech uhynulých zvířat nebyly identifikovány virové ani bakteriální agens, tudíž bylo onemocnění charakterizováno jako intoxikace. Histopatologicky bylo prokázáno poškození jaterního parenchymu a proliferace epitelu žlučového. Z kontaminované moučky byly izolovány modře a zeleně fluoreskující substance, u kterých byl prokázán jejich podíl na vzniku uvedeného onemocnění. Následně bylo zjištěno, že producentem daných toxinů je *Aspergillus flavus*, podle jehož počátečních písmen byly následně pojmenovány jako aflatoxiny: „*Aspergillus flavus toxins*“). AFM₁ byl objeven v kravském mléce stejného roku, jeho strukturní vzorec byl však objasněn o 6 let později.

Brzy po této události byla v USA zaznamenána epidemie hepatomu u pstruhů způsobená bavlníkovým olejem obsahujícím aflatoxiny (Malíř, Ostrý et al. 2003). V roce 1969, v tehdejší Československu, byly aflatoxiny poprvé identifikovány při hromadném úhynu kachen (Jesenská 1993). V Keni roku 2004 zemřelo 125 lidí po konzumaci domácí kukuřice obsahující nadlimitní množství aflatoxinů. Tato událost se řadí mezi jednu z nejzávažnějších epizod lidské otravy aflatoxiny v historii (Probst et al. 2007). Jiná významná událost týkající se otravy těmito toxiny se stala v jihozápadní Indii v roce 1974, kde bylo nakaženo 397 lidí z více než 150 vesnic kontaminovanou kukuřicí s tím, že 108 lidí na důsledky aflatoxikózy následně zemřelo. Množství AFB₁ v kukuřici se pohybovalo v rozmezí od 0,25 do 15 mg/kg (Stark 2005).

1.2 Charakteristika

Aflatoxiny jsou sekundární metabolity toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (TVMH) rodu *Aspergillus*, zejména druhů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*, vyskytující se v potravinách a krmivech (Leslie 2008, Malíř a Ostrý 2012, Anfossi et al. 2013b). Tyto druhy jsou nejvíce zodpovědné za výskyt aflatoxinů v potravinách po celém světě. Dalšími takovými druhy, které jsou schopny produkovat aflatoxiny, mohou být *Aspergillus nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. australis* (IARC 2002). Díky svému enzymatickému vybavení mohou VMH snadno kontaminovat téměř jakýkoliv substrát (Jefremová et al. 2016). Jejich spóry jsou přítomny ve velkém množství v ovzduší, v půdě, ve

vodě a na povrchu živých i odumřelých organismů (Ostrý 1998, Malíř, Ostrý et al. 2003). Jejich morfologická rozmanitost a schopnost přizpůsobit se různým podmínkám prostředí jim umožňuje kolonizovat řadu různých biotopů včetně prostředí domácnosti, zejména kuchyně a následně i potravin (Jefremová et al. 2016).

Aflatoxiny jsou patrně nejvíce známé a nejvíce vědecky prozkoumané mykotoxiny na celém světě (Malíř a Ostrý 2012). Nejčastěji se v plodinách objevují aflatoxiny B₁, B₂, G₁, G₂ a M₁ a M₂, metabolity aflatoxinů B₁ a B₂. Původně byly objeveny v mléce krav, které se živily plesnivými zrny (Santini a Ritieni 2013). AFB₁ je ze všech dosud známých nejúčinnější a vyskytuje se na nejvyšších úrovních koncentrace v potravinách a krmivech (LEE et al. 2004). Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC/WHO), která kategorizuje vybrané mykotoxiny z hlediska karcinogenních účinků, hodnotí AFB₁ a aflatoxiny jako prokázané karcinogeny pro člověka, tzv. karcinogeny skupiny I (IARC 1993, IARC 2002, Malíř, Ostrý et al. 2003, Blesa et al. 2004, Won-bo et al. 2007, IARC 2012). AFB₁ je obzvláště veden jako příčina lidského primárního hepatocelulárního karcinomu (IARC 2002). Tato klasifikace platí i pro přirozeně se vyskytující směsi aflatoxinů (IARC 1993, Peraica et al. 1999, IARC 2002, IARC 2012), a to podle hodnocení epidemiologických a laboratorních výsledků provedených danou agenturou v roce 1987, kdy byly prokázány dostatečné důkazy o karcinogenitě těchto látek (Peraica et al. 1999), s výjimkou aflatoxinu M₁, který se řadí do skupiny 2B – možný karcinogen pro člověka (IARC 1993, Peraica et al. 1999).

Jak již bylo naznačeno, karcinogenní látky a ostatní činitelé se řadí do různých skupin podle stupně karcinogenity. Podle IARC je těchto skupin 5. Látky jsou definovány prověřenými vědeckými důkazy o jejich karcinogenitě, vycházející z výsledků toxikologických a epidemiologických studií: skupina 1 – prokázané karcinogeny pro člověka (vztahuje se na látky, u nichž existuje dostatek důkazů o tom, že mohou způsobovat rakovinu u lidí), skupina 2A – pravděpodobně karcinogenní pro člověka (vztahuje se na látky, u nichž existují silné důkazy o tom, že mohou způsobovat rakovinu u lidí, ale data nejsou zatím stoprocentně průkazná), skupina 2B – možné karcinogeny pro člověka (vztahuje se na látky, u nichž existují určité důkazy o tom, že jsou karcinogenní pro člověka, ale data nejsou zdaleka rozhodující), skupina 3 – neklasifikovány, pokud jde o karcinogenitu pro člověka (vztahuje se na látky, o nichž jsou údaje pro jejich klasifikaci omezené, nedostatečné nebo žádné) a skupina 4 – pravděpodobně nekarcinogenní pro člověka (vztahuje se na látky, u kterých existuje silný důkaz o tom, že u člověka nezpůsobují rakovinu). Monografie IARC jsou autoritativním zdrojem informací o karcinogenitě široké škály lidských expozic (Malíř 2010, Coglianò et al. 2011, Ostrý et al. 2017).

Kontaminace aflatoxiny se projevuje u podzemnice olejné, kukuřice, olejnatých semen, čiroku, pšenice, mandlí, vlašských ořechů, sušeného ovoce, luštěnin, rýže, dále u mléka a mléčných produktů apod. (LEE et al. 2004). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) sledoval obsah aflatoxinů u 197 vzorků různých druhů

ořechů a ořechových výrobků, přičemž výsledky ukázaly, že hladina aflatoxinů byla v 95 % případů nižší, než normou stanovené limity, nebo byla nedetekovatelná. 70 % vzorků obsahovalo AFB₁ a další aflatoxiny v minimálních množstvích. 10 vzorků převyšovalo hladinou aflatoxinů povolený limit. Jednalo se o para ořechy, pistáciové ořechy a mandle. Šetření probíhalo v letech 2003 a 2004 a prokázalo podstatné zlepšení situace oproti roku 2002, kdy byl podíl vzorků překračující stanovené limity více než dvojnásobný (Ministerstvo zemědělství 2004).

1.3 Chemická a fyzikální charakteristika

Z chemického hlediska jsou aflatoxiny polycyklické, nesaturované a vysoce substituované kumariny. Dosud bylo identifikováno přibližně 20 aflatoxinů (např. AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFB₃ /parasitikol/, AFD₁, AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}, AFGM₁, AFM₁, AFM₂, AFM₄, AFP₁, AFQ₁, AFR₀ /aflatoxikol/), postupně byly identifikovány 4 přirozeně se vyskytující – AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂.

Aflatoxiny skupiny B vykazují v UV světle intenzivní modrou barvu fluorescence, aflatoxiny skupiny G zelenou barvu a aflatoxiny skupiny M fluoreskují modře až fialově (Malíř, Ostrý et al. 2003).

1.3.1 Aflatoxin B₁

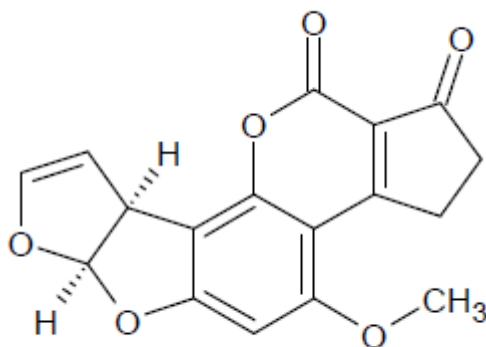
CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 1162-65-8

Název podle Chemical Abstracts: Cyclopenta [c] furo [3'2' : 4,5] furo [2,3-h] [1]benzopyran-1,11-dione, 2, 3, 6a, 9a-tetrahydro-4-methoxy-, (6aR-cis)-

Jiný název: 6-methoxydifurokumaron

Molekulová hmotnost: 312

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₆



Obr. č. 1 – Strukturní vzorec aflatoxinu B₁

Popis: nažloutlé krystaly

Bod tání: 268-269 °C

Barva fluorescence: modrá

Rozpustnost: Nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě (10 – 20 µg/ml), dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech.

Toxikologická charakteristika: Biologicky nejvýznamnější aflatoxin, nejsilnější přírodní karcinogen a nejučinnější hepatokarcinogen u zvířat. Karcinogenní účinky AFB₁ byly prokázány u celé řady živočišných druhů včetně opic, ačkoliv účinky kolísají v závislosti na druhu, věku, pohlaví, výživovém stavu apod. Např. pstruzi, prasata, kachňata jsou vysoce citlivé druhy, zatímco skot a ovce jsou mnohem odolnější (Malíř, Ostrý et al. 2003). AFB₁ může být organismem přijímán perorálně, intraperitoneálně nebo intravenózně. Je rychle absorbován do krve, dále putuje do jater a odtud majoritní exkrece cestou do žlučového systému a minoritní exkrece cestou do ledvin, kde je vylučován. Prvními příznaky intoxikace tímto aflatoxinem jsou úbytek hmotnosti až anorexie, zvýšení teploty, pocit neklidu. Toxicita AFB₁ může být akutní, kdy dochází k bolestem břicha, zvracení až smrti (Kotalová 2015), a chronická, která vede podle Malíře a Ostrého (2012) k mnohem většímu riziku vzniku rakoviny, potlačení imunity a dalším patologickým účinkům, např. u samic způsobuje změny na vaječnicích a u samců pokles objemu ejakulátu. Primárně poškozeným orgánem jsou játra (jaterní karcinom, indukce jaterních lézí, proliferace žlučovodů), např. u potkanů Fischer je AFB₁ nejučinnějším hepatokarcinogenem. „Byly však také pozorovány změny v jiných orgánech. Z experimentů na primátech (kterým byly podávány vysoké dávky AFB₁ a byla u nich navozena akutní aflatoxikóza) byla extrapolována data na člověka. Na základě toho se předpokládá, že dávka AFB₁ v potravině kontaminované 1,7 mg.kg⁻¹ t. hm.

v krátkém čase způsobuje závažné poškození jater. Podání jediné dávky AFB₁ ve výši 75 mg.kg⁻¹ t. hm. způsobí smrt. Akutní aflatoxikóza se nevyskytuje při konzumaci stravy o koncentraci AFB₁ 340 μg.kg⁻¹ t. hm .d⁻¹." V USA vedla konzumace AFB₁ v kukuřici a potravinách na arašídových základech k většímu riziku rakoviny jater než při požití AFM₁ v mléce a mléčných výrobcích. V mase a masných výrobcích je přívod aflatoxinů ve srovnání s cereáliemi a potravinami na bázi arašídů zanedbatelný. LD₅₀ perorálně je 5,5 - 7,2 mg.kg⁻¹ t. hm. u samců potkana o hmotnosti 100 g a 17,9 mg.kg⁻¹ u samic potkana o hmotnosti 150 g (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Zdroj: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (Kotalová 2015)

1.3.2 Aflatoxin B₂

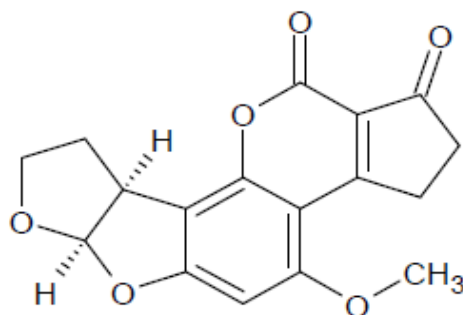
CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 7220-81-7

Název podle Chemical Abstracts: cyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione, 2,3,6aR,8,9,9aS-hexahydro-4-methoxy-

Jiný název: Dihydroaflatoxin B₁

Molekulová hmotnost: 314

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄O₆



Obr. č. 2 – Strukturní vzorec aflatoxinu B₂

Popis: bílé jehlice

Bod tání: 310 °C

Barva fluorescence: modrá

Toxikologická charakteristika: AFB₂ vykazuje obdobné účinky jako AFB₁, ale je méně toxický. Ve srovnání s 3,9 µg AFB₁ je zapotřebí 50 µg AFB₂, aby došlo ke stejné proliferaci žlučovodů u kachňat. Odhad letální dávky u člověka činí 1-10 mg.kg⁻¹ (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Zdroj: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (Kotalová 2015)

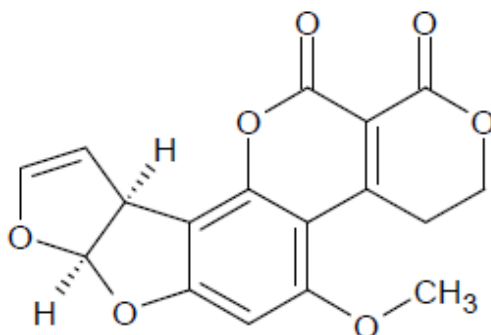
1.3.3 Aflatoxin G₁

CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 1165-39-5

Název podle Chemical Abstracts: 1H,12H-Furo(3',2':4,5)furo(2,3-h)pyrano(3,4-c)(1)benzopyran-1,12-dione, 3,4,7a,10a-tetrahydro-5-methoxy-

Molekulová hmotnost: 328

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇



Obr. č. 3 – Strukturní vzorec aflatoxinu G₁

Popis: krystalické zelené jehlice

Bod tání: 244-246 °C

Barva fluorescence: zelená

Rozpustnost: Nerozpustný v nepolárních rozpouštědlech, málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech.

Toxikologická charakteristika: Karcinogenní a genotoxický mykotoxin vykazující podobnou, ale menší toxicitu než AFB₁, a naopak větší toxicitu než AFB₂. Kachňata po podání tohoto aflatoxinu vykazují podobná poškození jako při podání AFB₁. LD₅₀ u potkana byla 2x větší než u AFB₁.

1.3.4 Aflatoxin G₂

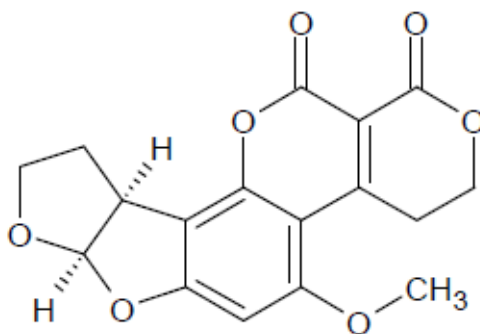
CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 7241-98-7

Název podle Chemical Abstracts: 1H,12H-furo[3',2':4,5]furo[2,3-h]pyrano[3,4-c][1]benzopyran-1,12-dione, 3,4,7a,9,10,10a-hexahydro-5-methoxy-

Jiný název: Dihydroaflatoxin G₁

Molekulová hmotnost: 330

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄O₇



Obr. č. 4 – Strukturní vzorec aflatoxinu G₂

Popis: bezbarvé jehlice

Bod tání: 237 – 240 °C

Toxikologická charakteristika: Karcinogenní a genotoxický aflatoxin, který vykazuje nejmenší toxicitu ze všech 4 běžně se v přírodě vyskytujících. LD₅₀ perorálně je 172,5 µg.50g⁻¹ t. hm. u jednodenních kachňat (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Zdroj: *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* (Kotalová 2015)

1.3.5 Aflatoxin M₁

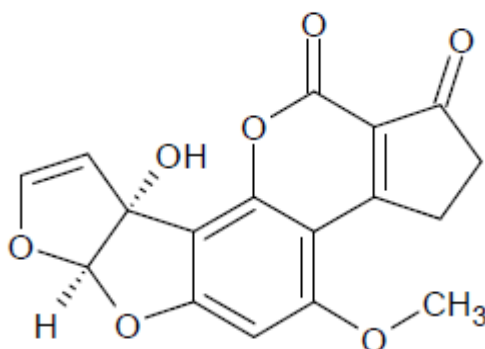
CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 6795-23-9

Název podle Chemical Abstracts: Cyclopenta[c]furo[3,2:4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione, 2,3,6a,9a-tetrahydro-9a-hydroxy-4-methoxy

Jiný název: 4-hydroxy aflatoxin B₁

Molekulová hmotnost: 328

Sumární vzorec: C₁₇H₁₂O₇



Obr. č. 5 – Strukturní vzorec aflatoxinu M₁

Popis: bezbarvé pravoúhlé destičky

Bod tání: 299 °C

Barva fluorescence: modrá

Rozpustnost: Nerozpustný v hexanu, málo rozpustný v benzenu, rozpustný v metanolu, etanolu, acetonitrilu, chloroformu, a v poměru 1:1 rozpustný ve směsi metanol:ether (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Toxikologická charakteristika: AFM₁ je metabolitem AFB₁ (Malíř, Ostrý et al. 2003, Kotalová 2015). Je cytotoxický (WHO 2002), vzniká hydroxylací AFB₁, je méně toxický a karcinogenní než AFB₁ a váže se na proteinové složky mléka (Kotalová 2015). Do organismu člověka se dostává především konzumací mléka a mléčných výrobků, zvláště děti mohou být výrazně postiženy, jelikož mají nižší hmotnost, vykazují vysokou buněčnou aktivitu a jejich imunitní systém není dostatečně vyvinutý (Malíř, Ostrý et al. 2003). AFM₁ byl nalezen v játrech, ledvinách, krvi, žluči, stolici, moči a mléce. U pstruha a potkana byla prokázána

menší schopnost AFM₁ ve srovnání s AFB₁ navodit jaterní karcinom, nicméně u pstruha navozen byl (Malíř, Ostrý et al. 2003). U lidí i zvířat může expozice na úrovni nanogramů přecházet z mateřského mléka (Santini a Ritieni 2013).

V některých zemích kolísá kontaminace AFM₁ během roku, např. v létě jsou tyto koncentrace nižší, protože se dojnícím nepřidává takové množství doplňkových krmiv. AFM₁ je vázán na proteinovou frakci mléka, proto je jeho obsah v sýrech dokonce 3 – 5x vyšší. Narozdíl od AFB₁, AFB₂, AFG₁ a AFG₂ se vyskytuje i osamoceně bez přítomnosti dalších aflatoxinů (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Zdroj: *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* (Kotalová 2015)

1.3.6 Aflatoxin M₂

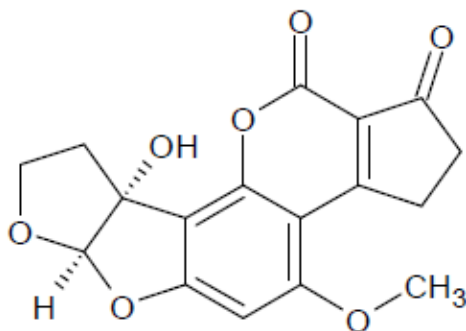
CAS (Chemical Abstracts Services Registry No.): 6885-57-0

Název podle Chemical Abstracts: cyclopenta[c]furo[3',2':4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione, 2,3,6a,8,9,9a-hexahydro-9a-hydroxy-4-methoxy-

Jiný název: 4-hydroxy aflatoxin B₂

Molekulová hmotnost: 328

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄O₇



Obr. č. 6 – Strukturní vzorec aflatoxinu M₂

Popis: bezbarvé pravoúhlé destičky

Bod tání: 293 °C

Barva fluorescence: modrá

Toxikologická charakteristika: AFM₂ je metabolitem AFB₂. Ve srovnání s AFM₁ je méně toxický, pravděpodobně z důvodu absence dvojné vazby na konci difuranového systému. Byl nalezen v játrech, ledvinách, moči a mléce savců (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Zdroj: *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* (Kotalová 2015)

1.4 Producenti

„Jestliže byla u některého kmene určitého druhu VMH dříve zjištěna produkce určitého mykotoxinu, je možné považovat všechny kmeny tohoto druhu za potenciálně toxinogenní, tj. schopné produkovat určitý mykotoxin“ (Ostrý a Škarková 2003). VMH mohou produkovat jeden a více mykotoxinů, např. *Aspergillus flavus* může produkovat aflatoxiny a kyselinu cyklopiazonovou. Po kontaminaci potravin využívají VMH některé složky, např. vitamíny nebo minerály, a tím dochází ke snížení obsahu těchto látek v potravinách a následně ke snížení biologické hodnoty potraviny (Ostrý 1998).

Rod *Aspergillus* patří mezi vřeckovýtrusé houby do řádu *Eurotiales*. Konkrétně druhy *A. flavus* a *A. parasiticus* se řadí do sekce Flavi (Malíř, Ostrý et al. 2003, Ostrý a Škarková 2003). Jak již bylo zmíněno, aflatoxiny jsou produkovány sedmi druhy rodu *Aspergillus*. V této kapitole jsou podrobně popsány hlavní producenti aflatoxinů – *A. flavus* a *A. parasiticus*. V tabulce č. 1 jsou uvedeny stručné informace o jejich výskytu spolu s ostatními producenty.

1.4.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus je rozšířen celosvětově (Malíř, Ostrý et al. 2003). V rozsáhlém množství se vyskytuje v půdě, nicméně nejvyšší početnost této houby je zaznamenána v prostředí, kde dochází k manipulaci s kontaminovanými substráty. Nalezen byl dokonce i v moři (Jesenská 1993). *A. flavus* produkuje pouze aflatoxiny typu B (AFB₁, AFB₂) a mykotoxin kyselinu cyklopiazinovou. AFM₁ je metabolitem (produktem biotransformace u savců) AFB₁ a vyskytuje se v mléce a mléčných produktech (tzv. mléčný toxin) pocházejících ze zvířat, které byly krmeny kontaminovanou potravou. *A. flavus* se přirozeně vyskytuje především v tropech, v mírně teplém podnebí je jeho výskyt nižší a méně častý je v chladnějších klimatech, s výjimkou potravin dovezených z tropických zemí.

