



# VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

<b>Klasifikace:</b>	Draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Oponovaný draft	<input type="checkbox"/>	<i>Pro vnitřní potřebu VVF</i>
	Finální dokument	<input type="checkbox"/>	<i>Pro oficiální použití</i>
	Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Pro veřejné použití</i>

Název dokumentu:

## **Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě**

Poznámka:

VVF-15-03

Zpracovatel: Mgr. Světlana Sýkorová a kol. (VÚRV)  
RNDr. Jan Nedělník, Ph.D. a kol. (VÚPT)  
ve spolupráci s Envicho, s.r.o.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 PRAHA 6 - Ruzyně

Tel.: +420 233 022 324 , fax.: +420 233 311 591, URL: <http://www.phytosanitary.org>

# Mykotoxiny - stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR, v Evropě a dalších zemích

SVĚTLANA SÝKOROVÁ A KOL., JAN NEDĚLNÍK A KOL.

*Výzkumný ústav rostlinné výroby, Výzkumný ústav pícninářský, Envicho, s r.o.*

## 1. Výsledky 3-letého monitoringu obsahu fusariových mykotoxinů v zrna obilovin v ČR

*Sýkorová, S., Matějová, E.*

Houby rodu *Fusarium* jsou významnými patogeny většiny zemědělských plodin. Mezi nejčastěji se vyskytující druhy patří *F.graminearum*, *F.culmorum*, *F.avenaceum*, *F.poa*, *F.tricinctum*, *Microdochium nivale* a další (Parry et al. 1995; Hýsek et al. 1999; Tvarůžek et al. 1999). Nacházejí se jak ve vegetativních, tak i reprodukčních orgánech a způsobují vadnutí, poškození a úhyn rostlin, u cereálií poškození klasů a následně zrna. Po infekci rostlin dochází ke značným ekonomickým ztrátám v důsledku poklesu výnosu. V souvislosti s napadením však další nebezpečí představuje produkce toxických sekundárních metabolitů v zrna - mykotoxinů, z nichž v cereáliích jsou nejvýznamněji zastoupeny trichothecenové deriváty – deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) a T2 toxin, které způsobují jak u člověka, tak u hospodářských zvířat mykotoxikózy, projevující se zvracením a dalšími zažívacími potížemi. Navíc jsou tyto látky velmi stabilní jak tepelně, tak chemicky. Další skupinu mykotoxinů představuje zearalenon (ZEA) a jeho deriváty, u nichž byly prokázány estrogenní účinky. Do potravního řetězce se tyto sloučeniny mohou dostávat jak přímou konzumací kontaminované produkce, tak i zprostředkovaně krmivy a následně živočišnými produkty. Pro DON byl v ČR vyhláškou Ministerstva zdravotnictví 298/1997 stanoven hygienický limit 2 mg/kg (ppm) pro zrna, 1 mg/kg (ppm) pro mouku, pro další trichothecenové deriváty ani pro zearalenon zatím limit nebyl stanoven.

Bylo zjištěno, že většina odrůd pšenice a ječmene je náchylná k infekci působené těmito houbami a že neexistují výraznější specifické rozdíly v reakci na napadení různými patotypy *F.graminearum* nebo *F.culmorum* (Mesterházy, 1995; Salas et al. 1997; van Eeuwijk et al. 1995). Napadení cereálií houbami rodu *Fusarium* má vliv nejen na jejich hygienickou nezávadnost (kontaminace mykotoxiny), ale i na technologickou jakost, např. pšeničné mouky, u sladovnického ječmene postiženého fusariózou přechází DON až do výsledného produktu – piva a je jedním z faktorů, které s velkou pravděpodobností způsobují spolu se šřavelany přepěňování (tzv. gushing).

*Od 1.1.2003 podléhá veškerá manipulace s trichotheceny povolení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) podle zákona č. 281/2002 Sb. o zákazu biologických a toxinových zbraní. Trichotheceny jsou v příloze tohoto zákona zařazeny do skupiny vysoce rizikových toxinů. VÚRV bylo toto povolení letos v dubnu uděleno. Určitým nedostatkem zákona je skutečnost, že v něm není stanoven žádný limit pro vyjmenované látky, takže o povolení musí žádat i ten, kdo pracuje např. s 1 mg těchto látek nebo s komerčními soupravami pro imunochemické stanovení, což by paradoxně mohlo vést k situaci, kdy by suroviny pro výrobu potravin nebo krmiv nebyly z tohoto hlediska kontrolovány. V mnoha provozních laboratořích, např. ZZN nebo potravinářských provozech totiž pracovníci nemohou splnit podmínku pro udělení licence pro zacházení s vysoce rizikovými toxiny, protože vesměs nemají vysokoškolské vzdělání chemického nebo biologického zaměření. Ve státech EU komerční soupravy pro stanovení mykotoxinů, které obsahují sadu standardů stanovované látky, nepodléhají podobnému zákonu. I sami pracovníci SÚJB uznávají, že předkladatelé zákona si nebyli vědomi všech jeho možných dopadů. Podle našich poznatků bude nutná jeho novelizace ve smyslu zjednodušení a zmírnění požadavků.*

Ve VÚRV Praha byl řešen od roku 2000 do roku 2002 projekt mezinárodní spolupráce programu COST, akce 835, v němž jsme kromě reakce různých odrůd pšenice a ječmene na umělou infekci definovaným izolátem *Fusarium culmorum* také zjišťovali, jaké hladiny hlavního fusariového mykotoxinu deoxynivalenolu se nacházejí ve vzorcích pšenice, ječmene a žita z provozních ploch v ČR v letech 2000, 2001 a 2002 a jaké je u nich druhové zastoupení houbových patogenů.