1.4.2 *Aspergillus parasiticus*

Aspergillus parasiticus produkuje aflatoxiny typu B (AFB₁, AFB₂) a G (AFG₁, AFG₂). Vyskytuje se ve stejném zeměpisném rozmezí jako *A. flavus*, pouze v menším rozsahu. Hostitelé tohoto druhu houby jsou stejní jako u předešlého druhu

s výjimkou kukuřice, avšak nejdůležitějším zdrojem jsou arašíd, v nichž je tento producent endemický (IARC 2002).

Druh	Aflatoxin		Hlavní substrát	Geografické roztrídění
	B	G		
<i>A. flavus</i>	+	-	Všechny druhy potravin	Všudypřítomné v teplejších zeměpisných šířkách
<i>A. parasiticus</i>	+	+	Arašíd	Specifické oblasti
<i>A. nomius</i>	+	+	Včely	USA, Thajsko
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	Půda	Japonsko
<i>A. bombycis</i>	+	+	Bourec morušový	Japonsko, Indonésie
<i>A. ochraceoroseus</i>	+	-	Půda	Afrika
<i>A. australis</i>	+	+	Půda, arašíd	Jižní polokoule

Tabulka č. 1 - Druhy rodu *Aspergillus* schopné produkovat aflatoxiny (IARC 2002)

1.5 Výskyt v potravinách a krmivech

Podle údajů FAO je v celosvětovém měřítku kontaminováno mykotoxiny přibližně 25 % všech obilovin (Ministerstvo zemědělství 2003). V tvorbě VMH a následné tvorbě toxinů hrají úlohu různé ekologické faktory, přičemž každý mykotoxin vyžaduje svůj specifický substrát (Malíř, Ostrý et al. 2003). Rozvoj plísní a následná produkce mykotoxinů se může objevit v době před sklizní plodin, v pozdějších sklizňových fázích (Tajkarimi et al. 2011) i vlivem jejich nesprávného skladování (Nedělník 2014), a to nedostatečným usušením a ošetřením před uložením, např. z důvodu sklizně za vlhkého a deštivého počasí (Malíř, Ostrý et al. 2003). Pokud nejsou dodrženy obecně platné hygienické podmínky, dochází k jejich rozvoji, tzv. zaplísnění (Nedělník 2014). Plesnivé potraviny, obsahující VMH produkující mykotoxiny, představují významné nebezpečí pro zdraví lidí, zejména z hlediska tzv. pozdních toxických účinků, např. karcinogenity a vývojové toxicity (Ostrý a Škarková 2003).

VMH *Aspergillus flavus* mají schopnost přežít teploty v rozmezí 12 – 41 °C, ale jejich životní optimum se pohybuje v rozmezí 25 - 32 °C. Syntéza aflatoxinů v krmivech se zvyšuje při teplotách nad 27 °C (Dhanasekaran et al. 2011). Optimální tvorba pro AFB₁ probíhá v rozsahu 24 - 28 °C, zatímco pro AFG₁ okolo 30 °C. Pouze několik málo kmenů je schopno produkovat aflatoxiny při 7,5 °C, také kolísání teplot je méně příznivé pro jejich syntézu než konstantní teplota (Malíř, Ostrý et al. 2003). Dalším rozhodujícím faktorem pro růst VMH je relativní vlhkost substrátu. Syntéza aflatoxinů se u hub *A. flavus* a *A. parasiticus* zvyšuje při úrovni vlhkosti vyšší než 62 % a při úrovni vlhkosti v krmivu nad 14 % (Dhanasekaran et

al. 2011). Život těchto patogenů se zastavuje, pokud vlhkost klesne pod 12 % (Nedělník 2014). Dalším faktorem je hodnota pH. *A. flavus* roste od pH 2,5 do 8, nejproduktivnější však bývá v rozmezí pH 5-7 (Kotalová 2015). Hodnotí se také přítomnost kyslíku. VMH, které ho potřebují nejvíce, kontaminují povrch substrátu. Naopak, čím méně kyslíku potřebují, tím hlouběji v substrátu se nalézají (Malíř, Ostrý et al. 2003, Jeřábková 2012). Některé druhy jsou schopné se rozmnožovat v anaerobních podmínkách (Jeřábková 2012). Koncentrace CO₂ > 10 % nebo koncentrace O₂ < 20 % a > 90 % potlačuje tvorbu aflatoxinů (Malíř, Ostrý et al. 2003). Vodní aktivita (a_w), která je také nezbytná pro růst TVMH, se pohybuje v rozmezí hodnot 0,83 – 0,87. Zvýšenou syntézu aflatoxinů lze pozorovat při a_w 0,95 – 0,99 (Malíř, Ostrý et al. 2003). Zmíněné faktory se řadí mezi faktory fyzikální (Jeřábková 2012). Další faktory můžeme rozdělit na chemické a biologické. Mezi chemické patří např. složení vzduchu, povaha substrátu (Dhanasekaran et al. 2011), používání hnojiv (Jeřábková 2012) či pesticidů, přičemž při správném používání těchto látek je riziko kontaminace mykotoxiny nižší. Existují ale i studie, které prokázaly, že při nevhodném použití pesticidů může být naopak tvorba mykotoxinů podpořena (Malíř, Ostrý et al. 2003). Biologické faktory jsou spojené s hostitelským druhem (Dhanasekaran et al. 2011). Takovým faktorem je např. přirozená schopnost organismu odolávat napadení VMH (Jeřábková 2012), dále vliv hmyzu (především v zemích s tropickým klimatem) přenášející spóry VMH uložených na povrchu substrátu v místě poškození (např. v zrně) nebo přítomnost jiných mikroorganismů, jako jsou bakterie nebo jiné VMH, které mohou narušit produkci mykotoxinu, např. prokázaná nižší produkce aflatoxinu při vpravení druhu *A. parasiticus* ve stejnou dobu do prostředí, kde byl kultivován *A. flavus* (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Po celém světě, obzvláště v rozvojových zemích, je více než 5 miliard lidí ohroženo chronickým vystavením přirozeně se vyskytujících aflatoxinů v potravinách (Akbarsha et al. 2011). *A. flavus* a *A. parasiticus* způsobují trvalé infekce důležitých zemědělských plodin převážně v tropických a subtropických oblastech (Tran-Dinh et al. 2009), nejčastěji mezi 40° severní šířky a 40° jižní šířky (Lizárraga-Paulín et al. 2011), také ale v teplých oblastech s vysoce rozvinutým zemědělstvím, např. v jižní a středozápadní části USA (Malíř, Ostrý et al. 2003). Plodiny, které jsou pěstované v těchto podnebných pásmech, tedy za vlhkého a teplého počasí, jsou k aflatoxinové kontaminaci náchylnější více než plodiny pěstované v mírném pásmu. Vhodná kombinace všech těchto faktorů zvyšuje zamoření, kolonizaci substrátu a množství produkovaných toxických látek (Dhanasekaran et al. 2011). Typy potravin, které bývají aflatoxiny obvykle kontaminovány, jsou vypsány v tabulce č. 2.

Tvorba aflatoxinů začíná ve stejnou dobu, kdy se začínají tvořit konídie. Největší koncentrace aflatoxinů jsou syntetizovány v tzv. lag fázi (období intenzivní sporulace) a po 6 dnech se obvykle tvorba aflatoxinů snižuje. Za vhodných podmínek se mohou tvořit 2 – 3 typy aflatoxinů. Aflatoxiny a další mykotoxiny (ochratoxin A, deoxynivalenol, fumonisin, zearalenon atd.) houbové organismy

produkují jako prostředky v boji proti konkurenci a pro podporu kolonizace hostitelské rostliny. Avšak pro teplokrevné živočichy jsou velmi zdravotně závadné. Z aflatoxinů přítomných v potravinách hrají nejdůležitější roli pro lidské zdraví AFB₁, AFG₁, AFM₁ a aflatoxikol. Je známo, že AFB₂, AFG₁ a AFG₂ se nevyskytují, pokud není přítomen AFB₁, a AFG₁ se nachází ve vyšších koncentracích než AFB₂ a AFG₂ (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Mykotoxin	Potraviny
Aflatoxiny (zejména AFB ₁)	Arašídová omáčka a pasta, směs a kandované arašídů, broskvová jádra, bataty, cereální snídaně, česnek nakládaný, česnekový prášek, čili koření, čili papričky, čirok, čokoláda, fíky, fíková pasta, hrášek, jádra melounu, kakaová drť, kari pasta, kari, kávová zrna, kokosová zmrzlina, kokosové ořechy a olej, kayenský pepř, kmín, kukuřice sušená a vařená, kukuřičné otruby a slupky, kukuřičné výrobky, kukuřičný slad, stonk a škrob, maniok (cassava), mandle, marcipán, maso, müsli, nudle, muškátový oříšek, olej, ořechy brazilské, pistáciové, pekanové a vlašské, paprika, pepř, pekařské výrobky, pistácie kandované, pivo, proso (čirok, millet), rozinky, ryby, sezamové semeno, sojová mouka, špagety, tykvová jádra, vaječné výrobky, víno, zázvor, zrno ječmene
AFG ₁	Stejně jako u AFB ₁ , dále: semena celeru
AFG ₂	Stejně jako u AFB ₁ , dále: citrony, indická kassia (skořice), mango, olivový olej, pomeranče, slunečnicová a sezamová semínka, kurkuma, sója, římský kmín
AFM ₁	Jogurt, kukuřice bílá a žlutá, máslo, mléko pasterizované a sterilizované, mléko sušené, mléko velbloudí, pistáciové ořechy zaplísňené, syrovátka sušená, sýry (blue, Blue Haverti, Brie, Camembert, Cheddar, Cheshire, Chester, Cottage, Compte, Cream, Double Gloucester, Eidam, Emmental, Fresh, Gouda, Grana Padano, Lancashire, Leicester, Maribo, Mozzarella, Parmesan, Romadur, Samsøe, Stilton, Wensleydale)

Tabulka č. 2 – Výskyt aflatoxinů v potravinách (Malíř, Ostrý et al. 2003)


Pozn.: Potraviny vyrobené z kukuřice, arašídů a dalších ořechů jsou více náchylné ke kontaminaci aflatoxiny, naopak obiloviny (ječmen, oves, rýže, žito) a sojové boby nejsou hlavním zdrojem dietární expozice, pokud jsou skladovány ve vhodných podmínkách a nedojde k sekundární kontaminaci. V cukru, bramborách, želé nebo v kyselém zelí nebyly doposud aflatoxiny nikdy stanoveny. Maximální koncentrace aflatoxinů byly zaznamenány v bavlně (> 5 g.kg⁻¹), arašíděch (1 g.kg⁻¹), kukuřici (0,4 g.kg⁻¹) a pistáciích (1,4 g.kg⁻¹). Nejdůležitějším potenciálním zdrojem

aflatoxinů jsou vstupní potravinové suroviny rostlinného původu, méně vhodnými substráty jsou potraviny živočišného původu (Malíř, Ostrý et al. 2003).

1.6 Toxikologické hodnocení aflatoxinů

Svémi karcinogenními, hepatotoxickými, imunotoxickými, teratogenními a mutagenními (Malíř, Ostrý et al. 2003, Malíř et al. 2004, Malíř 2010) vlastnostmi představují aflatoxiny vážná zdravotní rizika pro člověka a domácí zvířata (Ostrý et al. 2015). Jednotlivé vlastnosti jsou blíže popsány v následujících podkapitolách. Aflatoxiny jsou známé svými akutními a chronickými toxickými účinky a jejich toxicita klesá v následujícím pořadí: $AFB_1 > AFM_1 > AFG_1 > AFB_2 > AFG_2$ (Malíř et al. 2004). Pořadí toxicity a mutagenity naznačuje, že nenasycenost terminálního furanového kruhu je určující pro šíři a hloubku biologické aktivity aflatoxinů. Ve vztahu k AFB_1 platí, že AFG_1 je 2x méně toxický, AFB_2 je přibližně 5x méně toxický a AFG_2 10x méně toxický (Malíř, Ostrý et al. 2003). Důsledky působení mykotoxinů na teplokrevné živočichy jsou různorodé v závislosti na typu toxinu, délce trvání a úrovni expozice, pohlaví (Nedělník 2014), věku, individuální citlivosti, vitamínové deficienci (Malíř et al. 2013) a celkovém aktuálním zdravotním stavu napadeného jedince. Mohou atakovat všechny orgány v těle. Nejčastěji jsou jejich cílem játra (Stark 2005, Nedělník 2014) - centrum detoxikace mykotoxinů, dále pak ledviny, gastrointestinální trakt, slezina nebo mozek (Nedělník 2014). Bylo zjištěno, že se aflatoxiny po požití adsorbují v gastrointestinálním traktu prostřednictvím nepopsaného pasivního mechanismu a po pouhých 15 minutách se objevují jako metabolity v krvi, v mléce pak po 12 hodinách od požití kontaminovaného krmiva (Lizárraga-Paulín et al. 2011). Jak aflatoxiny poškozují buňky, je popsáno v tabulce č. 3. Mykotoxikózy (onemocnění vyvolaná mykotoxiny) mohou být snadno zaměnitelné s virovými či bakteriálními chorobami (Nedělník 2014). Aflatoxiny a konkrétně AFB_1 mohou indukovat poškození DNA, genovou mutaci, výměnu sesterských chromatid a další chromozomální anomálie (Akbarsha et al. 2011).

Aflatoxiny samy o sobě toxické nejsou, ale do toxické formy přechází prostřednictvím oxidačního metabolismu cytochromu P-450 (Stark 2005). Kombinace dvou nebo více současně se vyskytujících mykotoxinů v surovinách i potravinách může mít v důsledku synergického spolupůsobení mnohem toxicitější účinek (Malíř et al. 2013). Tento synergismus spočívá v tom, že jeden mykotoxin zvyšuje citlivost biologického objektu ke druhému a výsledný toxický účinek je pak mnohonásobně větší než součet jednotlivých účinků. Příkladem může být součinnost ochratoxinu A a citrininu testovaných u myší, potkanů a psů. Existuje také antagonismus – protichůdné působení mykotoxinů, kdy je jeden mykotoxin schopný zeslabit účinky toho druhého. Výsledný toxický účinek je pak menší, než by odpovídalo součtu toxických účinků jednotlivých látek. Příkladem může být součinnost ochratoxinu A a citrininu, testovaných u kuřete (Malíř 2010).

Mykotoxin	Iniciální poškození	Kaskáda biochemického poškození buňky		
				
AFB ₁	Metabolická aktivace	modifikace DNA	deregulace buňky	→ buněčná smrt (apoptóza)

Tabulka č. 3 – Nejpravděpodobnější primární biochemické poškození buňky AFB₁ a následná kaskáda vedoucí k apoptóze (Malíř, Ostrý et al. 2003)

1.6.1 Karcinogenita

„Na možnost karcinogenního rizika aflatoxinu pro člověka upozornili již v r. 1962 LeBreton a Frayssinet“. V Africe a Asii, v oblastech s vysokou incidencí primárního karcinomu jater, byly prováděny několikaleté epidemiologické studie, které prokázaly přímou souvislost mezi tímto tumorem a stupněm kontaminace potravy.

Karcinogenita AFB₁ je pravděpodobně umožněna tvorbou reaktivního epoxidu v poloze 8, 9 terminálního furanu a jeho vazbou na NK. Tyto adukty NK mohou přetrvávat několik týdnů od poslední přijaté dávky aflatoxinu. AFB₁, AFM₁ a aflatoxikol vykazují genotoxické účinky a jsou řazeny mezi nejúčinnější karcinogeny.

1.6.2 Hepatotoxicity

Jak bylo zmiňováno výše, primárním cílovým orgánem aflatoxinů jsou játra. Kromě jater mohou být patologické změny přítomny i v plicích, myokardu a ledvinách. U zvířat, která přežila akutní fázi intoxikace, dochází k postupnému rozvoji chronických změn, které většinou končí cirhózou jater.

Toxicita AFB₁ byla porovnávána u vybraných druhů zvířat. Např. myši jsou relativně rezistentní vůči akutním i chronickým hepatotoxickým účinkům. U potkana závisí na věku a pohlaví (mladí potkani a potkanní samci jsou citlivější). Vnímavost drůbeže závisí na druhu. Krocán je méně vnímavý vůči aflatoxinu než kachna. Koncentrace 50 µg.kg⁻¹ AFB₁ v krmivu vyvolává u kachňat zpoždění růstu a poškození jater. U malého kuřete způsobilo podávání kontaminovaného krmiva s obsahem AFB₁ 2,5 mg.kg⁻¹ po dobu 3 týdnů žloutenku, zpomalení růstu a poruchy krevní srážlivosti. Starší kuře bylo mnohem odolnější. K akutní aflatoxikóze u králíka (projevující se ztrátou chuti, snížením absorpce vody, následnou dehydratací a ztrátou hmotnosti) došlo při konzumaci kontaminovaného krmiva při dávce 0,4 mg.kg⁻¹.den⁻¹. U prasat se aflatoxikóza projevuje anorexií, depresí nervového systému, jaterní nekrózou, hemoragií s dehydratací a žloutenkou, a končí jejich úhynem po 24 – 72 hodinách. Stejně příznaky se objevily u selete o hmotnosti 15 kg po podání jedné perkutánní dávky AFB₁ o koncentraci 1,2 mg.kg⁻¹ t. hm. Konzumace krmiva s obsahem 1 mg.kg⁻¹ AFB₁ během 4 týdnů vyvolala u prasátek zpomalení hmotnostních přírůstků, interlobulární fibrózu a hyperplazii

žlučových kanálků. Poměrně vnímavá vůči aflatoxinům jsou telata, která mohou být snadno intoxikována přirozeným způsobem. Telata krmená krmivem o obsahu AFB₁ 2 mg.kg⁻¹ po dobu 4 měsíců měla jaterní poškození, cirhózu, ascit (břišní vodnatelnost) a otoky vnitřností. Podání perkutánní dávky AFB₁ 1,8 mg.kg⁻¹ telatům o hmotnosti 44 kg vyvolalo smrt. U telat o hmotnosti 250 kg krmených každodenně 600 µg AFB₁ po dobu 155 dnů došlo ke snížení jejich hmotnosti, u telat krmených každodenně poloviční dávkou AFB₁ po dobu několika týdnů se neprojeví žádné účinky. Akutní hepatotoxicita byla pozorována také u opic. Symptomy onemocnění byly daleko těžší, pokud byla opice krmena krmivem s nízkým obsahem proteinů.

1.6.3 Imunotoxicita

Imunotoxicita označuje toxický vliv daného faktoru vůči imunitnímu systému. Tímto faktorem jsou v tomto případě aflatoxiny. Např. inhalační expozice má za následek imunosupresivní účinky. Takto podaný AFB₁ potlačuje fagocytózu alveolárními makrofágy. Samci potkanů (Fischer 344) a samice myši (Swiss) byli exponováni tímto toxinem buď inhalací aerosolu, nebo vkapáváním do trachey. Účinky přetrvávaly přibližně 2 týdny a došlo k nim po podání perkutánní dávky 16,8 µg.kg⁻¹ t. hm. Imunotoxické účinky byly prokázány také u drůbeže a u prasat.

1.6.4 Teratogenita

Teratogenita představuje schopnost látky vyvolat vrozenou vývojovou vadu vyvíjícího se plodu. U samic křečků, které byly březí 8. den, byla teratogenita prokázána po jediném intraperitoneálním podání dávky o koncentraci 4 mg.kg⁻¹ AFB₁ rozsáhlými malformacemi. Při podání poloviční dávky nebyly malformace plodu zjištěny. Ve stejných dávkách je AFB₁ teratogenní také pro potkana. U kuřecích embryí (3 – 7 dní starých) byla teratogenita potvrzena také. Projevovala se zpomalením růstu, mikrocefalií, rozštěpem patra a deformací horních čelistí.

1.6.5 Mutagenita

Mutagenita je schopnost látky vyvolat genetickou mutaci. Z testů mutagenity, které byly prováděny na bakterii *Salmonella typhimurium*, vyplynulo, že nejvýznamnější mutagenní aktivitu vykazuje AFB₁. AFM₁ vykazuje ve většině studií mutagenitu pouze po metabolické aktivaci. Aflatoxiny tvoří adukty buď s DNA, nebo s oligonukleotidy. Relativní vnímavost savců může být vysvětlena kombinovaným účinkem mikrozomálních enzymů a cytosolu na schopnost adukce aflatoxinů, což bylo potvrzeno sérií studií „in vivo“ u ryb. Aduky vznikají hlavně v játrech, dále v plicních buňkách, lymfocytech, v buňkách kostní dřeni, ledvin, myokardu, epitelu tenkého a tlustého střeva a řadě dalších orgánů (Malíř, Ostrý et al. 2003).

1.7 Onemocnění vyvolaná aflatoxiny

Vzhledem k prokázané karcinogenitě a akutním toxickým účinkům je aflatoxinům věnována větší pozornost, než ostatním mykotoxinům. Z chemického hlediska jsou aflatoxiny toxické z důvodu jejich schopnosti kovalentní vazby na DNA a proteiny (Contreras-Medina et al. 2013). Odpověď organismu na přítomnost aflatoxinů je rozdílná v závislosti na věku, pohlaví, zdravotním stavu jedince, živočišném druhu a dalších faktorech (Višňovský 1997).

Aflatoxiny mohou svými účinky způsobovat řadu onemocnění. V tabulce č. 4 jsou znázorněny nejznámější z nich. Co se týče Austrálie, bylo zde první zmiňované onemocnění, aflatoxikóza, zkoumáno u prasat. V žaludku jednoho uhynulého zvířete byl nalezen plesnivý chléb s množstvím 5000 µg/kg aflatoxinů. Rychlost průběhu nemoci byla extrémně rychlá (Jesenská 1993).

Onemocnění	Popis onemocnění, příznaky
Aflatoxikóza	Onemocnění je způsobeno nadměrným příjmem aflatoxinů organismem, dělí se na akutní a chronickou. Příznaky: odmítání jídla, zakrnělý vzrůst, žloutenka, deprese, snížení produkce mléka a narušení reprodukční výkonnosti.
Cirhoza dětí v Indii	Chronické onemocnění charakterizované poškozením a následnou přestavbou vnitřní struktury jater.
Duševní retardace dětí	Úplné zastavení nebo zpomalení duševního vývoje dětí, které je charakterizováno poruchou dovedností (řečových, pohybových, sociálních) a při kterém dochází k trvalému snížení inteligence v důsledku poškození mozku.
Encefalopatie Udorn	Encefalopatie je jakékoliv onemocnění mozku. Příznaky: tuková degenerace orgánů, edém mozku
Chronická gastritida	Zánět žaludku neboli zánět žaludeční sliznice trvající po dobu delší časové periody.
Kwashiorkor	Syndrom těžkého nedostatku bílkovin, časté onemocnění v rozvojových zemích (u dětí v Etiopii a dalších afrických zemích nalezeno v krvi a moči toxikologicky významné množství aflatoxinů).
Primární jaterní karcinom	Zhoubný nádor jater, ke kterému může dojít inhalací kontaminovaného prachu (zejména u lidí vystavených tomuto riziku profesionálně).
Respirační onemocnění	Onemocnění projevující se různými dýchacími potížemi (př. vdechování spór ze zaplísňeného krmiva).

Reyův syndrom	Encefalopatie (narušení mozkových funkcí důsledkem selhávání jater) a tuková degenerace jater. U všech pacientů s tímto onemocněním byly nalezeny aflatoxiny (pravděpodobně se zde uplatňují i další faktory, zejména virové infekce). Příznaky: v první fázi respirační problémy, v druhé fázi zvracení, průjem
---------------	---

Tabulka č. 4 - Onemocnění u lidí spojovaná s aflatoxiny (Malíř, Ostrý et al. 2003, Kotalová 2015)

1.7.1 Akutní a chronické účinky

Akutní onemocnění obvykle začíná rychle, trvá krátce a má intenzivní příznaky. Opakem je chronické onemocnění, které probíhá poměrně dlouhou dobu. Přechodem mezi těmito dvěma stavy je subakutní onemocnění, avšak řada onemocnění má buď pouze akutní, nebo chronický charakter.

Akutní toxicita AFB₁ (LD₅₀) se pohybuje v rozsahu 0,3 – 18 mg.kg⁻¹ v závislosti na živočišném druhu, věku, pohlaví, fyziologickém stavu zvířete, způsobu podání a složení krmiva. V tabulce č. 5 jsou uvedeny LD₅₀ AFB₁ u různých druhů zvířat.

Živočišný druh	LD₅₀ AFB₁ (mg.kg⁻¹. t. hm.)
myš	4-9
potkan	6-18
morče	1,4
křeček (čínský)	10,2
králík	0,3-0,5
kočka	0,55
pes	1
pstruh	0,5
kachna	0,36
krocan	1,36
kuře	6,5
prase	0,62
kůň	0,6-1
beran	2
opice	3

Tabulka č. 5 – LD₅₀ AFB₁ u různých zvířat po orálním podání (Malíř, Ostrý et al. 2003)

1.8 Prevence

Vzhledem k velmi vysoké toxicitě a dalším výše zmíněným účinkům aflatoxinů představují tyto látky a všechny další mykotoxiny pro organismus člověka a zvířat významné zdravotní riziko. Proto je potřeba jejich dopad na lidské a zvířecí zdraví minimalizovat (Malíř et al. 2013). Strategii prevence lze rozdělit na primární, která zahrnuje opatření proti napadení houbou a produkci aflatoxinů, a sekundární, která se zaměřuje na odstranění nebo omezení houbových kontaminantů. Z tohoto pohledu můžeme také houby rozdělit do dvou skupin: na ty, které kolonizují plodiny ve venkovním prostředí (na poli, v terénu) a na ty, které kolonizují zrna při skladování plodin při optimální vlhkosti. Mykotoxinová kontaminace bývá často aditivní proces, který začíná venku na poli, v terénu, a zvyšuje se při sklizni, sušení a skladování. Podle zmíněné klasifikace se do první skupiny může řadit např. *Alternaria*, *Cladosporium* nebo *Fusarium*, do druhé skupiny potom *Aspergillus* a *Penicillium*. Tato klasifikace byla založena na studiích provedených v mírném podnebí. Avšak v teplém, vlhkém subtropickém nebo tropickém podnebí mohou druhy *Aspergillus* a *Penicillium* infikovat semena na poli. Příkladem druhu, který je schopen infikovat semena jak na poli, tak i ve skladovacích prostorách, je *Aspergillus flavus* (Richard et al. 2003).

Prevence během před sklizňového neboli primárního hospodaření je nejlepším způsobem kontroly kontaminace mykotoxiny. Nicméně v případě, že dojde ke kontaminaci plodin, které mají být určeny k potravinářským a krmným účelům, musí být nebezpečí spojené s toxiny řízeno určitými postupy po sklizni. V této fázi jsou hlavními oblastmi, kde lze zabránit kontaminaci, skladování a zpracování (Park et al. 1999). Je třeba, aby se farmáři a zemědělci vyvarovali faktorů, které dávají vznik VMH na plodinách. Těmi jsou poškozování plodin hmyzem a ptáky, stres ze sucha, zpožděná sklizeň, špatné skladování plodin, použití genotypů rostlin náchylných ke kontaminaci (Malíř, Ostrý et al. 2003). Je důležité zajistit správné čištění zrn, sušení provádět brzy po sklizni, kontrolovat přítomnost hmyzu ve skladovaných plodinách. Sušení zrn při hodnotě vlhkosti nižší než 14 % může zastavit vznik nových plísní, avšak neeliminuje mykotoxiny a plísně, které jsou již přítomny. Avšak nejlepší preventivní praktikou je vyvarování se plísněvé infekce (Vondrášková 2011). Dobrou prevencí je správný postup pěstování plodin, jako např. střídání jednotlivých druhů plodin, zavlažování, načasování výsadby a sklizně, použití pesticidů (Park et al. 1999).

I přes tato opatření je třeba dodržet základní kritéria při posuzování strategie dekontaminace:

- mykotoxin musí být inaktivován na netoxickou sloučeninu
- spóry VMH a mycelií by měly být zničeny, aby nedocházelo k tvorbě nových toxinů
- potraviny nebo krmiva by si měly zachovat svou nutriční hodnotu a zůstat chutné pro spotřebitele

- neměly by se výrazně měnit fyzikální vlastnosti suroviny
- dekontaminace musí být ekonomicky proveditelná, tzn. náklady na dekontaminaci musí být nižší než hodnota kontaminované komodity (Santini a Ritieni 2013)

Souhrn opatření proti kontaminaci mykotoxiny je popsán v tabulce č. 6.

Prevence	Typ opatření
Primární	Pěstování odrůd rezistentních na <i>A. flavus</i> , využití druhů geneticky modifikovaných
	Limitování invaze VMH během růstu a skladování plodin (dostatečné usušení po sklizni)
	Vhodné plánování výsadby a sklizně, obměna střídání kulturních plodin
	Vyvarování se sucha a jiných abiotických stresů
	Aplikace insekticidů, fungicidů
	Zvyšování živin v půdě (např. vápníku)
	Využití bio-kompetitivních bakterií (tzv. biologický boj)
Sekundární	Odstranění nebo omezení kontaminace houbami
	Detoxikace kontaminovaných produktů
	Chemická inaktivace nebo vazba aflatoxinů procesem zvaným amoniace

Tabulka č. 6 - Metody prevence primární a sekundární kontaminace aflatoxiny (Leslie et al. 2008, Malíř 2010)

Houby rodu *Aspergillus* se v silážích značí žlutou až zelenožlutou barvou, u *A. flavus* není vidět mycelium, *A. fumigatus* se často nachází v kukuřičné siláži. Druhy rodu *Penicillium* se nachází často na kukuřici a obilninách a vyznačují se zelenou až zelenomodrou barvou. Bílé až růžové zabarvení siláže může poukazovat na kontaminaci rodů *Fusarium*, *Mucor* nebo *Rhizopus*. Černě se zbarvuje *Claviceps purpurea* na obilovinách (Ruprich 1998).

Existuje několik rad a tipů, jak se vyvarovat požívání kontaminovaných potravin toxickými látkami a ochránit tak své zdraví:

- potraviny nakupovat plánovitě podle počtu a potřeb členů domácnosti
- při nákupu si potraviny důkladně prohlédnout, zkontrolovat dobu trvanlivosti a neporušenost obalu
- nekupovat potraviny do zásoby, aby se předešlo jejich dlouhodobému uchovávání a tím zvýšenému riziku kontaminace
- nekupovat „podezřele levné“ potraviny (týká se arašídů, pistácií, para ořechů, sušených plodů atd.), dávat přednost vyloupaným plodům před těmi v přirozených obalech (např. ve skořápkách)
- nekupovat potraviny s vizuálními změnami (vzhled, vůně, zápach, barva)
- nekonzumovat plesnivé potraviny, nevykrajovat je a nekrmit jimi hospodářská nebo domácí zvířata
- nekonzumovat plesnivé kompoty, zavařeniny a mošty (odebrání viditelné části plísňě nestačí, je třeba vždy zlikvidovat celý obsah)
- dodržovat základní hygienická pravidla při manipulaci s potravinami v domácnosti (důkladné mytí rukou, nezaměňovat utěrku na nádobí za ručník)
- pravidelně provádět úklid domácnosti tzn. dostatečně větrat, odstraňovat organické odpadky (Ostrý 2000)

1.9 Expozice

„Obecně platí, že chemická látka nebo její metabolit může vyvolat toxický účinek v biologickém systému jen tehdy, dosáhne-li v něm příslušných míst (receptorů) v příslušné koncentraci a po určitou dobu. Avšak např. u karcinogenních látek neexistuje žádný práh; protože žádná dávka není bezpečná, tj. hovoří se o jejich tzv. bezprahovém účinku“. Absorpce aflatoxinů může být uskutečňována cestou perorální (majoritní expozice - dietární), inhalační (Malíř, Ostrý et al. 2003) nebo dermální (minoritní expozice). Dietární expozice může být přímá a nepřímá. K přímé dochází konzumací kontaminovaných obilnin, olejnin, koření nebo čajů. K nepřímé expozici dochází konzumací kontaminovaného masa, mléka a sýrů (Malíř 2010). Odhad dietární expozice aflatoxinům pro populaci v ČR v 90. letech je uveden v tabulce č. 7 (Malíř, Ostrý et al. 2003). Inhalační profesionální expozice byla prokázána např. u mlynářů, pracovníků v mísírnách krmiv (Malíř et al. 2004, Malíř 2010) a v kukuřičném prachu během sklizně (Malíř, Ostrý et al. 2003). Zvýšené riziko se týká také zemědělců, krmičů dobytka, pracovníků zpracovávajících suché plody (arašídů, pistácie, mandle), pracovníků sladoven aj. Působení aflatoxinů může být zhoršeno i podvýživou, což je prokázáno zejména v rozvojových zemích např. u opic byla při nedostatku proteinů potvrzena zvýšená

vnímavost na aflatoxiny (Malíř, Ostrý et al. 2003). Intoxikací mykotoxiny jsou také ohroženi vegetariáni z důvodu zvýšeného přívodu mykotoxinů ze stravy, dále nemocní s chronickou renální insuficiencí (tzv. selhávání ledvin), u nichž dochází ke kumulaci látek z potravy z důvodu narušených fyziologických a detoxikačních schopností (Malíř et al. 2004).

Absorpce AFB₁ je rychlá, uskutečňuje se na úrovni tenkého střeva v duodenu a do jater přichází portální vénou. K distribuci z plazmy do hepatocytů dochází přes membrány pasívní difúzí. U potkanů byla podána dávka 70 µg.kg⁻¹ t. hm., přičemž po 12 hodinách se koncentrace AFB₁ snižovala následovně: ER, cytosol, mitochondrie, jádérka. Po biotransformaci je AFB₁ eliminována žlučí v konjugované formě na glutation, kyselinu glukuronovou a sulfát. U většiny živočichů tato eliminace činí asi 50 % vyloučeného množství. 15 - 25 % z podané dávky je vyloučeno močí v nezměněné formě nebo v podobě konjugovaných derivátů. Vylučování močí je pomalé. U myši, potkanů a opic se vyloučí za 4 dny od podání jedné dávky AFB₁ 70 - 80 %. Také se u těchto tří druhů prokázala kovalentní vazba 1 - 10 % dávky AFB₁ na jaterní proteiny.

U jednotlivých druhů zvířat probíhá absorbování aflatoxinů jinak. Např. u prasat krmených kontaminovanou potravou o koncentraci 1250 µg.kg⁻¹ AFB₁ došlo prakticky k úplnému vyloučení celé jim podané dávky po 4 dnech, až na rezidua aflatoxinů, která u nich perzistovala v játrech a ledvinách. U drůbeže nebylo nalezeno žádné reziduum po konzumaci kontaminovaného krmiva s 3,4 µg.kg⁻¹ AFB₁. Naopak při požití krmiva o 5 µg.kg⁻¹ byly rezidua nalezeny v játrech nosných slepic ještě 32 dní po požití. Množství AFB₁ ve vejcích bylo nižší než 0,5 µg.kg⁻¹ a zhruba po týdně nebyl AFB₁ nalezen ani v bílku, ani ve vaječném žloutku. U telat nebyla zjištěna rezidua při podávání kontaminovaného krmiva o koncentraci 600 µg.kg⁻¹ AFB₁ po dobu 7 dní. Rovněž bylo prokázáno, že mléko dojníc po konzumaci kontaminovaného krmiva o obsahu 300 µg.kg⁻¹ obsahuje 24 hodin po požití AFM₁ ve výši 1 µg.l⁻¹. Za 45 dní nebyl AFM₁ v mléce již detekovatelný (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Je důležité vždy zhodnotit, jak dlouho absorbování aflatoxinů probíhá. Doba expozice proto rozdělujeme na akutní (jednorázovou) a chronickou (opakovanou). Akutní expozice trvá obvykle 24 hodin, u inhalace 4 hodiny. Chronická expozice je opakované působení aflatoxinu v dávce nižší, než při akutní toxicitě. Expozice trvající po dobu 4 týdnů se nazývá subakutní, 1 až 3 měsíců subchronická a delší než 3 měsíce chronická (Malíř, Ostrý et al. 2003).

Mykotoxin	Potravina	Odhad dietární expozice ($ng \cdot kg^{-1} \cdot t \cdot hm \cdot d^{-1}$)	Čerpání PTDI ¹ (%)
Aflatoxiny	obiloviny a výrobky z nich, masné výrobky, mléko a mlékárenské výrobky	< 3	?

Tabulka č. 7 – Odhad dietární expozice aflatoxinů pro populaci v ČR v 90. letech (Malíř, Ostrý et al. 2003)

1.9.1 Expoziční limity

Expoziční limity pro mykotoxiny byly v letech 1995 a 2001 stanoveny na zasedáních Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA FAO/WHO) v rámci zemí EU. Hodnoty expozičních limitů pro mykotoxiny jsou stanoveny na základě analýzy jejich zdravotních rizik. JECFA FAO/WHO nestanovila pro aflatoxiny provizorní tolerovatelný týdenní příjem (PTWI), pouze byla dříve uvedena hodnota expozičního limitu ALARA – as low as reasonably achievable – co nejnižší možný příjem (JECFA FAO/WHO 1997, Malíř, Ostrý et al. 2003). Nově je stanovena hodnota BMDL₁₀.

U. S. EPA - Agentura pro ochranu životního prostředí ve Spojených státech amerických provádí hodnocení rizik pro řadu zdravotních účinků, které mohou být výsledkem expozice v životním prostředí. Tato hodnocení často zahrnují analýzu vztahu „dávka-odezva“ mezi expozicí a výsledkem souvisejícím se zdravím organismu. Tento proces je dán dvěma body: 1. definice výchozího bodu a 2. extrapolace tohoto bodu pro závažnost expozice u člověka. Referenční dávka (BMD) zahrnuje modelování odpovědi na dávku pro získání BMD, tj. úrovně dávky odpovídající specifickým úrovním odezvy blízko nízkého konce pozorovatelného rozmezí dat. Zahrnuje a poskytuje více informací než NOAEL (nejvyšší dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek) nebo LOAEL (nejnižší dávka, při které byl pozorován škodlivý účinek). Vědecký výbor EU (Scientific committees) potvrdil, že referenční dávka (BMD) je vědecky zdokonalená metoda ve srovnání s metodou NOAEL. Přístup BMD je použitelný pro všechny toxikologické účinky. Využívá všechny údaje o vztahu „dávka – odezva“ pro odhad celkového tvaru tohoto vztahu pro určitý koncový bod (Hardy et al. 2016).

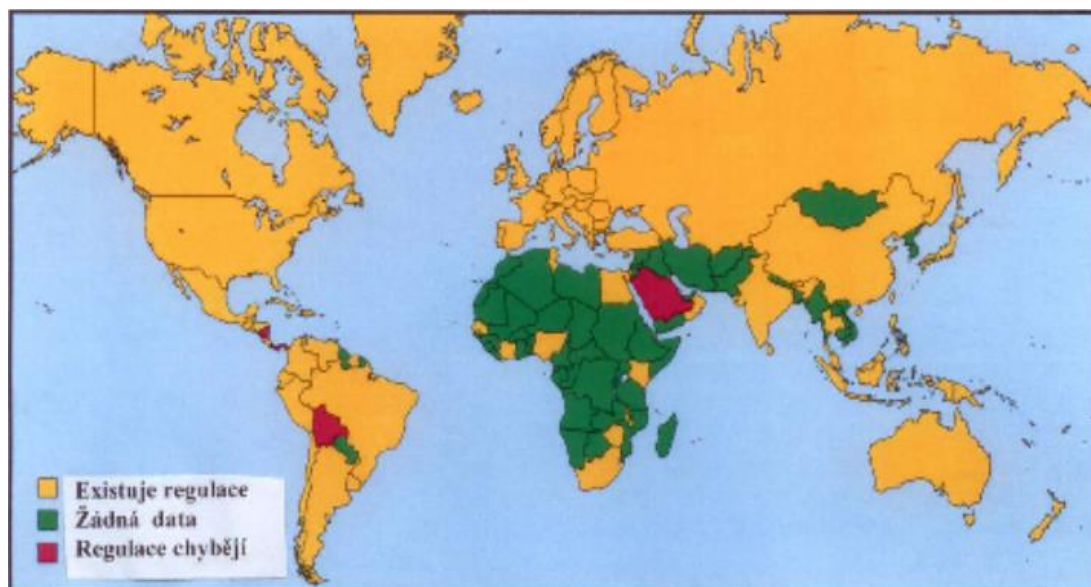
V zásadě lze přístup BMD aplikovat na každý koncový bod měřený v příslušných studiích. Jak uvádí Hardy et al. (2016), kritický efekt by pak byl zvolen analogickým způsobem jako je tomu v přístupu NOAEL, tj. nejen jako koncový bod vedoucí

k nejnižší BDML, ale s přihlédnutím k toxikologickým argumentům, jako je tomu u NOAEL.

BMDL₁₀ je koncový bod studie, který je spojen s 10 % mimořádného rizika nežádoucích účinků u exponovaných testovaných zvířat ve srovnání s úrovními původního rizika (Pesticide Research Institute 2013).

1.10 Hygienické limity

Aflatoxiny, zvláště ty, které jsou obsaženy v krmivech zvířat, představují vážné nebezpečí pro veřejné zdraví, neboť jsou vylučovány živočišnými produkty, jako jsou vejce nebo mléko, v poměrně toxické formě (Afzal 1979). Nedají se zničit procesy jako je pečení nebo pasterizace. Kvůli těmto rizikům existují mezinárodní předpisy určující hladinu aflatoxinů v potravinách (NMI 2010). V jednotlivých zemích se právní limity liší (Contreras-Medina et al. 2013), ale např. v rozvojových zemích jsou obecně mykotoxiny často neregulovány (Malíř 2010). V České republice jsou aflatoxiny v potravinách limitovány vyhláškou MZ 53/2002 Sb. (Malíř, Ostrý et al. 2003).



Obr. č. 7 – Mapa zobrazení regulace mykotoxinů ve světě (Malíř 2010)

V tabulce č. 8 jsou uvedeny maximální limity aflatoxinů v potravinách v EU. Maximální limity se aplikují na jedlou část plodů arašídů, ořechová jádra a sušené ovoce. Při výpočtu obsahu aflatoxinů při analýze ořechových jader ve skořápce se předpokládá, že veškerá kontaminace se týká jedlé části. V tabulce č. 9 jsou uvedeny maximální limity v Austrálii. V tabulkách č. 10 a 11 jsou uvedeny limity AFB₁ v Queenslandu (omezení u krmiv) a Novém Jižním Walesu (skladování potravin).

1.10.1 Evropská Unie

Potravina	Maximální limit (μg/kg)		
	B ₁	∑ B ₁ , B ₂ , G ₁ a G ₂	M ₁
Aflatoxiny			
Arašídý – určené k fyzikálnímu ošetření před přímou spotřebou nebo k použití jako potravinová složka	8,0	15,0	-
Arašídý – určené k přímé spotřebě nebo k použití jako potravinová složka	2,0	4,0	-
Obiloviny a všechny výrobky pocházející z obilovin (s výjimkou kukuřice, rýže, obilných příkrmů pro děti a dietních potravin), ořechy a sušené ovoce - určené pro přímou spotřebu	2,0	4,0	-
Ořechy a sušené ovoce jako surovina	5,0	10,0	-
Kukuřice, rýže – určené k fyzikálnímu ošetření před přímou spotřebou nebo k použití jako potravinová složka	5,0	10,0	-
Dětská výživa	0,5	2,0	-
Kojenecká výživa	0,5	1,0	-
Syrové mléko, tepelně ošetřené mléko, mléko pro výrobu mléčných produktů, mléčná kojenecká a dětská výživa	-	-	0,05

Tabulka č. 8 - Maximální limity aflatoxinů v potravinách v EU (Malíř, Ostrý et al. 2003, Grégrová 2010, Nařízení komise EU č. 165/2010)

1.10.2 Austrálie

Podle programu č. 19 – 5 Australských a Novozélandských potravinových standardů (Food Standards Australia New Zealand 2016) je stanovena maximální hladina aflatoxinu u arašídů a ořechů stromů (např. pistácií) při 0,015 mg/kg. Tato hodnota se vztahuje jak na dovážené, tak na domácí výrobky. Vzhledem k tomu, že jsou aflatoxiny tepelně stabilní látky, nejsou k dispozici žádné další úpravy dovezených potravin, které by mohly snížit hladinu aflatoxinů, pokud je přítomna. Lidská expozice aflatoxinům v potravě, zejména pocházejících z potenciálně bohatých zdrojů, jako jsou olejnatá semena (arašídý) a ořechy ze stromů (pistácie), by měla být udržována na nejnižší možné úrovni – princip ALARA (Food Standards Australia New Zealand 2016).