Studovaným materiálem byl soubor vzorků zrna odrůd ozimé pšenice, jarního ječmene a žita z různých okresů ČR. Tyto vzorky byly získány z každoročního monitoringu kvality sklizně obilovin, který provádí ZVÚ Kroměříž, s.r.o. Pro mykologické rozborby bylo z každého průměrného vzorku vyčleněno 300 náhodně odebraných zrn, zbytek vzorku byl rozemlet na laboratorním mlýnku ZM 100 (Retsch) a použit ke stanovení deoxynivalenolu (DON) kvantitativní imunochemickou metodou (ELISA) s využitím komerčních kitů RIDASCREEN FAST DON, vyráběných firmou R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany. Stanovení bylo provedeno podle protokolu předepsaného výrobcem tak, že každý standard i vzorek byl nanášen paralelně do dvou jamek titrační destičky a měřen spektrofotometricky. Za pozitivní byly považovány vzorky s obsahem DON nad hodnotu LOQ, která činila 0,2 ppm. Výpočet získaných výsledků byl uskutečněn pomocí softwaru RIDA<sup>R</sup> SOFT Win.

Pro mykologickou kontrolu byla použita metodika mykologicky sledovaných zrn. Zrna byla dezinfikována ponořením (5 minut) do 5% roztoku chlornanu sodného. Po okapání byla zrna umístěna na sladinkový agar v Petriho miskách. Kultivační teplota byla 24°C. Petriho misky byly inkubovány po dobu 14 dní a odečítány přípravou mikroskopických preparátů z narostlých kolonií mikromycet kolem studovaného zrna a určováním podle morfologických charakteristik.

Ze sklizně 2000 bylo analyzováno 56 vzorků **pšenice** (21 odrůd, 48 okresů), průměrný obsah DON činil 0,135 ppm (0,003 - 0,74 ppm) a byly identifikovány druhy *Fusarium oxysporum*, *tricinctum*, *poae* a rod *Alternaria*. Dále bylo testováno 33 vzorků **jarního ječmene** (7 odrůd, 24 okresů), průměrný obsah DON činil 0,22 ppm; (0,02 - 0,55 ppm), v některých vzorcích byl stanoven i obsah zearalenonu v rozsahu 0,02 – 0,075 ppm. Mykologická kontrola nebyla u ječmene prováděna. Bylo analyzováno rovněž 22 vzorků **žita** (6 odrůd, 22 okresů), s průměrným obsahem DON 0,136 ppm; (0,05 - 0,46 ppm). Mykologická kontrola nebyla prováděna. V roce 2000 nebyl překročen hygienický limit u žádného vzorku,

Ze sklizně 2001 bylo analyzováno 55 vzorků **pšenice** (14 odrůd, 44 okresů), průměrný obsah DON činil 0,177 ppm (0,01 – 2,49 ppm), limitní hodnota byla překročena u 1 vzorku a mykologicky byly identifikovány druhy *Fusarium graminearum*, *oxysporum*, *tricinctum*, *poae*, *avenaceum*, *solani* a rod *Alternaria*, dále 32 vzorků **jarního ječmene** (7 odrůd, 24 okresů), průměrný obsah DON činil 0,283 ppm (0,03 – 3,77 ppm). Limitní hodnota byla překročena u 1 vzorku. Byly identifikovány druhy *Fusarium graminearum*, *culmorum*, *oxysporum*, *tricinctum*, *poae*, *avenaceum* a rod *Alternaria*. Bylo analyzováno rovněž 15 vzorků **žita** (4 odrůdy, 20 okresů), průměrný obsah DON byl 0,124 ppm (0,02 – 0,33 ppm). Mykologická kontrola nebyla prováděna.