Potravina	Maximální limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$) pro aflatoxiny (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂)
Arašídny a pistácie – určené k dalšímu zpracování (ve skořápce i bez ní, surové, bílé, pražené nebo zpracované fyzikálními prostředky, tj. drcené nebo mleté), arašídové výrobky, pistáciové výrobky a potraviny obsahující složku >30 % arašídů, pistácií (př. oříškové oleje/másla/pasty, ořechová mouka, sójové omáčky, některé pekařské výrobky atd.)	15,0
Mandle, pistácie, lískové ořechy – určené k přímé spotřebě	10,0
Ostatní potraviny	5,0

Tabulka č. 9 - Maximální limity aflatoxinů v potravinách v Austrálii (Mazumder a Sasmal 2001, NMI 2010, Australia New Zealand Food Standards Code 2011, Food Standards Australia New Zealand 2016)

1.10.3 Queensland

Hlavním aflatoxinem nalezeným v plodinách bývá AFB₁. Je důležité kontrolovat obsah aflatoxinů v mléčných produktech, protože až 5 % aflatoxinů přijatých v potravě zvířat přechází do jejich mléka.

V Queenslandu jsou hladiny AFB₁ u některých krmiv omezeny. Podle nařízení o biologické bezpečnosti (Biosecurity Regulation 2016) jsou pro zvířata, která jsou určena k produkci potravin, stanoveny maximální limity AFB₁ dle následující tabulky:

Potravina	Maximální limit v Queenslandu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
arašídny, arašídová moučka - určená k potravě dojných zvířat	20,0
olejnatá semena - určená k potravě dojných zvířat	100,0
ostatní krmiva - určená k potravě dojných zvířat	200,0

Tabulka č. 10 - Maximální limity AFB₁ v krmivech pro zvířata v Queenslandu v Austrálii (Queensland Government 1995)

1.10.4 Nový Jižní Wales

V australském Novém Jižním Walesu se vláda zaměřuje na správné podmínky při skladování potravin, aby nedocházelo ke kontaminaci aflatoxiny. Potraviny jsou regulovány tak, aby nedocházelo k přenosu toxických látek potravním řetězcem, k ochraně zdraví zvířat a lidí, a aby byly splněny požadavky pro trh.

Potravina	Maximální limit v Novém Jižním Walesu (µg/kg)
Obilí a drcená zrna	10,0
Skladové potraviny pro dobytek, ovce a prasata	50,0
Skladové potraviny pro selata (kojené i odkojené)	10,0
Skladové potraviny pro kachny	1,0
Skladové potraviny pro drůbež (kromě kachen a kuřat)	10,0
Skladové potraviny pro dojnice, kuřata	20,0

Tabulka č. 11 - Maximální limity AFB₁ ve skladovaných potravinách v Novém Jižním Walesu v Austrálii (NSW Government 2017)

1.10.5 Svět

Přibližně 100 zemí celého světa má ze zákona určené předpisy upravující množství aflatoxinů v potravinách. Většinou obsahují maximální přípustné limity nebo doporučené množství těchto látek v různých komoditách.

Země	Maximální limit aflatoxinů (µg/kg)		
	Aflatoxin B ₁	∑ Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Aflatoxin M ₁
EU	2 - 8 µg/kg v závislosti na druhu komodity, 20 µg/kg v krmivech	4 - 15 µg/kg v závislosti na druhu komodity	0,05 µg/kg v mléce a mléčných produktech
USA	-	20 µg/kg ve všech komoditách (kromě mléka), v krmivech pro zvířata	0,5 µg/kg v mléce
Brazílie	-	1 - 20 µg/kg v obilovinách (kromě kukuřice),	0,5 µg/kg v mléce, 2,5 µg/kg v sýrech

		v sušeném ovoci, ve výrobcích z kaka, koření atd.	
Kanada	-	15 µg/kg v arašidech	-
Čína (potravin)	5 – 20 µg/kg v závislosti na druhu komodity	-	0,5 µg/kg v mléce a mléčných produktech
Čína (krmiva)	<10 - <50 µg/kg v závislosti na druhu komodity	-	-
Japonsko	-	10 µg/kg	0,5 µg/kg
Indonésie (potravin)	15 µg/kg v kukuřici a veškerém koření	20 µg/kg v kukuřici a veškerém koření	0,5 µg/kg v mléce a mléčných produktech
Indonésie (krmiva)	-	20 – 50 µg/kg v závislosti na druhu komodity	-
Korejská republika	10 µg/kg ve všech komoditách (kromě mléka)	15 µg/kg ve všech komoditách (kromě mléka)	0,5 µg/kg v surovém mléce
Vietnam	-	10 µg/kg ve všech komoditách	-
Thajsko	-	20 µg/kg ve všech komoditách	-
Indie	-	30 µg/kg ve veškerém koření	-
Jihoafrická republika	-	10 µg/kg ve všech komoditách	-
Nový Zéland		15 µg/kg v arašidech a produktech z arašídů, 5 µg/kg v ostatních komoditách	

Tabulka č. 12 - Porovnání maximálních limitů aflatoxinů v různých zemích světa (FDA 1980, Mazumder a Sasmal 2001, Lawley et al. 2008, Ministério da Saúde 2011, GAIN 2014, Romer Labs 2016, CAC 2018)

Rozvojové země mají velký problém s uvedením těchto výrobků na trh do zahraničí kvůli přísným mezinárodním předpisům týkajících se těchto toxinů. Týká se to také nákladů na monitorování produktů, které vyžadují sofistikované vybavení a kvalifikovaný personál, z nichž není ani jeden požadavek k dispozici v terénu. Proto byl vynalezen Aflatoxin Quicktest™ pro jednoduché, rychlé a efektivní vyhodnocení daných produktů (Sánchez-Bayo et al. 2017).

2 Plodiny

V následujících podkapitolách jsou uvedeny obecné informace o zkoumaných plodinách, tedy o kukuřici, čiroku, podzemnici olejné a pšenici.

2.1 Kukuřice

Kukuřice (*Zea mays* L.) je obilovina, která se pěstuje po celém světě (Ostrý et al. 2015), a je původem z jižního Mexika. Jedná se o plodinu s největší světovou produkcí (Hoskovec 2008). Slouží jako základní potravina pro miliony lidí a je důležitým zdrojem krmiv pro domácí zvířata. Např. v roce 2012 dosáhla celosvětová produkce 875 milionů tun. Pro představu, je to více než produkce rýže (718 milionů tun) nebo pšenice (675 milionů tun). Největšími producenty jsou USA, Čína, Brazílie, Mexiko, Argentina, Indie a Indonésie. Přibližně 70 % celosvětové produkce kukuřice je určeno k výživě zvířat nebo pro průmyslové využití. Hlavními zeměmi, které plodinu vyvážejí, jsou USA (53 %), Čína (19 %) a Argentina (17 %). Pokud není prováděn správný postup při skladování kukuřice, podle platných hygienických podmínek, může docházet k invazi několika druhů hub (např. *Aspergillus* nebo *Fusarium*). Uvedené druhy hub jsou potenciálními producenty mykotoxinů – aflatoxinů, fumonisinů, ochratoxinu A, zearalenonů apod. (Ostrý et al. 2015). Nejvíce odolná jsou kukuřičná zrna během rané části svého růstu. Avšak první kontaminace VMH začíná pravděpodobně při rozkladu vrcholné části zrna, kdy se vytváří ideální prostředí pro jejich růst v rostlinných pletivech (Jesenská 1993), protože poškozená zrna kukuřice (i jiných plodin) jsou ke kontaminaci vždy náchylnější (Ostrý et al. 2015).

Kukuřice bývá infikována pouze druhem *A. flavus* (IARC 2002). Tato houba napadá i arašídů, nicméně kukuřice je z neznámého důvodu infikována v menší míře. V každém případě je její obsah v lidské stravě a krmivech pro zvířata nižší (Pitt 2006).



Obr. č. 8 – kukuřice setá (*Zea Mays*)

2.2 Čirok

Čirok obecný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) je obilovina původem pocházející z Etiopie. Jedná se o nejvýznamnější plodinu aridních oblastí schopnou růst i v limitujících podmínkách. Ve srovnání s kukuřicí vyžaduje teplejší podmínky a lépe snáší sucho. V České republice se nejvíce pěstuje čirok súdánský, dále čirok cukrový a nejmenší výměru vykazuje čirok zrnový (Skládanka 2006).



Obr. č. 9 – čirok (*Sorghum* sp.)

2.3 Podzemnice olejná

Podzemnice olejná (*Arachis hypogaea* L.) je kulturní rostlina pocházející původně ze subtropických a tropických oblastí jižní Ameriky (Kovář 2008). Řadí se mezi 10 nejvýznamnějších potravinářských plodin na světě a je hlavním zdrojem bílkovin a oleje (Thyer 2006). Ze semen se vyrábí olej, který se využívá v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Pražená semena jsou známá jako pochutina – arašídy, burské oříšky (Kovář 2008). V Austrálii byly a jsou dominantním problémem aflatoxiny v arašídech, a to proto, že se zde pěstují ve velmi značném rozsahu (Pitt 2006). Problém zde přetrvává téměř 30 let, avšak až poslední dobou jsou hlavní záležitostí pro pěstitele arašídů. Od ledna 2007 do února 2016 došlo v Austrálii ke dvěma odvoláním dovozu arašídů a pistácií z důvodu přítomnosti aflatoxinů (Food Standards Australia New Zealand 2016). Australský arašídový průmysl má vynikající výsledky v odstraňování kontaminovaných arašídů z potravinového řetězce a kontroluje dané produkty, aby jejich hodnota aflatoxinů byla pod 15 µg/kg. Tato hodnota je určena podle Národní zemědělské komodity marketingové asociace v Austrálii, tzv. NACMA (Chauhan et al. 2010). Aby bylo riziko kontaminace ještě nižší, dohlíží průmysl i na prevenci nebo minimalizaci produkce aflatoxinů na farmách (Queensland Government 2010).



Obr. č. 10 – podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*)

2.4 Pšenice

Pšenice (*Triticum* L.) je jednou z nejstarších obilovin, která se rozšířila na většinu severní i jižní polokoule z jihozápadní Asie. Řadí se do rodu jednoděložných rostlin do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Jedná se o jednu z nejstarších obilnin. Z hlediska půdních vlastností jsou pro pšenici nejvhodnější černozemě, hnědozemě, rendziny,

ideálně s neutrálním pH, ale snese slabě kyselé i slabě alkalické půdy. Nejvhodnějšími půdními druhy jsou střední-hlinité, jílovito-hlinité až hlinito-jílovité, které mají vyrovnaný poměr vody a vzduchu v půdě a dobrou půdní strukturu. Požadavky pšenice na vláhu jsou velmi vysoké (Moudrý 2006). Je také náročná na optimální teplotu a na předplodinu (u nás zpravidla vojtěška). Při pěstování v horších podmínkách je vhodná spíše pro technické a krmné účely (Cibulka 2010).



Obr. č. 11 – pšenice setá (*Triticum aestivum*)

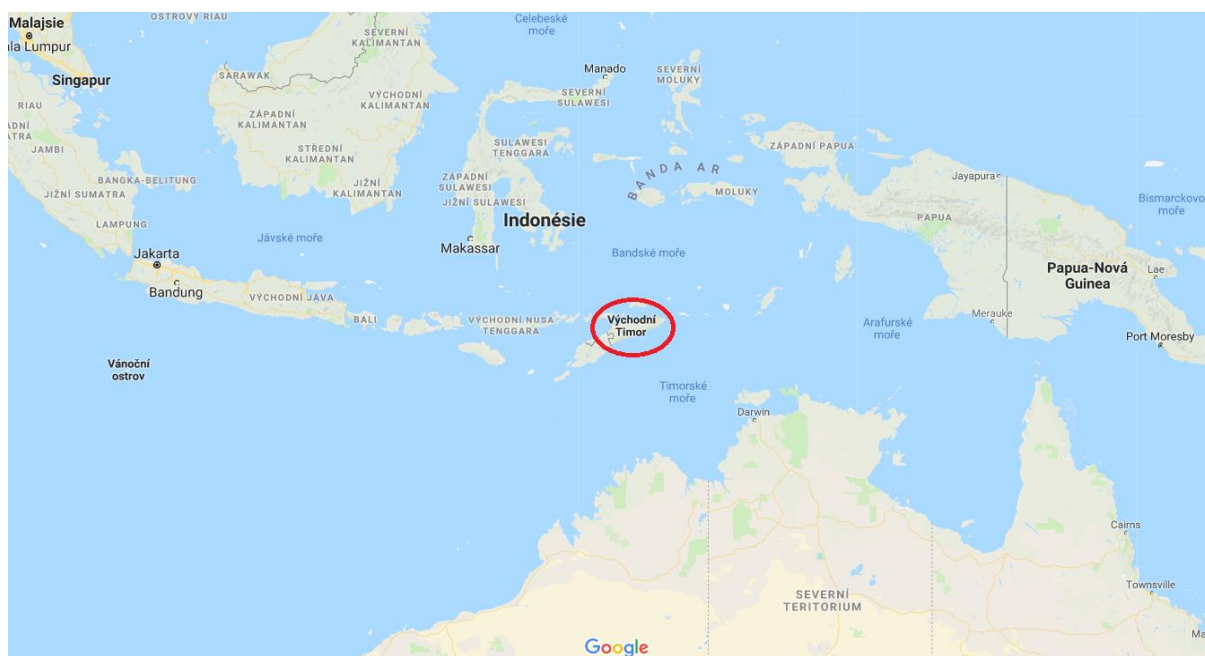
3 Lokality

3.1 Indonésie - Východní Timor

Východní Timor, oficiálním názvem Východotimorská demokratická republika, je malý, tropický stát rozprostírající se na východní straně ostrova Timor. Nachází se mezi Malajsií a Melanésií asi 500 km severně od Austrálie. Ve vnitrozemí je suché, tropické a horké podnebí, avšak na pobřeží převládá vlhko s monzunovými srážkami. Nejdůležitějším odvětvím hospodářství je zemědělství (Východní Timor nedatováno). Pěstuje se zde hlavně rýže, kukuřice, batáty, kasava, arašídů nebo fazole (Seeds of Life 2011). Mezi hlavní vývozní artikly patří kaučuk, kávové boby, kokosové ořechy a tropické ušlechtilé dřevo (Východní Timor nedatováno). Z hlediska výživy se Východní Timor řadí mezi nejhorší na světě, až 58 % obyvatel trpí sníženým růstem důsledkem podvýživy a 38 % trpí anémií, tj. sníženým počtem červených krvinek často způsobeným nedostatkem železa. Anémie může způsobovat vážné zdravotní následky. Organizace Seeds of Life v rámci Ministerstva zemědělství a rybolovu se přímo zabývá tímto národním problémem zlepšením zabezpečení potravin zvýšením produkce hlavních potravinářských plodin (Seeds of Life 2011).

V celé Indonésii se ročně vyprodukuje více než 800 000 tun arašídů, přičemž poptávka překonává místní nabídku. Indonésie patří k jedněm z největších dovozců arašídů na světě. Téměř všechny arašídů jsou zkonsumovány lidmi jako potravina, zejména v chudších zemích, a to z důvodu velkého podílu bílkovin, olejů a vitamínů. Nicméně problémem souvisejícím s konzumací arašídů je jejich častá kontaminace aflatoxiny. Dr. Graeme Wright z Queenslandského oddělení průmyslu a rybolovu tvrdí, že aflatoxin napadá arašídů během produkce nebo brzy po sklizni, a je častější u arašídů, které jsou vystaveny stresu v období sucha (Thyer 2006).

Metoda Aflatoxin Quicktest™ byla ve Východním Timoru předvedena v listopadu roku 2015 vedení timorského Ministerstva zemědělství a rybolovu australskými experty z University v Sydney (Yessy 2015). Díky tomuto školení mohou nově timorští zemědělci prodávat kvalitní kukuřičná zrna místní společnosti Timor Global, která vyrábí potravinářské výrobky. Nová metoda testování zajistí, že pouze obiloviny, které jsou bezpečné a nekontaminované, mohou být prodány a následně přeměněny na potravinářské výrobky (Ximenes 2016). Timor Global je místní agropodnikatelská společnost, která se zabývá především vývozem kávy. Dále vlastní dceřinou společnost Timor-Vita, která vyrábí potraviny obohacené o kukuřici a sóju, určené pro děti a kojící matky. Dříve byly plodiny testovány v zahraničí, což zvyšovalo jejich nákladnost a také dobu potřebnou pro jejich zpracování (Cardoso a Santos 2014).



Obr. č. 12 – Mapa Východního Timoru

3.2 Austrálie

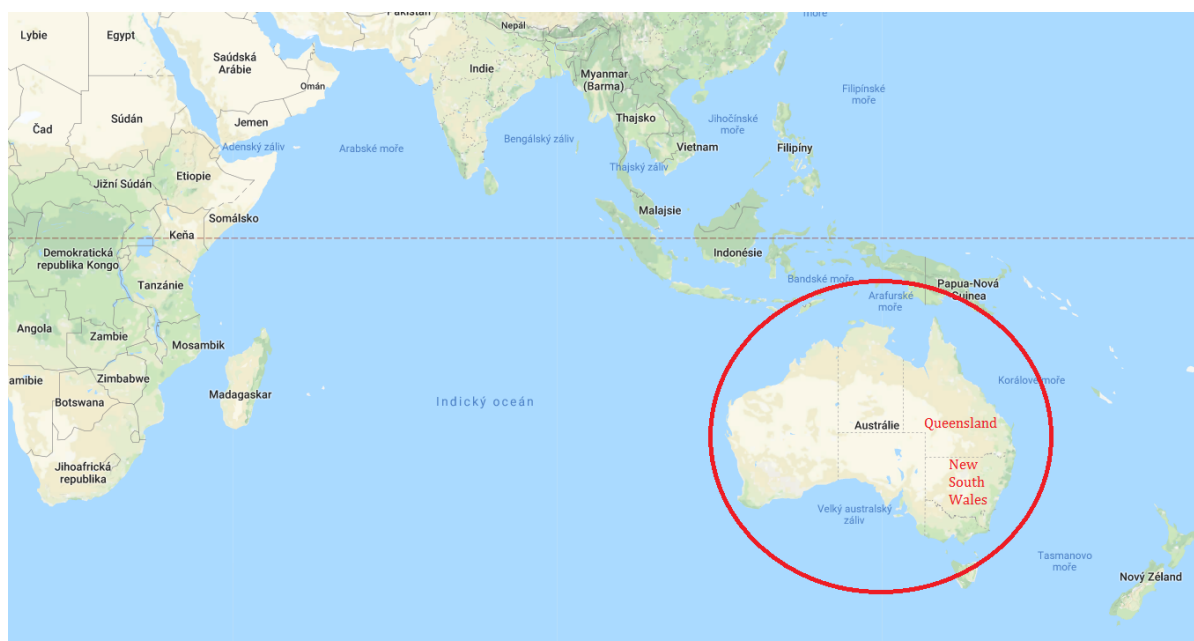
Austrálie je nejmenším osídleným světadílem, ale současně šestým největším státem zeměkoule. Dělí se na 6 států: Nový jižní Wales, Queensland, Jižní Austrálie, Tasmánie, Victoria a Západní Austrálie (Austrálie nedatováno). Z jedné strany je australský kontinent omýván Tichým oceánem a z druhé strany Indickým oceánem (Smith 2009). Přibližně 2/3 povrchu zaujímá pouštní oblast Západoaustralské plošiny. Na východ se rozprostírá Velká artéská pánev, označovaná jako nejvýznamnější australská zásobárna vody, a to díky velkému množství podzemní vody na řece Murray, největší v Austrálii (Austrálie nedatováno). Jelikož se jedná o rozlehlou zemi, vyskytují se zde tropy, subtropy a také teplé mírné zóny. Většina

kontinentu je aridní nebo semiaridní, plodiny tak zrají za suchých a horkých podmínek. To omezuje tvorbu mykotoxinu na několik specifických plodin a míst (Pitt a Hocking 2006).

Celý kontinent je velmi zajímavý převážně díky svému přírodnímu bohatství. Nejznámější australská fauna zahrnuje ptakopyska a ježuru z řádu ptakořitních, z ptáků emu a kasuára, z vačnatců pak koalu medvítkovitého, klokana nebo vombata. Vzhledem ke svému geografickému umístění se zde nachází mnoho unikátních organismů, tzv. endemitů. Typickým příkladem endemitého živočicha je koala medvítkovitý. Australská flóra zahrnuje známý blahovičník (*Eucalyptus* sp.) nebo trnovníky (*Acacia* sp.) (Austrálie nedatováno).

Zcela unikátním divem přírody je Velký bariérový útes rozléhající se na severovýchodním pobřeží Austrálie. Jedná se o řetězec korálových útesů a tropických ostrůvků (Smith 2009) a je jedinou stavbu vytvořenou živými organismy, která je viditelná i z měsíce (Janoušová 2002).

Austrálie je vyspělý průmyslově zemědělský stát, který je výrazně exportně zaměřený. Orná půda a trvalé kultury zauímají pouze 6,5 % rozlohy státu, více než 50 % připadá na pastviny. Nejdůležitějšími plodinami jsou cukrová třtina, pšenice, bavlna, rýže, čirok, luštěniny, tabák. Důležitá je také živočišná výroba, téměř jedna třetina kontinentu je vyčleněna pro chov ovcí, dále pak např. pro chov skotu (Austrálie - stát nedatováno).



Obr. č. 13 – Mapa Austrálie

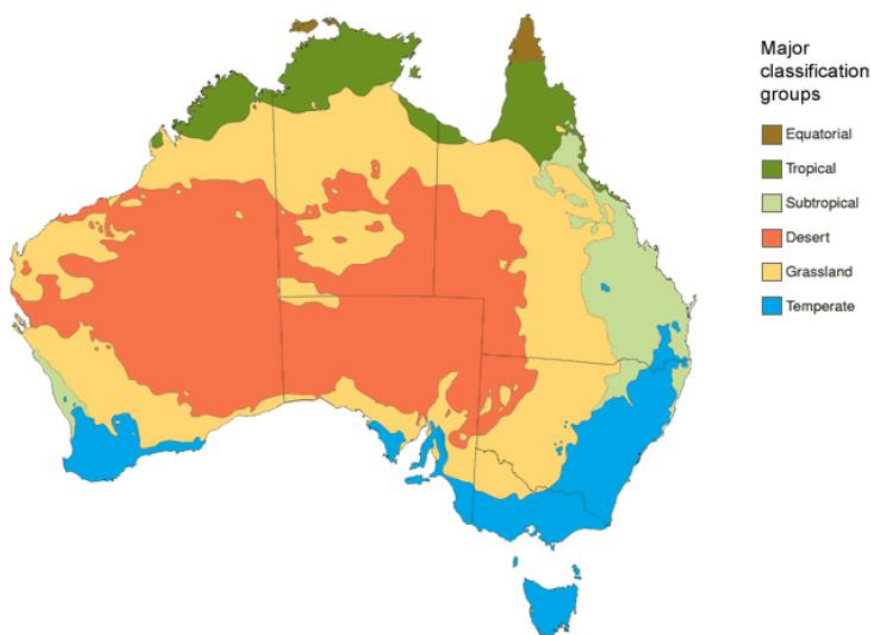
Pozn.: Červeným písmem jsou na mapě Austrálie vyznačené státy Nový Jižní Wales a Queensland. Z těchto oblastí byly odebrány vzorky plodin pro náš výzkum.

3.2.1 Nový Jižní Wales

V jihovýchodní části Austrálie, v Novém jižním Walesu, se rozprostírají téměř všechny biotopy, které tato země nabízí; od subtropických deštných pralesů po vysokohorské pastviny a pouštní oblasti. Je nejstarší australskou kolonií a na pobřeží leží hlavní město Nového jižního Walesu – Sydney. Na jižní straně oblasti se rozlévá řeka Murray, na severním pobřeží se rozléhají banánové plantáže a na západě pouštní oblasti. Ve východní části se nalézá národní park Dorrigo s deštnými pralesy, které byly zařazeny do seznamu světového dědictví UNESCO (Smith 2009).

3.2.2 Queensland

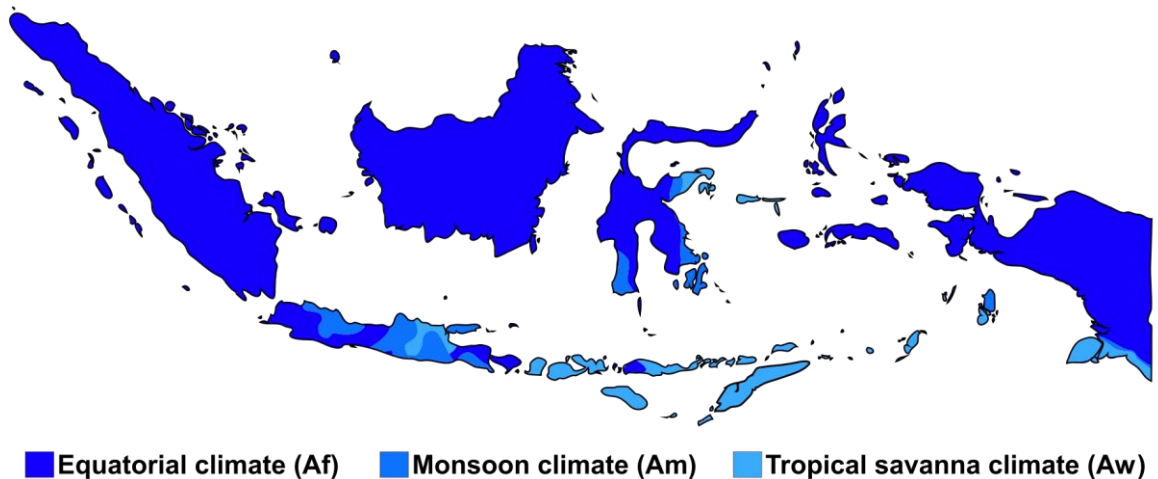
Australský severovýchodní stát se nachází v subtropickém až tropickém regionu a ve srovnání s jinými průmyslovými zeměmi má relativně nízkou hustotu obyvatel (Müller et al. 2000). Nachází se zde zalesněné hory, stovky tropických ostrůvků roztroušených podél Velkého bariérového útesu, tisíce kilometrů pláží. Na jihu se rozkládá Zlaté pobřeží (angl. Gold Coast) se zábavními parky, nočními kluby, automobilovými závody, a Slunečné pobřeží (angl. Sunshine Coast), což je mnohem klidnější část vhodná pro Australany na trávení dovolené. Dalším zajímavým místem v Queenslandu je největší písčný ostrov světa – Fraser Island. Jedná se o nádhernou oázu polních květin, deštných pralesů, barevných pískovcových útesů a sladkovodních jezer. V této části se pěstují hodně ananasy, banány a např. cukrová třtina (Smith 2009).



Obr. č. 14 – Klimatické stupně podle Köppenovy klasifikace podnebí v Austrálii

Pozn.: Austrálie je velmi rozsáhlý kontinent, na jehož území nalezneme několik podnebných pásem. Od severu se zde rozprostírá částečně rovníkový neboli ekvatoriální stupeň, následně tropické a subtropické podnebí, velkou část zaujímají pouštní travnaté oblasti, na jihu a částečně jihovýchodě je mírné podnebí, ve kterém se nachází Nový Jižní Wales a Queensland.

Indonesia map of Köppen climate classification



Obr. č. 15 – Klimatické stupně podle Köppenovy klasifikace podnebí v Indonésii včetně Východního Timoru

Pozn.: Východní Timor a pár dalších ostrovů Indonésie patří k oblastem, kde se nachází tropické monzunové podnebí.

4 Stanovení aflatoxinů

Kromě bezpečnostních otázek je kontaminace potravin těmito přírodními toxiny také hospodářským problémem, proto je věnováno hodně úsilí vývoji rychlých, jednoduchých a přesných metod screeningu aflatoxinů, aby bylo umožněno jejich průběžné sledování a kontrolování v potravinách a krmivech (Anfossi et al. 2013a). Abychom zjistili množství aflatoxinů ve vzorku, je nutné dodržovat postup, který je popsán v následujících podkapitolách.

4.1 Odběr vzorku

V první řadě, ač se jedná o jakoukoliv metodu analýzy, je nutné nasbírat potřebné množství daného vzorku, který chceme zkoumat. Vzorky potravin, potravinových surovin a krmiv bývají často nehomogenní směsi (Malíř, Ostrý et al. 2003,

Kaderová 2008). Nehomogenita přirozeně kontaminovaných vstupních surovin aflatoxiny je běžná, proto musí být proveden reprezentativní odběr vzorku. Také je důležité jejich dostatečné zhomogenizování (Malíř, Ostrý et al. 2003).

4.2 Extrakce

Extrakce všech mykotoxinů (včetně aflatoxinů) se provádí s pomocí extrakčního rozpouštědla na laboratorní třepačce, homogenizátoru nebo v mixéru. K extrakci se nejčastěji používá metanol, chloroform, aceton, acetonitril aj. Při použití 50-80% vodného roztoku metanolu jako extrakčního činidla může účinnost extraktu zlepšit přídavek NaCl. Po extrakci se vzniklá směs přefiltruje přes filtrační papír za vzniku supernatantu.

4.3 Čištění

Čištění extraktu patří k nejnáročnější části postupu analytického stanovení mykotoxinů. Může být prováděno extrakcí z kapaliny do kapaliny, pomocí imunoafinitní chromatografie (IAC), extrakcí na pevnou fázi (SPE) nebo gelovou filtrací (GPC) (Malíř, Ostrý et al. 2003).

4.4 Analytické metody

Počátkem roku 2000 došlo k výraznému rozvoji komerčně vyráběných přístrojů pro zjednodušení měření aflatoxinů včetně vývoje podrobných návodů (manuálů) měření. Zejména došlo k prudkému rozvoji imunologických testů, díky kterým aflatoxiny mohly být snadněji změřeny. Jelikož se jedná o sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (Anfossi et al. 2013b), bylo navrženo a přezkoumáno mnoho metod stanovení aflatoxinů v potravinách a zemědělských produktech (Won-bo et al. 2007). Aktuálně je stanovení těchto toxinů dáno nejčastěji imunochemickými a chromatografickými metodami.

4.4.1 Imunochromatografické metody

Lateral Flow Immunoassay

Populární metodou pro rychlou identifikaci mykotoxinů poukazující pouze na hrubý odhad jejich koncentrace je imunochromatografická metoda Lateral Flow Immunoassay (Rai a Varma 2010). V literatuře se o ní objevila zmínka poprvé asi před deseti lety a byla jedním z prvních hlášených průtokových testů pro kontaminující látky v potravinách. Metoda Lateral flow Immunoassay (LFIA) byla popsána pro kvantitativní i semikvantitativní detekce aflatoxinů v potravinách a krmivech (Anfossi et al. 2013b).

4.4.2 Imunochemické metody

Imunochemické metody slouží pro screeningové stanovení vybraných mykotoxinů v potravinách a zemědělských komoditách. Jsou založeny na použití antigenu a protilátky. Řadí se sem metoda ELISA a RIA, které jsou konkrétněji popsány níže. Pomocí těchto metod lze stanovit v původním biologickém materiálu řadu cizorodých látek.

ELISA

ELISA (z angl. **E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod, která je založená na reakci antigenu (aflatoxiny, mykotoxinu) s protilátkou. U té se měří množství navázaných látek pomocí přidání enzymem značeného antigenu či protilátky (Malíř, Ostrý et al. 2003). Metoda byla vyvinuta v 70. – 80. letech 20. století výzkumným týmem ze Švédska (Straková 2011). Vlastnostmi této metody jsou dobrá citlivost, rychlost a jednoduchost (Contreras-Medina et al. 2013).

RIA

RIA je starší imunologická metoda, která byla popsána v roce 1960 (Straková 2011). Je založená na podobném principu jako ELISA, tj. na reakci antigenu a protilátky, a je také velmi citlivá. Avšak narušil od metody ELISA produkuje radioaktivní záření a není tak časově nenáročná.

4.4.3 Chromatografické metody

Chromatografické metody sloužící ke zjišťování obsahu aflatoxinů v různých látkách jsou separační techniky, které využívají dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá stacionární (nepohyblivá). Při dělení dochází k opakovanému transportu molekul složek do stacionární fáze a zpět do mobilní (Malíř, Ostrý et al. 2003). Tento název je souhrnným označením pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod.

TLC

TLC (z angl. **T**hin-**L**ayer **C**hromatography) neboli metoda chromatografie na tenké vrstvě (Kaderová 2008) se řadí mezi rychlé analytické metody. Jedná se o metodu separace složek z kapalného média.

HPTLC

HPTLC (z angl. **H**igh **P**erformance **T**hin-**L**ayer **C**hromatography) neboli vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (Malíř, Ostrý et al. 2003) byla vyvinuta na základě klasické TLC metody. Výhodou je miniaturizace celého zařízení a snížení množství nanášených látek.

HPLC

HPLC (z angl. **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Šimůnek 2000) pojednává o souboru metod založených na různém mechanismu separace, jejichž společným znakem je použití kapalných fází, vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu. Jedná se o nejčastější a nejcitlivější současný způsob identifikace mykotoxinů (Rai a Varma 2010).

HPLC-MS

Spojení metody HPLC s tzv. hmotnostní detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (MS). Toto spojení umožňuje jednoznačnou identifikaci vzorku, mykotoxinu (Malíř, Ostrý et al. 2003, Rai a Varma 2010). Je to metoda vhodná pro stanovení aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂ v krmivech (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2015). Metody LC-MS zahrnují nejdražší přístroje a vyžadují obsluhující odborníky na vysoké úrovni (Rai a Varma 2010).

Pozn.: Ke své diplomové práci jsem pro stanovení množství aflatoxinů ve vzorcích vybraných plodin využívala nejnovější metodu, která není v České republice běžně a často používaná. Jedná se o inovativní metodu Aflatoxin Quicktest™, která byla poprvé zkoumána a uznána za přesnou a srovnatelnou s ostatními výše zmiňovanými metodami vědeckými experty v Austrálii.

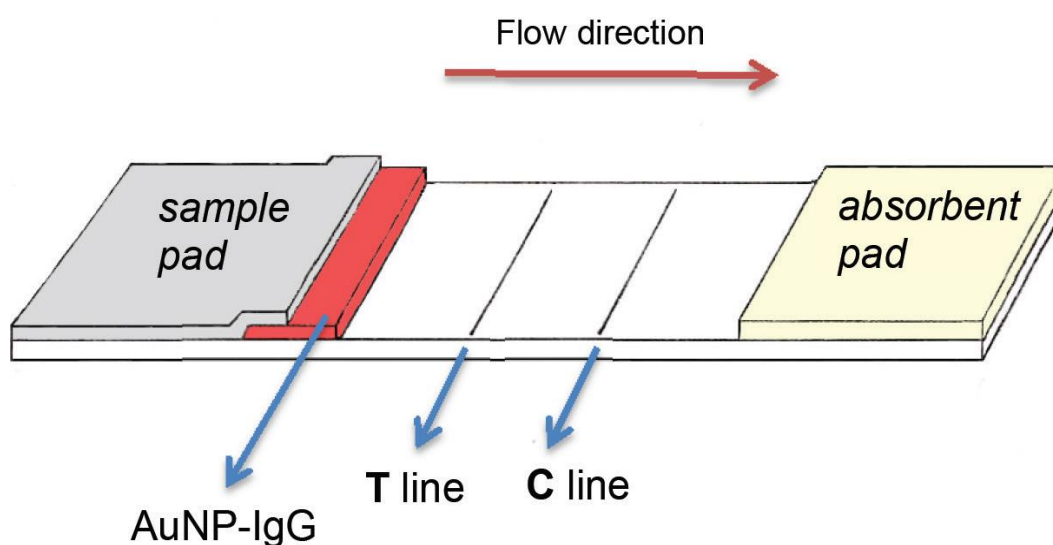
5 Aflatoxin Quicktest™

5.1 Charakteristika

Quicktest technologie vyvinula zkompletovaný a snadno použitelný Aflatoxin Quicktest™, který je schopen stanovit úroveň kontaminace tímto toxinem u všech zemědělských produktů. Jedná se o zařízení, které poskytuje efektivní, spolehlivé a nízkonákladové možnosti stanovení množství aflatoxinů a splňuje regulační prahové hodnoty pro účely zemědělské výroby. Aflatoxin Quicktest™ lze použít dvěma způsoby:

1. jako kvalitativní nástroj, který indikuje úroveň kontaminace aflatoxiny nad nebo pod určitou hranicí (ano = existuje kontaminace, ne = neexistuje kontaminace).
2. jako kvantitativní nástroj, který stanovuje přesné množství aflatoxinů ve zkoumaném vzorku. Pro kvantitativní posouzení slouží přenosný Aflatoxin Quicktest™ Reader, čtečka vybavená softwarovým zařízením, které je vyvinuté pro tento účel.

Každý test trvá 15 minut a vyžaduje pouze 2 kapky předem připraveného extraktu. Pro extrakci nejsou potřeba žádná nebezpečná rozpouštědla kromě metanolu. Dále se používá pouze fosfátový pufr (PBS) pro zředění extraktů vzorků (Aflatoxin Quicktest™ workshop 2015).



Obr. č. 16 – Schematický diagram zařízení s laterálním průtokem

Pozn.: Schematický diagram zařízení s laterálním průtokem (LFD – z anglického Lateral Flow Device). Nitrocelulóзовý pás je potažen roztokem konkrétního cílového analytu (linie T) a obecné protilátky (linie C), tzv. kontrola (angl. control). Vzorová podložka (Sample pad) obsahuje nanočástice zlata konjugované se specifickými protilátkami analytu (AuNP-IgG). Absorpční podložka (Absorbent pad) na druhém konci zachycuje přetečení roztoku přes pás (Sánchez-Bayo 2017).

Aflatoxin Quicktest™ je schopen detekovat množství aflatoxinů při koncentraci 0,1 µg/l v kapalných vzorcích (voda, mléko), u pevných vzorků (zrna, ořechy), které vyžadují extrakci s methanolem nebo ethanolem (v našem případě byl použit methanol), musí být použito desetinásobné zředění, aby se zabránilo závažné inaktivaci protilátky.

Testovací kazety jsou stabilní při normální pokojové teplotě (20 – 25 °C) a nevyžadují zvláštní skladování. Doba jejich životnosti je asi jeden rok (Aflatoxin Quicktest™ workshop 2015).

Obvykle, pokud je potřeba změřit množství aflatoxinů v zrnech a potravinách, je potřeba sofistikované zařízení, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jedná se o velmi specializované zařízení, které není v některých zemích momentálně k dispozici. Např. ve Východním Timoru jsou vzorky běžně odesílány pro analýzu HPLC do Indonésie, nejedná se tedy o nejlevnější způsob. Metoda Aflatoxin Quicktest™ je mnohem levnější, jednodušší a nevyžaduje speciální vybavení. Výsledek je k dispozici poměrně rychle s přesností 90 % a více (Yessy 2015).

5.2 Vlastní test

Pro spuštění testu je potřeba umístit, pro Aflatoxin Quicktest™ optimálně, dvě kapky extraktu vzorku na vzorkovou podložku (Sample pad), tím se rozpustí nanočástice AuNP-IgG a následně běží bočně přes pás směrem k absorpční podložce (Absorbent pad). Jakýkoliv aflatoxin přítomný ve vzorku bude soutěžit s nanočásticemi AuNP-IgG na T-linii, kde se na ně bude vázat nadbytek konjugovaného antigenu a vytvoří tak barevnou linii. Zbývající nanočástice AuNP-IgG pokračují stejným směrem a vážou se na G-IgG částice na C-linii, která také produkuje barvu. Doba pro vyhodnocení výsledku činí asi 15 minut s tím, že 5 minut postačí pro počáteční vizuální detekci.

5.3 Vyhodnocení testu

Interpretace testu je přímá: nepřítomnost barvy na T-linii vyznačuje vysokou koncentraci aflatoxinů v extraktu daného vzorku, neboť byly vyloučeny nanočástice zlata, zatímco přítomnost barvy na T-linii ukazuje na nepřítomnost aflatoxinů, tedy na čistý vzorek. Vybledlá barva na T-linii vyznačuje přítomnost nějakého aflatoxinu, a to způsobem, že čím méně barvy, tím více množství aflatoxinů je ve vzorku přítomno. Co se týče C-linie, barevná čára potvrzuje, že je test platný. Pokud se na C-linii barva neobjeví, páska je vadná a test je neplatný.

Pracovní rozsah metody Aflatoxin Quicktest™ je v rozmezí od 0,1 do 2,0 µg/kg pro přímou analýzu vzorků, ale 2,0 až 40,0 µg/kg pro vzorky pevných látek (zředěné desetkrát). Vzorky, které dosáhnou hodnot nad rozsah detekce, se znovu ředí a následně analyzují.

5.4 Validace

Validace je proces, při kterém se určuje vhodnost použití daného analytického systému za účelem získu relevantních dat. Při validaci se posuzuje, zda jsou

parametry metody srovnatelné s požadavky na výsledky. Pro získání smysluplných výsledků je validace nezbytná. Je třeba vytvořit validační plán, který musí být v souladu s analytickými požadavky (Milde 2014). Mimo jiné patří mezi validační parametry LOD a LOQ. Ty jsou popsány v následující podkapitole.

Pro ověření platnosti Aflatoxin Quicktestu™ byly provedeny dvě samostatné studie. V první studii byly hodnoceny vzorky arašídů a kukuřice od australských pěstitelů v Queenslandu, shromážděné během roku 2015 a 2016, infikované druhem *A. flavus*. Druhá studie zahrnovala arašídů a kukuřici z trhů z Východního Timoru, sbírané v letech 2014 a 2015. V obou studiích byly analyzovány extrakty surových vzorků pomocí Aflatoxin Quicktestu™ a standardními metodami analytických laboratoří, a to metodou HPLC s fluorescenčním detektorem nebo metodou LC-MS. Výsledky byly následně porovnány.

Úspěšně ohodnocená studie prokázala přesnost měření Aflatoxin Quicktestu™, metody, která poskytuje srovnatelné výsledky s výsledky získanými standardními analytickými metodami.

5.4.1 LOD a LOQ

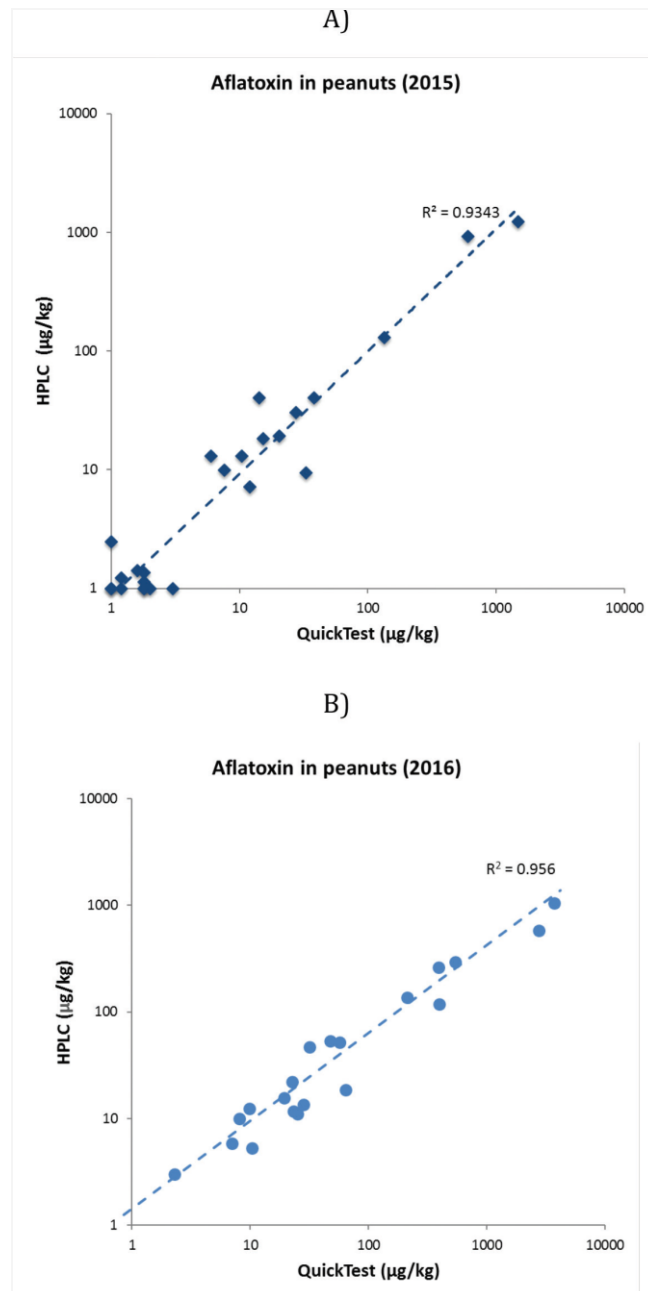
Mez detekce - LOD (z angl. **L**imit of **D**etection) a mez stanovitelnosti – LOQ (z angl. **L**imit of **Q**uantification) spolu úzce souvisí (Douša 2016). LOD, LOQ, dále kalibrace (vztah mezi hodnotami udávanými měřícím systémem a hodnotami odpovídajícími obsahu analytu ve vzorku), citlivost (velikost nárůstu závisle proměnné vyvolaná nárůstem koncentrace analytu), linearita (vlastnost metody poskytnout výsledek zkoušky v určitém rozsahu přímo úměrné koncentraci), přesnost (těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou), preciznost (těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky získanými za definovaných podmínek), selektivita (stupeň nezávislosti na interferencích) a další se řadí mezi tzv. validační parametry (Vrana 2015). LOD odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu (Douša 2016). Je to nejmenší koncentrace analytu, která ještě vyvolá odezvu měřícího systému rozpoznatelnou od ostatních vlivů. Zjednodušeně lze prohlásit, že je látka přítomna (Kocourek 2018). LOQ odpovídá koncentraci, při které přesnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení (Douša 2016), neboli nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit a pro kterou byla metoda validována. Zpravidla odpovídá nejnižšímu bodu kalibrační křivky.

LOD a LOQ se doporučují vyjadřovat jako koncentraci analytu v původním vzorku, zejména pokud existují rušivé vlivy matrice na daných hladinách koncentrace (Kocourek 2018).

5.4.2 Validace – Austrálie

První validační studie byla provedena v červnu roku 2015 s použitím arašídů nasbíraných společností Peanut Company of Australia. V grafu A je krásně vidět

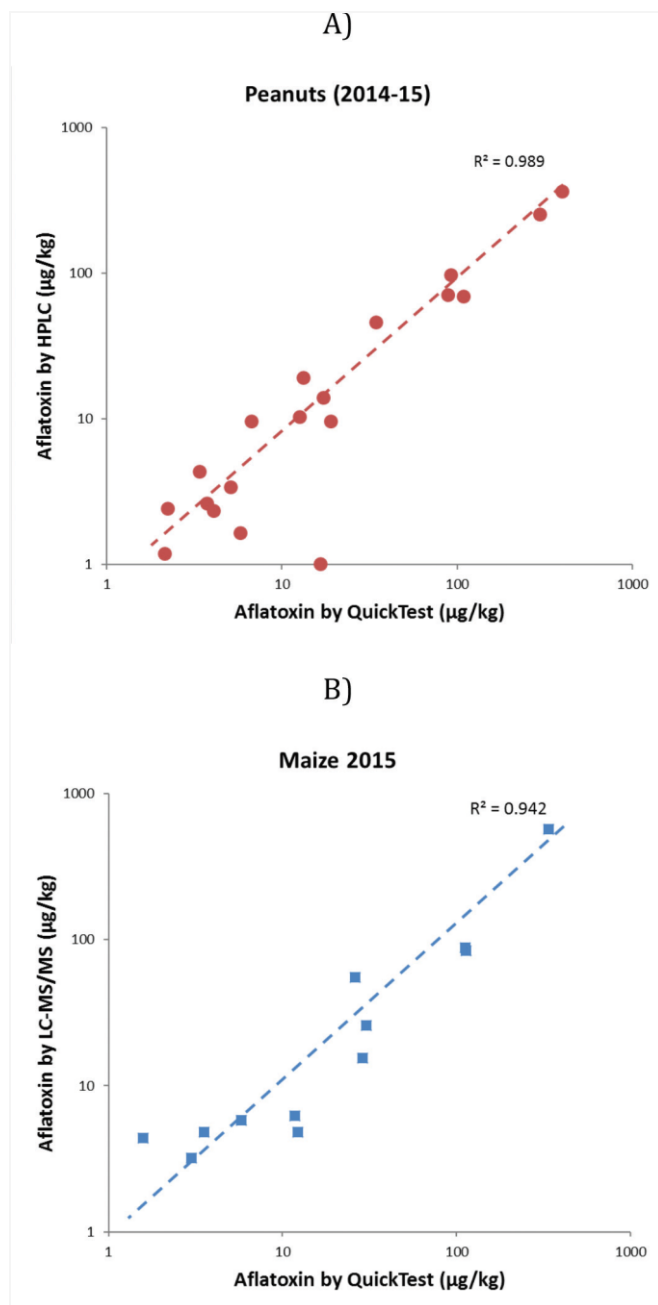
korelace mezi analýzou metodou HPLC a Aflatoxin Quicktest™. Stejná studia byla provedena v říjnu následujícího roku s větším množstvím vzorků arašídů. Stejně jako předešlý rok je z grafu B vidět souvislost mezi oběma metodami (Sánchez-Bayo 2017).



Graf č. 1 (A, B) – Validace přístroje Aflatoxin Quicktest™ s použitím vzorků arašídů shromážděných firmou Peanut Company v Austrálii v roce 2015 (A) a 2016 (B) (Sánchez-Bayo 2017)

5.4.3 Validace – Východní Timor

V letech 2014 a 2015 bylo z většího množství vzorků plodin vybráno 33 vzorků arašídů a 30 vzorků kukuřice pro validační studii. Stejně jako v první studii můžeme v grafu č. 2 vidět souhru výsledků metod HPLC a Aflatoxin Quicktest™ (Sánchez-Bayo 2017).



Graf č. 2 (A, B) – Validace přístroje Aflatoxin Quicktest™ s použitím vzorků arašídů (A) a kukuřice (B) z trhů ve Východním Timoru (Sánchez-Bayo 2017)

6 Praktická část

6.1 Bezpečnost práce

Všeobecně při práci s materiály kontaminovanými mykotoxiny je důležité dbát na bezpečnost pracovníků. Ti jsou povinni:

- používat ochranné pomůcky (plášť, rukavice, roušky atd.)
- provádět veškeré manipulace v digestořích či laminárních boxech se zapnutým odsáváním
- ukládat odpad dle provozního řádu a použité sklo ukládat do nádob s dekontaminačním roztokem
- udržovat pořádek a čistotu na pracovišti (Malíř, Ostrý et al. 2003)

6.2 Metodika

6.2.1 Odběr vzorků

Celkově bylo pro studii aflatoxinů metodou Aflatoxin Quicktest™ k dispozici 87 vzorků plodin, konkrétně 4 vzorky arašídů, 35 vzorků čiroku, 39 vzorků kukuřice a 9 vzorků pšenice. Z Východního Timoru nám bylo dodáno 30 vzorků kukuřice. Z australského Queenslandu jsme měli k dispozici 4 vzorky arašídů z okolí města Kingaroy a 9 vzorků čiroku z Norwinu. Z města Tamworth, kde jsme navštívili tamní institut - Tamworth Agricultural Institute, a z okolí města - Gurley, Breeza, Mallowa, jsme si dovezli 9 vzorků kukuřice a 23 vzorků čiroku. Z institutu International Grains Research Centre v Narrabri, který je spolu s příjezdovou cestou zobrazen v obr. č. 17. a 18., jsme si pro výzkum přivezli 3 vzorky čiroku a 9 vzorků pšenice. Tamworth a Narrabri leží v australském Novém Jižním Walesu. Výzkum byl prováděn v budově biomedicíny Univerzity v Sydney v Austrálii.

6.2.2 Materiál

Typ materiálu	Konkrétní příklady
Biologický	vzorky vybraných plodin (kukuřice, arašídů, čirok a pšenice)
Chemický	80% metanol, 20% NaCl, fosfátový pufr (PBS, 50mM, pH 7,4)
Ostatní	mixér, váha, pásové kazety Quicktest, Quicktest Reader, ochranné brýle, odměrný válec, vialky, misky, zkumavky Eppendorf, pipeta, trychtýř, filtrační papír, lžice

Tabulka č. 13 - Materiál potřebný pro studii aflatoxinů metodou Aflatoxin Quicktest™

Před započítím práce bylo potřeba, kromě biologického materiálu, připravit také chemické roztoky a ostatní materiál. V tabulce č. 13 je toto vybavení uvedeno a v následující tabulce (č. 14) jsou popsány druhy a množství chemikálií potřebných k přípravě fosfátového pufru.

Sumární vzorec sloučeniny	Hustota (g/l)	Molární hmotnost (M)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	13,76	358,14
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,76	156,01
NaCl	9,00	58,44

Tabulka č. 14 - Příprava fosfátového pufru (PBS, 50 mM, pH 7,4)

6.2.3 Postup

Extrakce

1. Na laboratorní váze bylo naváženo 15 g vzorku (arašídů, kukuřice, čirok, pšenice) a následně vloženo do mixéru.
2. Ke vzorku bylo přidáno se 24 ml 80% metanolu a 6 ml 20% NaCl. Tyto 3 suroviny byly společně mixovány po dobu 3 minut.
3. Vzniklá směs byla filtrována přes filtrační papír do vialky pro získání 4 ml supernatantu.
4. Pomocí pipety bylo vloženo 100 μl vzniklého supernatantu a 900 μl PBS do zkumavky Eppendorf a důkladně zamícháno.

Pozn.: Takto připravený extrakt byl 10x zředěn, aby se zabránilo interferenci rozpouštědla metanolu s protilátkami v quicktestu. To odpovídá zředění 1:20 ve vzorku. Citlivost této metody se pohybuje v rozmezí od 2 do 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pokud je výsledek vyšší, je potřeba vzorek následně 10x zředit. V případě hodnoty pod 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se jedná o čistý vzorek, protože je pod pracovním rozsahem.

Analýza extraktu

Analýza vzniklého extraktu použitím přístroje Aflatoxin Quicktest™ (QT)

1. Byly popsány jednotlivé QT kazety názvem a číslem zkoumaného vzorku.
2. Použitím kapátka, které je součástí každého balení kazety QT, byly vloženy 2 kapky zředěného vzorku do okénka na kazetě.
3. Test působil 15 minut pro úplné rozložení vzorku po linii kazety.
4. Nejdéle do 30 minut byla vložena kazeta se zkoumaným vzorkem do čtečky Quicktestu a byl přečten výsledek.

5. Pokud byl výsledek koncentrace aflatoxinů vyšší než 40 µg/kg, bylo znovu provedeno ředění vzorku.

Pozn.: Pokud se na pásce objeví 2 linky (C a T), vzorek je čistý. Pokud se linka T neobjeví, vzorek je pozitivní na aflatoxiny.

7 Výsledky výzkumu

V následujících několika tabulkách jsou uvedeny koncentrace aflatoxinů v µg/kg u jednotlivých plodin zvlášť. Uvedené je také místo původního výskytu vzorku před jeho odebráním a typ odrůdy. U každé plodiny je dále spočítán rozsah, průměr, medián, směrodatná odchylka a 95% percentil.

Číslo vzorku	Arašídý - odrůda	Lokalita	Koncentrace aflatoxinů (µg/kg)
3.	-	Kingaroy, Queensland	384,8
4.	-	Kingaroy, Queensland	54,1
2.	-	Kingaroy, Queensland	30,7
1.	-	Kingaroy, Queensland	6,3

Tabulka č. 15a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích arašídů metodou Aflatoxin Quicktest™ (řazeno sestupně dle koncentrace)

výskyt aflatoxinů n/n ^a (%)	rozsah min/max (µg/kg)	průměr ^b (µg/kg)	medián ^b (µg/kg)	směrodatná odchylka (µg/kg)	95% percentil (µg/kg)
4/4 (100,0)	6,3/384,8	119,0	42,4	178,3	335,2

^a) počet pozitivních vzorků při kontaminaci ≥ 1 µg/kg

^b) < 1 µg/kg = ½ LOQ

Tabulka č. 15b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích arašídů

Číslo vzorku	Čirok - odrůda	Lokalita	Koncentrace aflatoxinů (μg/kg)
1.	HGSII4	Tamworth	138,3
9.	MR Apollo	Tamworth	85,1
8.	Gracka	Tamworth	38,5
2.	Tiger	Tamworth	32,5
15.	G44	Breeza	27,3
16.	Gracka	Breeza	14,1
4.	2015	Narrabri	13,2
11.	HGSII4	Mallawa	11,8
5.	MR Buster	Mallawa	11,8
8.	Taurus	Narrabri	10,9
30.	G33	Tamworth	9,5
7.	G44	Tamworth	8,9
3.	HGSIO2	Tamworth	8,3
4.	MR Buster	Tamworth	8,1
4.	Dom	Norwin	7,9
10.	G22 malted	Norwin	7,4
7.	G22	Norwin	7,1
13.	Tiger	Mallawa	6,7
10.	G33	Mallawa	6,9
2.	Bus	Norwin	6,9
14.	G44	Mallawa	6,7
9.	MR43 malted	Norwin	6,7
21.	G33	Breeza	6,3
18.	MR Apollo	Breeza	6,0
1.	Dom malted	Norwin	5,9
3.	2015	Narrabri	5,8
22.	Tiger	Breeza	5,0
5.	Baz malted	Norwin	4,9
3.	Baz	Norwin	<LOQ
6.	Bus malted	Norwin	<LOQ
6.	HGSIO2	Mallawa	<LOQ
12.	Gracka	Mallawa	<LOQ
17.	HG85102	Breeza	<LOQ
19.	MR Buster	Breeza	<LOQ
20.	HGSII4	Breeza	<LOQ

Tabulka č. 16a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích čiroku metodou Aflatoxin Quicktest™ (řazeno sestupně dle koncentrace)

výskyt aflatoxinů n/n ^a (%)	rozsah min/max (μg/kg)	průměr ^b (μg/kg)	medián ^b (μg/kg)	směrodatná odchylka (μg/kg)	95% percentil (μg/kg)
35/28 (80,0)	4,9/138,3	14,6	6,9	26,5	52,5

a) počet pozitivních vzorků při kontaminaci $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$

b) $< 1 \mu\text{g}/\text{kg} = \frac{1}{2} \text{LOQ}$

Tabulka č. 16b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích čiroku

Číslo vzorku	Kukuřice - odrůda	Lokalita	Koncentrace aflatoxinů (μg/kg)
20.	-	East Timor	311,1
27.	-	East Timor	122,4
3.	-	East Timor	99,6
4.	-	East Timor	90,2
6.	-	East Timor	89,0
32.	1756	Breeza	84,7
26.	-	East Timor	43,6
24.	1756	Mallawa	39,0
31.	1756	Gurley	34,9
26.	606IT	Gurley	34,5
30.	-	East Timor	31,4
28.	1467	Mallawa	18,3
15.	-	East Timor	16,2
25.	-	East Timor	15,4
23.	606IT	Mallawa	13,1
29.	606IT	Breeza	12,2
1.	-	East Timor	11,9
8.	-	East Timor	11,5
9.	-	East Timor	10,4
28.	-	East Timor	10,3
27.	1467	Breeza	10,3
25.	1467	Gurley	8,1
11.	-	East Timor	8,0
5.	-	East Timor	7,6
2.	-	East Timor	6,8
17.	-	East Timor	5,7
12.	-	East Timor	3,3
7.	-	East Timor	<LOQ

10.	-	East Timor	<LOQ
13.	-	East Timor	<LOQ
14.	-	East Timor	<LOQ
16.	-	East Timor	<LOQ
18.	-	East Timor	<LOQ
19.	-	East Timor	<LOQ
21.	-	East Timor	<LOQ
22.	-	East Timor	<LOQ
23.	-	East Timor	<LOQ
24.	-	East Timor	<LOQ
29.	-	East Timor	<LOQ

Tabulka č. 17a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích kukuřice metodou Aflatoxin Quicktest™ (řazeno sestupně dle koncentrace)

výskyt aflatoxinů n/n ^a (%)	rozsah min/max (µg/kg)	průměr ^b (µg/kg)	medián ^b (µg/kg)	směrodatná odchylka (µg/kg)	95% percentil (µg/kg)
39/27 (69,2)	3,3/311,1	29,6	10,3	56,1	101,9

^a) počet pozitivních vzorků při kontaminaci $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$

^b) $< 1 \mu\text{g}/\text{kg} = \frac{1}{2} \text{LOQ}$

Tabulka č. 17b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích kukuřice

Číslo vzorku	Pšenice - Odrůda	Lokalita	Koncentrace aflatoxinů (µg/kg)
5.	HYPERNO DURUM 2016	Narrabri	26,8
6.	SUNLIN	Narrabri	13,9
10.	SUNCO 2015	Narrabri	13,4
11.	SUNCO 2015	Narrabri	12,0
8.	-	Narrabri	9,8
9.	JANZ 2015	Narrabri	8,7
1.	-	Narrabri	<LOQ
2.	SUN MAX	Narrabri	<LOQ
7.	SILO	Narrabri	<LOQ

Tabulka č. 18a - Výsledky měření množství aflatoxinů ve vzorcích pšenice metodou Aflatoxin Quicktest™ (řazeno sestupně dle koncentrace)

výskyt aflatoxinů n/n ^a (%)	rozsah min/max (μg/kg)	průměr ^b (μg/kg)	medián ^b (μg/kg)	směrodatná odchylka (μg/kg)	95% percentil (μg/kg)
9/6 (66,6)	8,7/26,8	9,6	9,8	8,5	21,6

a) počet pozitivních vzorků při kontaminaci $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$

b) $< 1 \mu\text{g}/\text{kg} = \frac{1}{2} \text{LOQ}$

Tabulka č. 18b - Výskyt aflatoxinů ve vzorcích pšenice

Souhrn těchto informací a výsledků je uveden v následujících dvou tabulkách (č. 15 a č. 16):

Typ plodiny	Počet vzorků s hodnotou aflatoxinů $> 1 \mu\text{g}/\text{l}$	Počet vzorků s hodnotou $< \text{LOQ}$	Procentuální vyjádření vzorků s hodnotou aflatoxinů $> 1 \mu\text{g}/\text{l}$ (%)
Arašídý	4	0	100,0
Čirok	28	7	80,0
Kukuřice	27	12	69,2
Pšenice	6	3	50,0

Tabulka č. 19 - Procentuální vyjádření množství aflatoxinů dle typu plodiny

Lokalita	Počet vzorků s hodnotou aflatoxinů $> 1 \mu\text{g}/\text{l}$	Počet vzorků s hodnotou $< \text{LOQ}$	Procentuální vyjádření vzorků s hodnotou aflatoxinů $> 1 \mu\text{g}/\text{l}$ (%)	
Východní Timor	18	12	60,0	
Nový Jižní Wales	Narrabri	9	3	75,0
	Tamworth	27	5	84,4
Queensland	Norwin	7	2	77,7
	Kingaroy	4	0	100,0

Tabulka č. 20 - Procentuální vyjádření množství aflatoxinů dle místa výskytu
vzorků

8 Diskuze

Cílem mého výzkumu bylo stanovit rozsah kontaminace aflatoxinů v různých typech vzorků, konkrétně v arašidech, čiroku, kukuřici a pšenici, z různých lokalit oblastí Nový Jižní Wales a Queensland v Austrálii a z Východního Timoru.

Všechny dostupné vzorky arašídů z oblasti Kingaroy v Queenslandu byly pozitivní. Nejvyšší naměřená hodnota byla 384,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nejnižší pak 6,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pouze nejnižší hodnota je přijatelná pro trh a obchod.

Dalším typem vzorku byla kukuřice. Z celkového počtu 30 vzorků pocházejících z Východního Timoru byly aflatoxiny nalezeny v 66,6 %. Zbýlé vzorky dosahovaly z tohoto hlediska hodnoty menší než LOQ. Nejnižší naměřenou hodnotu obsahoval vzorek kukuřice o koncentraci 3,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a nejvyšší pak s koncentrací 311,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Z oblasti Norwin v australském Queenslandu bylo analyzováno 9 vzorků čiroku. Pouze přibližně 20 % vzorků dosahovalo hodnot nižších než LOQ a přibližně 80 % vzorků obsahovalo vyšší hodnoty aflatoxinů. Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 4,9 do 7,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tudíž všechny mohou být podávány v krmivu zvířatům.

Další zkoumané vzorky byly získány z okolí měst Narrabri a Tamworth v australském Novém Jižním Walesu. Jednalo se o 12 vzorků z Narrabri (3 vzorky čiroku, 9 vzorků pšenice) a 32 vzorků získaných z různých farem v okolí města Tamworth (23 vzorků čiroku, 9 vzorků kukuřice).

Vzorky z oblasti Narrabri byly z 88 % pozitivní na aflatoxiny. Naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 5,8 do 26,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Všechny 3 vzorky čiroku obsahovaly aflatoxiny a pouze 3 vzorky pšenice vykazovaly množství aflatoxinů pod hodnotu LOQ. Vzhledem k tomu, že je pšenice infikována aflatoxiny zcela výjimečně, došlo k její kontaminaci aflatoxiny pravděpodobně při jejím skladování, např. prostřednictvím prachu.

Ve vzorcích pocházejících z oblastí okolí města Tamworth (Mallawa, Breeza, Gurley) byly nalezeny aflatoxiny u více než 80 % z nich. Rozsah kontaminace byl od 5,0 do 138,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Z celkového počtu 27 pozitivních vzorků (5 vzorků vyšlo pod hodnotu LOQ) byly 2/3 vzorky čiroku a 1/3 vzorky kukuřice. Nejvyšší naměřená hodnota aflatoxinů byla u čiroku z oblasti Tamworth (odrůda HGSII4), nejnižší také u čiroku, ale pocházejícího z oblasti Breeza. Nejvyšší naměřená hodnota byla u odrůdy 1756 a nejnižší u odrůdy 1467.

Dle dostupných výsledků (tabulka č. 19) lze konstatovat, že nejvyšší množství aflatoxinů se vyskytuje u arašídů, avšak je zde velký nepoměr počtu zkoumaných vzorků oproti ostatním plodinám a tudíž nelze z těchto výsledků dělat dostačující závěry. Následuje čirok, který bývá aflatoxiny také poměrně často infikován, ale ne v takovém množství, tudíž nepředstavuje nebezpečí pro hospodářská zvířata ani lidi, poté kukuřice a nejmenší množství aflatoxinů bylo detekováno u pšenice. V porovnání čiroku a kukuřice bylo nalezeno více pozitivních vzorků právě u

čiroku, ale v celkovém zhodnocení se jednalo o nižší koncentrace, než tomu bylo u vzorků kukuřice.

Při pohledu na výskyt aflatoxinů podle oblastí odběrů vzorků (dle tabulky č. 20) byly tyto toxické látky zjištěny ve všech vzorcích všech oblastí v následujícím pořadí: nejvíce v oblasti Kingaroy v Queenslandu, dále ve městě Tamworth v Novém Jižním Walesu, v queenslandském Norwinu, ve městě Narrabri v Novém Jižním Walesu a nakonec ve východním Timoru. Vysvětlením může být snížené množství srážek v období sklizně v australských oblastech, kdy jsou plodiny vystaveny stresu ze sucha. Důvodem kontaminace všech plodin může být nevhodné skladování nebo znečištění půdy.

Maximální limity koncentrací aflatoxinů v různých potravinových a krmných surovinách se liší podle platných legislativních podmínek téměř v každé zemi. V EU, jejíž součástí je také Česká republika, a v Austrálii jsou limity pro aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂ u arašídů a jiných ořechů určených k dalším úpravám před přímou spotřebou stejné, tj. 15 µg/kg. Rozdílné jsou maximální limity u přímé spotřeby ořechů, v EU to jsou 4 µg/kg u arašídů a v Austrálii 10 µg/kg u pistácií, mandlí a lískových ořechů. Z hodnot hygienických limitů aflatoxinů v EU a Austrálii, uvedených v tabulkách č. 8 a 9, lze vyčíst, že se v EU zaměřují na více plodin, u kterých jsou dány maximální hodnoty aflatoxinů v potravinách. Mimo arašídů se předpisy týkají také obilovin, kukuřice, rýže, mléka a mléčných produktů. V Austrálii se zaměřují pouze na maximální limity arašídů a dalších ořechů, převážně na ty, které rostou na stromech.

V ostatních vybraných zemích světa, jejichž maximální hygienické limity v potravinách a krmivech jsou uvedeny v tabulce č. 12, jsou tyto limity poměrně často podobné. Většinou se pohybují v rozmezí od 5 do 20 µg/kg. Co se týče výskytu všech aflatoxinů (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), mají nejpřísnější předpisy z vybraných zemí např. v Jihoafrické republice, ve Vietnamu, v Japonsku, v Brazílii a v EU. Ve většině zemí se soustředí na výskyt zmiňovaných aflatoxinů jako na celek více, než na samotný AFB₁. AFB₁ je limitován pouze v EU, Číně, Indonésii a Korejské republice (jistě i v dalších zemích světa; Zde jsou vybrané země, na jejichž hygienické limity je zaměřena tato práce). Pokud existuje v zemi předpis pro limitování AFM₁ v mléce, mléčných výrobcích, nebo o obojím dohromady, obvykle je stanovena hodnota 0,5 µg/kg. Pouze v EU je stanovena přísnější hodnota, konkrétně 10x nižší.

Nízké koncentrace aflatoxinů, např. 1 ng.kg⁻¹ t. hm. den⁻¹ (nebo ještě dokonce nižší) mohou být příčinou vzniku nádorů jater. Pouze nulová expozice těmto aflatoxinům zaručuje nulové riziko vzniku těchto nádorů (Malíř, Ostrý et al. 2003). Z tohoto pohledu nálezy AFB₁ v surovinách a potravinách v Austrálii představují možné zdravotní riziko pro tamější populaci. Nicméně dodržování zdravého životního stylu, v nejlepším případě spojeného s aktivním pohybem, příjmem diverzifikované stravy, vitamínů v ovoci a zelenině, které vykazují protektivní účinky, přispívá k detoxikaci a k ochraně zdraví. Samozřejmě vždy záleží na individuální vnímavosti.

9 Závěr

Tato práce by měla být přínosem pro všechny, kteří se zajímají o své zdraví, jelikož poukazuje na nebezpečnost aflatoxinů - toxických, karcinogenních látek, které představují vážný zdravotní problém pro člověka i zvířata, a které dostáváme do těla nejen požitím kontaminovaného jídla, ale také inhalací nebo transdermálně, ovšem v minoritní formě.

Frekvence a úroveň přítomnosti mykotoxinů v potravinovém řetězci vzrostla v posledních desetiletích zřejmě kvůli změně globálních klimatických podmínek, globalizaci trhu a celosvětovému rozvoji VMH. Vývoj nových citlivějších a specifitějších analytických metod pro hodnocení přítomnosti aflatoxinů zajišťuje řízení rizika kontaminace těmito látkami a tím zaručuje bezpečné a nekontaminované potraviny. Není však možné úplně vyloučit kontaminaci aflatoxinů v potravinovém řetězci, protože biosyntéza všech mykotoxinů není pod plnou kontrolou lidí z důvodu mnoha různých biologických, biochemických a genetických důvodů (Santini a Ritieni 2013).

Výhodami nové technologie měření aflatoxinů metodou Aflatoxin Quicktest™ jsou snadné použití, rychlé vyhodnocení, jednoduché čtení výsledků a nízké náklady (Almeida 2016). Tuto metodu je možné provádět přímo na farmách a v různých agronomických zařízeních. To také umožní státním regulačním orgánům sledovat, kontrolovat a minimalizovat problém bezpečnosti potravin (Yessy 2015).

Spotřebitelé mají dnes na základě dostupných informací poměrně rozsáhlé znalosti o geneticky modifikovaných mikroorganismech, aktivních zásadách fytofarmaceutického původu nebo například o kontaminaci těžkých kovů. To jsou hlavní problémy pro většinu populace. Avšak riziko spojené s výskytem mykotoxinů v potravinách je velmi zanedbáváno a podceňováno (Santini a Ritieni 2013).

Důležitou částí práce je preventivní opatření, které je nutné dodržovat, pokud se chceme těmito škodlivým látkám vyhnout, nebo alespoň minimalizovat jejich výskyt a expozici. Jak lze z práce vyčíst, aflatoxiny infikují převážně ty samé plodiny - nejvíce arašídy, dále obiloviny, olejniny, nalézají se také v kořeni, mléce apod. Pro všechny tyto komodity jsou stanoveny maximální hygienické limity pro trh a obchod téměř v každé zemi ve světě (hlavně ve vyspělých zemích, méně v rozvojových zemích).

Navzdory řadě všech možných opatření zůstává kontaminace aflatoxiny globálním problémem, kterému se nelze zcela vyhnout (Food Standards Australia New Zealand 2016).

10 Použitá literatura

1. *Aflatoxin QuickTest™ Workshop*. Dili - East Timor: Seeds of Life (SOL), Quicktest technologies, 23.-27.11.2015.
2. AFZAL, M., CHEEMA, R.A. a CHAUDHARY, R.A. Incidence of aflatoxins and aflatoxin producing fungi in animal feedstuffs. *Mycopathologia*. Kluwer Academic Publishers, 1979, **69**(3), 149-151. ISSN 1573-0832.
3. AKBARSHA, Mohammad A., KUNNATHODI, Faisal a ALSHATWI, Ali A. A comprehensive review of male reproductive toxic effects of aflatoxin. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, Ramón Gerardo. *Aflatoxins – biochemistry and molecular biology*. Croatia: InTech, 2011, 177-202. ISBN 978-953-307-395-8.
4. ALMEIDA, Luis de, SÁNCHEZ-BAYO, Francisco, WRIGHT, Graeme C. a KENNEDY, Ivan R. Validation of rapid „Quicktest“ for aflatoxins in peanuts and maize in Timor-Leste. *Seeds of Life Conference* [poster]. 12.–15. April 2016, Dili (Timor-Leste).
5. ANFOSSI, Laura, BAGGIANI, Claudio, GIOVANNOLI, Cristina, D'ARCO, Gilda a GIRAUDI, Gianfranco. Lateral-flow immunoassay for mycotoxins and phycotoxins: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Springer, leden 2013a, **405**(2-3), 467-480. ISSN 1618-2642.
6. ANFOSSI, Laura, BAGGIANI, Claudio, GIOVANNOLI, Cristina a GIRAUDI, Gianfranco. Lateral flow immunoassays for Aflatoxin B and G and for Aflatoxin M₁. In: RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi. *Aflatoxins – recent advances and future prospects*. IntechOpen, 2013b, 315-339. ISBN 978-953-51-0904-4.
7. ANFOSSI, Laura, D'ARCO, Gilda, CALDERARA, Marianna, BAGGIANI, Claudio, GIOVANNOLI, Cristina a GIRAUDI, Gianfranco. Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxin in maize. *Food additives and Contaminants*. Únor 2011, **28**(2), 226-234. ISSN 1944-0049.
8. AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD STANDARDS CODE. Standard 1.4.1. *Contaminants and natural toxicants*. Australian Government. federal Register of Legislation, 2011. Dostupné z:
<https://www.legislation.gov.au/Details/F2011C00121>
9. Austrálie - stát. Informace o státu. In: *zemepis24.cz* [online]. © Zeměpis 24 [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: <https://www.zemepis24.cz/staty/australie>
10. Austrálie. Základní informace. In: *svetadily.cz* [online]. © svetadily.cz [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: <http://australie.svetadily.cz/info/>
11. BLESÁ, Jesus Jarque, SORIANO, Jose M., MOLTÓ, Juan Carlos a MANES, Jordi. Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local markets and supermarkets in Valencia, Spain. *Food additives and Contaminants*. 2004, **21**(2), 165-171. ISSN 0265-203X.
12. CAC (Codex Alimentarius Commission). *Proposed draft maximum levels for total aflatoxins and ochratoxin A in nutmeg, chilli and paprika, ginger, pepper and*

- turmeric and associated sampling plans*. 12. zasedání. Netherlands: Codex Alimentarius Commission.
13. CARDOSO, Luisa a SANTOS, Inacia. Establishment of appropriate infrastructure to enable safe local sourcing of maize and soy. In: *marketdevelopmentfacility.org* [online]. Červenec 2014 [cit. 10.4.2018]. Dostupné z: <http://marketdevelopmentfacility.org/content/partnerships/timor-leste/agri-business-processing-and-rural-distribution/timor-global/>
 14. CIBULKA, Radim, 2010. *Triticum aestivum* L. – pšenice setá/pšenice letná. In: *botany.cz* [online]. 31.12. [cit. 19.4.2018]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/triticum-aestivum/>
 15. COGLIANO, Vincent James, BAAN, Robert, STRAIF, Kurt, GROSSE, Yann, LAUBY-SECRETAN, Béatrice, GHISSASSI, Fatiha El, BOUVARD, Véronique, BENBRAHIM-TALLAA, Lamia, GUHA, neela, FREEMAN, Crystal, GALICHET, Laurent a WILD, Christopher P. Preventable Exposures Associated With Human Cancers. *Journal of the national Cancer Institute* [online]. Oxford University Press, 2011, **103**, 1827-1839. Dostupné z: DOI: 10.1093/jnci/djr483
 16. CONTRERAS-MEDINA, Luis Miguel, ESPINOSA-CALDERON, Alejandro, DUARTE-GALVAN, Carlos, FERNANDEZ-JARAMILLO, Arturo Alfonso, MUÑOZ-HUERTA, Rafael Francisco, MILLAN-ALMARAZ, Jesus Roberto, GUEVARA-GONZALEZ, Ramon Gerardo a TORRES-PACHECO, Irineo. Characteristics of mycotoxin Analysis Tool for tomorrow. In: RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi. *Aflatoxins – recent advances and future prospects*. IntechOpen, 2013, 289-313. ISBN 978-953-51-0904-4.
 17. DHANASEKARAN, D., SHANMUGAPRIYA, S., THAJUDDIN, N a PANNEERSELVAM, A. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, Ramón Gerardo. *Aflatoxins – biochemistry and molecular biology*. Croatia: InTech, 2011, 221-254. ISBN 978-953-307-395-8.
 18. DOUŠA, Michal. Mez detekce a mez stanovitelnosti. In: *hplc.cz* [online]. 22.1.2009 [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/tip/lod_loq.htm
 19. ENTOX [National Research Center for Enviromental Toxicology], UNIVERSITY OF QUEENSLAND, UNIVERSITY OF SYDNEY, QUEENSLAND DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES & FISHERIES, NSW DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES a THE GRAINS RESEARCH & DEVELOPMENT CORPORATION. *Mycotoxins in Australian maize production: how to reduce the risk*. In: *maizeaustralia.com.au*[online]. ©2016 Maize Association of Australia. 2016 [cit. 6.4.2018]. Dostupné z: http://www.maizeaustralia.com.au/mycotoxin_files/Revised%20mycotoxin%20HACCP%20guide.pdf
 20. FDA (U.S. Food and Drug Administration), 1980. *CPG Sec. 555.400 Foods - Adulteration with Aflatoxin* [online]. 1.10.1980. Poslední změna 20.3.2015 [cit. 26.3.2018]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/iceci/compliancemanuals/compliancepolicyguidancemanual/ucm074555.htm>

21. FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND, 2016. *Imported food risk statement Peanuts/pistachios and aflatoxins* [online]. Červen 2016 [cit. 27.3.2018]. Dostupné z:
http://www.foodstandards.gov.au/consumer/importedfoods/Documents/Peanut_pistachio_and_aflatoxins.docx
22. GAIN (Global Agricultural Information Network) CH14057. *China's Maximum Levels for Mycotoxins in Foods*. Beijing: USDA Foreign Agricultural Service, 2014.
23. GRÉGROVÁ, Renata. *Mykotoxiny produkované plísněmi v potravinách*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Ústav biochemie a analýzy potravin. Vedoucí práce Ivan Holko.
24. HARDY, Anthony, BENFORD, Diane, HALLDORSSON, Thorhallur, JEGER, Michael John, KNUTSEN, Katrine Helle, MORE, Simon, MORTENSEN, Alicja, NAEGELI, Hanspeter, NOTEBORN, Hubert, OCKLEFORD, Colin, RICCI, Antonia, RYCHEN, Guido, SILANO, Vittorio, SOLECKI, Roland, TURCK, Dominique, AERTS, Marc, BODIN, Laurent, DAVIS, Allen, EDLER, Lutz, GUNDERT-REMY, Ursula, SAND, Salomon, SLOB, Wout, BOTTEX, Bernard, ABRAHANTES, Jose Cortiñas, MARQUES, Daniele Court, KASS, George a SCHLATTER, Jodof R. Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *European food safety authority*. 2016, **15**(1), 1-41. ISSN 1831-4732.
25. HOSKOVEC, Ladislav, 2008. *Zea mays L. – kukuřice setá/kukurica siata*. In: *botany.cz* [online]. 13.9. [cit. 19.4.2018]. Dostupné z:
<https://botany.cz/cs/zea-mays/>
26. CHAUHAN, Y.S., WRIGHT, G.C., RACHAPUTI, R.C.N., HOLZWORTH, D., BROOME, A., KROSCHEK, S a ROBERTSON, M.J. Application of a model to assess aflatoxin risks in peanuts. *Journal of Agricultural Science*. Australia: 2010, **148**(3), 341-351. ISSN 0021-8596.
27. IARC (International agency for Research on cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: World health organization International agency for research on cancer. *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Lyon: IARC, 1993, vol. 56, 245-395.
28. IARC (International agency for Research on cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: World health organization International agency for research on cancer. *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. Lyon: IARC, 2002, vol. 82, 171-300. ISSN 1017-1606.
29. IARC (International agency for Research on cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: World health organization International agency for research on cancer. *Chemical agents and related occupations*. Lyon: IARC, 2012, vol. 100F, 225-248.
30. JANOŠOVÁ, Jaroslava, 2002. *Výstřední kontinent. Země světa* [online]. Praha: č. 5 [cit. 6. 3. 2018]. Dostupné z:

<http://www.zemesveta.cz/archiv/rocnik-2002/priroda-australie-5-2002/157-3/vystredni-kontinent>

31. JEFREMOVÁ, Marie, OSTRÝ, Vladimír, MALÍŘ, František a RUPRICH, Jiří. Rapid diagnostic testing of toxigenic microfungi isolated of foodstuffs. *Acta veterinaria Brno*. 2016, **85**(2), 151-156. ISSN 0001-7213.
32. JEŘÁBKOVÁ, Lucie. *Toxinogenní plísňe a mykotoxiny v životním prostředí člověka*. Pardubice, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Katedra biologických a biochemických věd. Vedoucí práce Dana Hrubošová.
33. JESENSKÁ, Zdenka. *Micromycetes in foodstuffs and feedstuffs*. Elsevier, 1993. 256 s. Progress in industrial microbiology, vol. 28. ISBN 0-444-98684-7.
34. KADEROVÁ, Ilona. *Sledování obsahu mykotoxinů v rostlinném materiálu*. Brno, 2008. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Fakulta agronomická. Ústav technologie potravin. Vedoucí práce Vlastimil Dohnal.
35. KOCOUREK, Vladimír. Kvalita v laboratorní a kontrolní praxi. Část: Validace analytických metod; vhodnost pro daný účel [přednáška]. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2018. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~kocourev/files/QA_validace-print.pdf
36. KOTALOVÁ, Kateřina. *Aflatoxiny, možný vliv na lidské i zvířecí zdraví*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové. Přírodovědecká fakulta. Katedra biologie. Vedoucí práce Barbora Voxová.
37. KOVÁŘ, Ladislav, 2008. *Arachis hypogaea L. – podzemnice olejná*. In: *botany.cz* [online]. 30.9. [cit. 19.4.2018]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/arachis-hypogaea/>
38. LAWLEY, Richard, CURTIS, Laurie a DAVIS, Judy. *The Food Safety Hazard Guidebook*. 1. vydání. London: Royal Society of Chemistry, 2008. 432 s. ISBN 978-0-85404-460-3.
39. LEE, Nanju A., WANG, Shuo, ALLAN, Robin D., KENNEDY, Ivan R. A rapid aflatoxin B₁ ELISA: Development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**(10), 2746-2755.
40. LESLIE, John F., BANDYOPADHYAY, Ranajit a VISCONTI, Angelo. *Mycotoxins. Detection methods, management, public health and agricultural trade*. 2008. ISBN 978-1-84593-082-0.
41. LIZÁRRAGA-PAULÍN, Eva G., MORENO-MARTÍNEZ, Ernesto a MIRANDA-CASTRO, Susana P. Aflatoxins and their impact on human and animal health: An emerging problem. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, Ramón Gerardo. *Aflatoxins – biochemistry and molecular biology*. Croatia: InTech, 2011, 255-282. ISBN 978-953-307-395-8.
42. MALÍŘ, František. Mykotoxiny, toxicita, hodnocení dietární expozice, účinky na organismus [přednáška]. Praha a Brno: Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 4. a 5. listopadu 2010.

43. MALÍŘ, František a OSTRÝ, Vladimír. Aflatoxiny - toxické účinky u člověka. *Kontakt*. 2012, **14**(1), 85-93. ISSN 1212-4117.
44. MALÍŘ, František, OSTRÝ, Vladimír, BÁRTA, Ivo, BUCHTA, Vladimír, DVOŘÁČKOVÁ, Ivana, PAŘÍKOVÁ, Jelena, SEVERA, Jan a ŠKARKOVÁ, Jarmila. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2003. 349 s. ISBN 80-7013-395-3.
45. MALÍŘ, František, OSTRÝ, Vladimír, ČERNÁ, Milena, KAČEROVSKÝ, Jaroslav, ROUBAL, Tomáš, ŠKARKOVÁ, Jarmila, BRNDIAR, Miroslav a FIXA, Petr. Stav sledování významných biomarkerů mykotoxinů (Ochratoxinu A, aflatoxinu M1) u populace v České republice. *Časopis lékařů českých*. 2004, **143**(10), 691-696. ISSN 0008-7335.
46. MALÍŘ, František, OSTRÝ, Vladimír a NOVOTNÁ, Eva. Toxické účinky vybraných trichotecenových (epoxytrichotecenových) mykotoxinů u člověka. *Kontakt*. 2013, **15**(1), 89-99. ISSN 1212-4117.
47. MAZUMDER, Papiya Mitra a SASMAL, D. Mycotoxins – Limits and Regulations. *Ancient Science of Life* [online]. 2001, **20**, 1-9 [cit. 15.5.2018]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.270.5901&rep=rep1&type=pdf>
48. MILDE, David. Volba optimální metody. Jak nalézt z velkého množství metod nejlepší („fit for purpose“) postup? In: *ach.upol.cz* [online]. Olomouc: © Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci. 21.10.2014 [cit. 7.5.2018]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/04-volbametody-validace-2014-1413884795.pdf>
49. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Aflatoxiny v ořechách. In: *bezpecnostpotravin.cz* [online]. Ministerstvo zemědělství © 2012, 24.6.2004 [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/aflatoxiny-v-oresich.aspx>
50. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Mykotoxiny: nebezpečná hrozba. In: *bezpecnostpotravin.cz* [online]. Ministerstvo zemědělství © 2012, 1.11.2003 [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/mykotoxiny-celosvetova-hrozba.aspx>
51. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos* [online]. Brazilian Federative Republic: Diário oficial. Imprensa nacional, 18.3.2011 [cit. 15.4.2018]. Dostupné z: https://www.romerlabs.com/fileadmin/user_upload/romerlabs/Documents/PDF Files/ANVISA-RDC-7_180211.pdf
52. MOUDRÝ, Jan, 2006. Pšenice obecná (*Triticum aestivum* L.). In: *2.zfjcu.cz* [online]. 1.11. [cit. 19.4.2018]. Dostupné z: <http://www2.zfjcu.cz/~moudry/databaze/Psenice.htm>
53. MÜLLER, Jochen F., DUQUESNE, Sabine, NG, Jack, SHAW, Glen R., KRRISHNAMOHAN, K., MANONMANII, K., HODGE, Mary a EAGLESHAM, Geoff K.

- Pesticides in Sediments from Queensland Irrigation Channels and Drains. *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon, 2000, **41**(7-12), 294-301.
54. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 165/2010 ze dne 26. února 2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o aflatoxiny [online]. [cit. 3. 3. 2018]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0165&from=CS>
 55. NEDĚLNÍK, Jan. Aflatoxin a podobná sebranka. Nebezpečné mykotoxiny houbových mikroorganismů. *Vesmír*. 2014, **93**(9), 498-500. ISSN 0042-4544.
 56. NMI (National Measurement Institute). Aflatoxins in Food. In: *measurement.gov.au* [online]. Australian Government. Department of Industry, Innovation and Science. 1.7.2010 [cit. 15.4.2018]. Dostupné z: <http://www.measurement.gov.au/Pages/about.aspx>
 57. NSW GOVERNMENT. *Biosecurity Act 2015*. Stock Food Regulation [online]. Department of Primary Industries, 1.7.2017 [cit. 15.4.2018]. Dostupné z: https://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf_file/0011/723476/Stock-Foods-Regulation-factsheet.pdf
 58. OSTRÝ, Vladimír. *Desatero rad k ochraně zdraví před mykotoxiny (plísňovými jedy) a toxinogenními plísněmi*. 2. upr. vyd. Ilustrace Karel Helmich. Praha: Státní zdravotní ústav, 2000.
 59. OSTRÝ, Vladimír. *Vláknité mikroskopické houby (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-7071-102-7.
 60. OSTRÝ, Vladimír, MALÍŘ, František a PFOHL-LESZKOWICZ, Annie. Comparative data concerning aflatoxin contents in Bt maize and non-Bt isogenic maize in relation to human and animal health – a review. *Acta veterinaria Brno*. 2015, **84**(1), 47-53. ISSN 0001-7213.
 61. OSTRÝ, Vladimír, MALÍŘ, František, TOMAN, Jakub a GROSSE, Yann. Mycotoxins as human carcinogens – the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*. 2017, **33**, 65-73. ISSN 0178-7888.
 62. OSTRÝ, Vladimír a ŠKARKOVÁ, Jarmila. Metodické doporučení mikrobiologickému zkoušení potravin a pokrmů; Kultivační metoda průkazu aflatoxinogenních mikromycetů (plísní) *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* v potravinách a pokrmech. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2003, 1, 1-28. ISSN 0862-5956.
 63. PARK, D.L., NJAPAU, H. a BOUTRIF, E. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food, Nutrition and Agriculture*. 1999, **23**, 49-56.
 64. PERAICA, M., RADIĆ, B., LUCIĆ, A. a PAVLOVIĆ, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999, **77**(9), 754-766.
 65. PESTICIDE RESEARCH INSTITUTE. BMDL₁₀. In: *pesticideresearch.com* [online]. 29.8.2013 [cit. 22.4.2018]. Dostupné z: <https://www.pesticideresearch.com/site/pri-glossary/bmdl10/>

66. PITT, J.I. a HOCKING, Ailsa D. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*. Kluwer Academic Publishers, 2006, **162**(3), 233-243. ISSN 1573-0832.
67. PROBST Claudia, NJAPAU, Henry a COTTY, Peter J. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. *Applied and environmental biology*. 2007, **73**(8), 2762-2764. ISSN 0099-2240.
68. QUEENSLAND GOVERNMENT. Aflatoxin in peanuts. In: *daf.qld.gov.au* [online]. © The State of Queensland (Department of Agriculture and Fisheries) 2010-2018. 22.4.2015 [cit. 2.4.2018]. Dostupné z: <https://www.daf.qld.gov.au/business-priorities/plants/field-crops-and-pastures/broadacre-field-crops/peanuts/growing-peanuts/aflatoxin-in-peanuts>
69. QUEENSLAND GOVERNMENT. Aflatoxin poisoning and contaminant issues in production animals. In: *business.qld.gov.au* [online]. © The state of Queensland 1995-2018. 29.11.2017 [cit. 2.4.2018]. Dostupné z: <https://www.business.qld.gov.au/industries/farms-fishing-forestry/agriculture/land-management/health-pests-weeds-diseases/livestock/residues-animals/aflatoxin>
70. RICHARD, John L., PAYNE, Gary A., DESJARDINS, Anne E., MARAGOS, Chris, NORRED, William P. III., PESTKA, James J., PHILLIPS, Timothy D., EGMOND, Hans P. van, VARDON, Peter J., WHITAKER, Thomas B. a WOOD, Garnett. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and GHuman Systems*. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 s. ISBN 1-887383-22-0.
71. ROMER LABS. Mycotoxin Regulations for Food and Feed in the EU. © Romer Labs®, 2016 [poster]. 2016.
72. ROMER LABS. Mycotoxin Regulations for Food in Indonesia. © Romer Labs®, 2016 [poster]. 2016.
73. RUPRICH, Jiří. Siláž – plísňe a mykotoxiny. *Zprávy Centra hygieny potravinových řetězců v Brně*. Brno: Státní zdravotní ústav Praha, 1998, **7**(1), 12. ISSN 1211-8311.
74. SANTINI, Antonello a RITIENI, Alberto. Aflatoxins: Risk, Exposure and Remediation. In: RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi. *Aflatoxins – recent advances and future prospects*. IntechOpen, 2013, 343-376. ISBN 978-953-51-0904-4.
75. SÁNCHEZ-BAYO, Francisco, ALMEIDA, Luis de, WILLIAMS, Robert, WRIGHT, Graeme, KENNEDY, Ivan R. a CROSSAN, Angus. *The Aflatoxin Quicktest™ – A practical tool for ensuring safety in agricultural produce* [online]. Intech, December 2017 [cit. 7. 3. 2018]. Dostupné z: DOI: 10.5772/intechopen.71331
76. SEEDS OF LIFE. Agriculture in Timor-Leste. In: *seedsoflifetimor.org* [online]. © Seeds of Life, 2011 [cit. 2.5.2018]. Dostupné z: <http://seedsoflifetimor.org/timor-leste-agriculture/>
77. SKLÁDANKA, Jiří. Čirok obecný (*Sorgum vulgare* Pers.). In: web2.mendelu.cz [online]. 14.7.2007 [cit. 26.2.2018]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/picniny/sklady.php?odkaz=cirok.html

78. SMITH, Roff Martin. *Austrálie*. Velký průvodce. 1. vydání. Přeložil Ivan Kolman. Computer Press, 2009. 400 s. ISBN 978-80-251-2499-4.
79. STARK, Avishay-Abraham. Threat Assessment of Mycotoxins as Weapons: Molecular Mechanisms of Acute Toxicity. *Journal of Food Protection*. Israel: 2005, **68**(6), 1285-1293. ISSN 0362-028X.
80. STRAKOVÁ, Petra. *Využití metody ELISA pro vyhodnocování efektivity vakcinace u vybraných druhů onemocnění*. Brno, 2011. bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Fakulta přírodovědecká. Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce Zdeněk Hubálek.
81. ŠIMŮNEK, Jan. Mykotoxiny. Přehled nejdůležitějších mykotoxinů. In: *med.muni.cz* [online]. Brno: únor 2000. Únor 2003 [cit. 7. 3. 2018]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/predmety/preventivni/MYKOTW/mtpr_idx.htm
82. TAJKARIMI, Mehrdad, SHOJAEE, Mohammad Hossein, YAZDANPANA, Hassan a IBRAHIM, Salam A. Aflatoxin in agricultural commodities and herbal medicine. In: GUEVARA-GONZÁLEZ, Ramón Gerardo. *Aflatoxins – biochemistry and molecular biology*. Croatia: InTech, 2011, 367-396. ISBN 978-953-307-395-8.
83. THYER, Rebecca. Peanuts without poison. *Partners in research for development*. Minimising aflatoxin contamination offers significant health benefits in countries where peanuts are an important food. *Community health*, 3.7.2006.
84. TRAN-DINH, N., KENNEDY, Ivan R., BUI, T. a CARTER, D. Survey of Vietnamese peanuts, corn and soil for the presence of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*. Springer, 2009, **168**(5), 257-268. ISSN 1573-0832.
85. U.S. EPA (Environmental Protection Agency). *Benchmark dose technical guidance*. Risk assessment forum. 1.vyd. Washington D.C.: june 2012.
86. ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ, NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘ. *Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv*. 10570.1 - Stanovení obsahu mykotoxinů metodou LC-MS – aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂ [online]. 1. vyd. Schválil Jiří ZBÍRAL. Česká republika: 10.12.2015 [cit. 24.4.2018]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/246937/10570.1 Stanoveni_obsahu_mykotoxinu_metodou_LCMS_aflatoxiny.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/246937/10570.1Stanoveni_obsahu_mykotoxinu_metodou_LCMS_aflatoxiny.pdf)
87. VIŠŇOVSKÝ, Peter et al. *Farmakologie látek znečišťujících životní prostředí*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997. 106 s. ISBN 80-7184-407-1.
88. VONDRÁŠKOVÁ, Šárka. Mykotoxiny. In: *bezpecnostpotravin.cz* [online]. Ministerstvo zemědělství © 2012, 12.8.2011 [cit. 21.4.2018]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/mykotoxiny.aspx>
89. VRANA, Branislav. Standardní operační postupy [přednáška]. Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, 2015. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/C5920/um/SOP_a_validace_metod.pdf
90. Východní Timor. Základní informace. In: *svetadily.cz* [online]. © svetadily.cz [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: <http://vychodni-timor.svetadily.cz/>

91. WHO (World Health Organization). *Evaluation of certain mycotoxins in food*. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: 2002. ISBN 92-4-120906-2.
92. WON-BO, Shim, YANG, Zheng-you, KIM, Jung-sook, KIM, Ji-young, KANG, Sung-jo, WOO, Gun-jo, CHUNG, Young-chul, EREMIN, Sergei A. a CHUNG, Duck-hwa. Development of Immunochromatography Strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of Aflatoxin B₁ in grain and feed samples. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2007, **17**(10), 1629-1637.
93. XIMENES Felix. On the road again: Seeds of Life contributes to the Aflatoxin roadshow. Producing quality grain for markets. In: *seedsoflifetimor.org* [online]. © Seeds of Life, 29.6.2016 [cit. 10.4.2018]. Dostupné z: <http://seedsoflifetimor.org/on-the-road-again-seeds-of-life-contributes-to-the-aflatoxin-roadshow-producing-quality-grain-for-markets/>
94. YESSY, Betty. Learning aflatoxin quick test to improve food safety. In: *seedsoflifetimor.org* [online]. © Seeds of Life, 11.12.2015 [cit. 10.4.2018]. Dostupné z: <http://seedsoflifetimor.org/learning-aflatoxin-quick-test-to-improve-food-safety/>

Použité obrázky

Obr. č. 1 – Strukturní vzorec Aflatoxinu B₁: ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, INC. *ACD/Chemsketch* [software]. 11.7.2012. Dostupné z: <https://www.slunecnice.cz/sw/acd-chemsketch/>. Operační systém: Windows XP, Windows Server 2003, Windows Vista, Windows 7.

Obr. č. 2 – Strukturní vzorec Aflatoxinu B₂: ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, INC. *ACD/Chemsketch* [software]. 11.7.2012. Dostupné z: <https://www.slunecnice.cz/sw/acd-chemsketch/>. Operační systém: Windows XP, Windows Server 2003, Windows Vista, Windows 7.

Obr. č. 3 – Strukturní vzorec Aflatoxinu G₁: ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, INC. *ACD/Chemsketch* [software]. 11.7.2012. Dostupné z: <https://www.slunecnice.cz/sw/acd-chemsketch/>. Operační systém: Windows XP, Windows Server 2003, Windows Vista, Windows 7.

Obr. č. 4 – Strukturní vzorec Aflatoxinu G₂: ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, INC. *ACD/Chemsketch* [software]. 11.7.2012. Dostupné z: <https://www.slunecnice.cz/sw/acd-chemsketch/>. Operační systém: Windows XP, Windows Server 2003, Windows Vista, Windows 7.

Obr. č. 5 – Strukturní vzorec Aflatoxinu M₁: ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, INC. *ACD/Chemsketch* [software]. 11.7.2012. Dostupné z: <https://www.slunecnice.cz/sw/acd-chemsketch/>. Operační systém: Windows XP, Windows Server 2003, Windows Vista, Windows 7.

Obr. č. 6 – Strukturní vzorec Aflatoxinu M₂: ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, INC. *ACD/Chemsketch* [software]. 11.7.2012. Dostupné z: <https://www.slunecnice.cz/sw/acd-chemsketch/>. Operační systém: Windows XP, Windows Server 2003, Windows Vista, Windows 7.

Obr. č. 7 – Mapa zobrazení regulace mykotoxinů ve světě: MALÍŘ, František. Mykotoxiny, toxicita, hodnocení dietární expozice, účinky na organismus [přednáška]. Praha a Brno: Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 4. a 5. listopadu 2010.

Obr. č. 8 - kukuřice setá (*Zea Mays*): HEALT BENEFITS TIMES. Kukuřice setá (*Zea mays*). In: *healthbenefittimes.com* [online]. 2017 [cit. 18.4.2018]. Dostupné z: <https://www.healthbenefittimes.com/corn/>

Obr. č. 9 - čirok (*Sorghum* sp.): MACHER, Ingrid. Čirok (*Sorghum* sp.). In: *gethealthygethot.cz* [online]. 2006 [cit. 19.4.2018]. Dostupné z: <http://gethealthygethot.com/2545/the-amazing-health-benefits-of-sorghum/>

Obr. č. 10 - podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*): LIS (Legume Information System). Podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*). In: *legumeinfo.org* [online]. [cit. 19.4.2018]. Dostupné z: <https://legumeinfo.org/organism/Arachis/hypogaea>

Obr. č. 11 - pšenice setá (*Triticum aestivum*): FARM PIRATE. pšenice setá (*Triticum aestivum*). In: *farmpirate.com* [online]. 22.7.2014 [cit. 19.4.2018]. Dostupné z: <http://www.farmpirate.com/de/node/2466>

Obr. č. 12 - Mapa Východního Timoru: Google maps [online]. Google [cit. 2.5.2018]. Dostupné z: <https://www.google.com/maps/@-9.0950709,115.1897532,5z>

Obr. č. 13 - Mapa Austrálie: Google maps [online]. Google [cit. 2.5.2018]. Dostupné z: <https://www.google.com/maps/@-9.0516754,83.8567453,3z>

Obr. č. 14 – Klimatické stupně podle Köppenovy klasifikace podnebí v Austrálii. AUSTRALIAN GOVERNMENT. In: *bom.gov.au* [online]. © Commonwealth of Australia 2014, Bureau of Meteorology, 2014. [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: http://www.bom.gov.au/iwk/climate/zones/map_1.shtml

Obr. č. 15 – Klimatické stupně podle Köppenovy klasifikace podnebí v Indonésii včetně Východního Timoru: ZIFAN, Ali. In: *wikimedia.org* [online]. 20.2.2016 [cit. 13.4.2018]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indonesia_map_of_K%C3%B6ppen_climate_classification.svg

Obr. č. 16 - Schematický diagram zařízení s laterálním průtokem: SÁNCHEZ-BAYO, Francisco, ALMEIDA, Luis de, WILLIAMS, Robert, WRIGHT, Graeme, KENNEDY, Ivan R. a CROSSAN, Angus. The Aflatoxin Quicktest™ – A practical tool for ensuring safety in agricultural produce [online]. Intech, December 2017 [cit. 7. 3. 2018]. Dostupné z: DOI: 10.5772/intechopen.71331



Obr. č. 17 – příjezdová cesta do Plant Breeding Institute – Grains research Center ve městě Narrabri (foto autor)



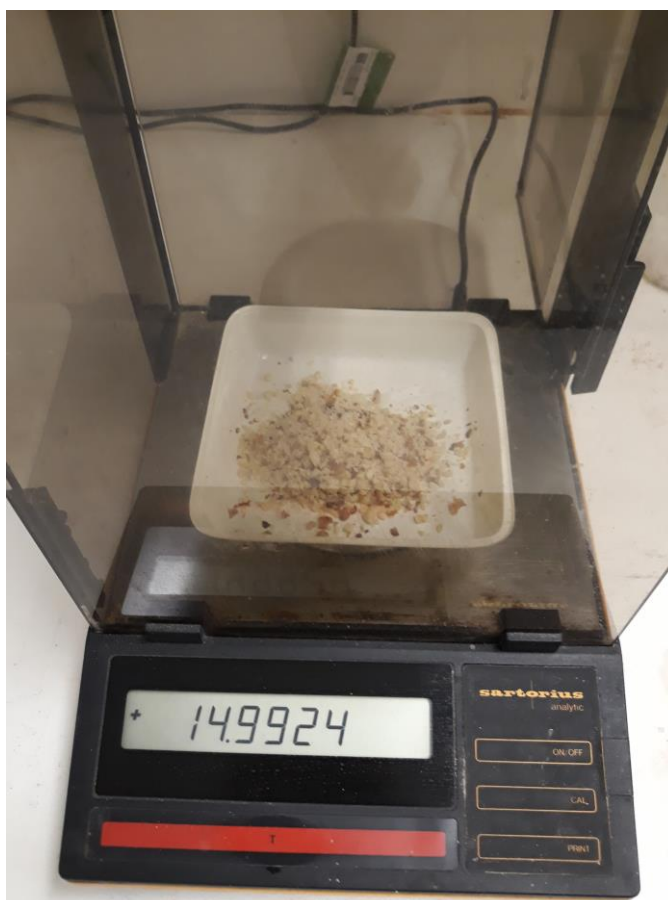
Obr. č. 18 – International Grains Research Center ve městě Narrabri (foto autor)



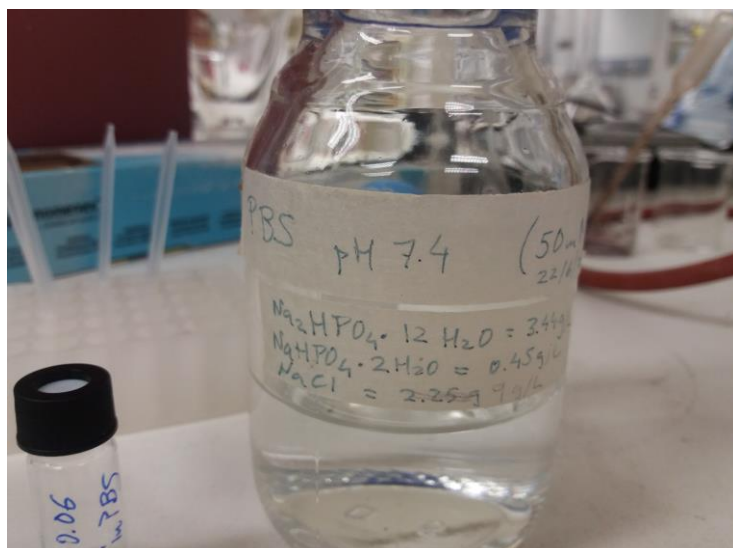
Obr. č. 19 – Tamworth Agricultural Institute (foto autor)



Obr. č. 20 – Vzorky kukuřice (foto autor)



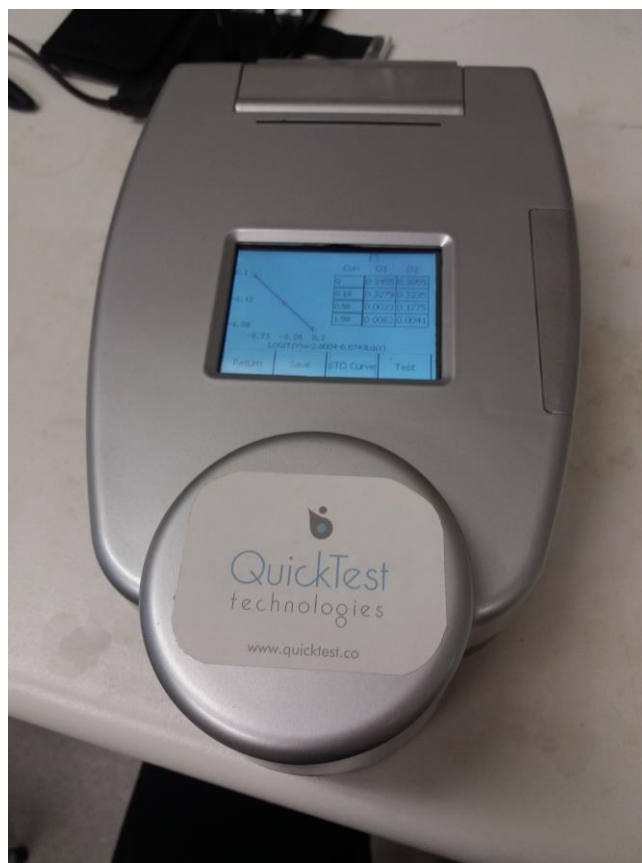
Obr. č. 21 – Měření vzorku plodiny na laboratorní váze (foto autor)



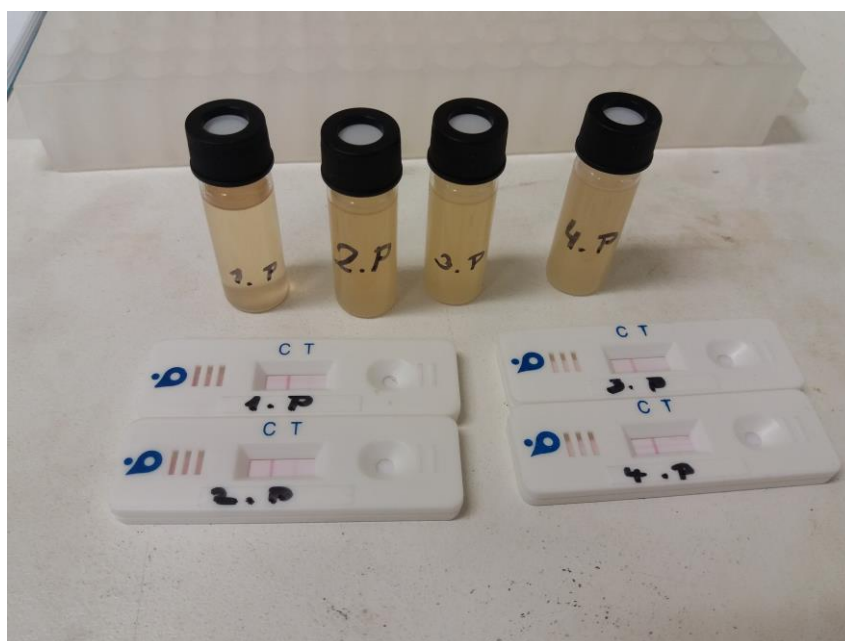
Obr. č. 22 – Fosfátový pufr: PBS, 50mM, pH 7,4 (foto autor)



Obr. č. 23 – Mixování směsi v mixéru (foto autor)



Obr. č. 24 – Aflatoxin Quicktest™ Reader (foto autor)



Obr. č. 25 – Ukázka vzorků arašídů (P = peanuts) a jejich výsledků na kazetách Aflatoxin Quicktest™ (foto autor)