Ze sklizně 2002 bylo analyzováno 95 vzorků **pšenice** (19 odrůd, 47 okresů), průměrný obsah DON činil 0,142 ppm (0 – 1,45 ppm), limitní hodnota nebyla překročena u žádného vzorku, byly nalezeny druhy *Fusarium poae*, *tricinctum*, *graminearum*, *oxysporum*, *culmorum*, *avenaceum* a rody *Alternaria*, *Epicoccum* a *Drechslera*, dále analyzováno 30 vzorků **jarního ječmene** (5 odrůd, 23 okresů), průměrný obsah DON byl 0,237 ppm (0 – 1,15 ppm). Limitní hodnota nebyla překročena. Byly identifikovány druhy *Fusarium graminearum*, *poae*, *tricinctum*, *culmorum*, *oxysporum*, *avenaceum* a rody *Alternaria* a *Drechslera*. Bylo analyzováno rovněž 32 vzorků **žita** (6 odrůd, 20 okresů), průměrný obsah DON 0,126 ppm (0 – 1,11 ppm). Mykologická kontrola vybraných 22 vzorků - druhové a rodové zastoupení patogenních hub bylo prakticky shodné jako u vzorků pšenice a ječmene.

#### Monitoring obsahu DON ve vzorcích pšenice, ječmene a žita v letech 2000 a 2001 je dokumentován tabulkami I,II a III

Tabulka I. Výsledky stanovení obsahu DON v obilninách ze sklizně 2000

Komodita	Počet vyšetřených vzorků n	Počet pozitivních vzorků n+	Aritmet. průměr (µg/kg)	Medián (µg/kg)	Kvantil 90% (µg/kg)	Min (µg/kg)	Max (µg/kg)
pšenice - zrno	56	4	135	220	230	3	740
ječmen - zrno	33	10	220	110	460	20	550
žito - zrno	22	3	136	220	220	53	455

**Tabulka II. Výsledky stanovení obsahu DON v obilninách ze sklizně 2001**

Komodita	Počet vyšetřených vzorků n	Počet pozitivních vzorků n+	Aritmet. průměr (µg/kg)	Medián (µg/kg)	Kvantil 90% (µg/kg)	Min (µg/kg)	Max (µg/kg)
pšenice - zrno	55	9	177	220	320	10	2490
ječmen - zrno	32	9	283	220	540	30	3770
žito - zrno	15	1	124	220	220	20	330

**Tabulka III. Výsledky stanovení obsahu DON v obilninách ze sklizně 2002**

Komodita	Počet vyšetřených vzorků n	Počet pozitivních vzorků n+	Aritmet. průměr (µg/kg)	Medián (µg/kg)	Kvantil 90% (µg/kg)	Min (µg/kg)	Max (µg/kg)
pšenice - zrno	95	7	142	220	220	0	1450
ječmen - zrno	30	5	237	110	391	0	1150
žito - zrno	32	1	126	220	220	0	1100

Imunochemické metody stanovení mykotoxinů (ELISA) mají mnohé výhody. Jsou to např.: dostupnost hotových komerčních kitů; snadná extrakce a minimální nutnost čištění extraktu; rychlost provedení zkoušky; vysoká specificita a citlivost; relativně „nízké“ finanční náklady; srovnatelnost výsledků s chromatografií. Přesnost stanovení DON metodou ELISA byla v letošním roce ověřována v mezinárodním kruhovém testu FAPAS s velmi dobrým výsledkem.

### **Literatura:**

- Hýsek, J., Váňová, M., Hajšlová, J., Radová, Z., Koutecká, J., Tvarůžek, L. 1999: Fusarioses of barley with emphasis on the content of trichothecenes. *Plant Protection Sci.* 35, s. 96
- Mesterházy, Á. 1995: Types and components of resistance against FHB of wheat. *Plant Breeding* 114, s. 377
- Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995: Fusarium ear blight (scab) in small cereals – a review. *Plant Pathology* 44, s. 207
- Salas, B., Steffenson, B. J., Casper, H. H., Prom, L. K. 1997: Fusarium species pathogenic to barley and their associated toxins. In: Mesterházy, Á, ed. *Proc. Fifth European Fusarium Seminar, Cereal Research Institute, Szeged, Hungary*, s. 483
- Tvarůžek, L., Váňová, M., Kraus, P., Hrabalová, H. 1999: The results of two year's survey of toxigenic and non toxigenic Fusarium spp. incidence in the foot rot diseases of winter cereals. Second (COST 835) workshop on Mycotoxins in plant diseases, 7. - 9. 10. 1999, Roma, Italy
- van Eeuwijk, F. A., Mesterházy, Á., Kling, C. I., Ruckebauer, L., Saur, L., Bürstmayr, H., Lemmens, M., Maurin, M., Snijders, C. H. A. 1995: Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of Fusarium culmorum, F. graminearum and F. nivale, using a multiplicative model for interaction. *Theor. Appl. Genet.* 90, 1995, s. 221

## 2. Metodické poznatky získané při analytických stanoveních mykotoxinů

### 2.1. Imunochemické stanovení deoxynivalenolu – metodika a metodické poznatky

Sýkorová, S.

#### 1. Upozornění:

- Standardy v kitu obsahují deoxynivalenol – zabraňte kontaktu roztoků s pokožkou – používejte rukavice
- Dekontaminaci nádobí a roztoků obsahujících zearalenon je možno provést roztokem chlornanu sodného (10%) přes noc – používáme zředěný přípravek Savo
- Stop činidlo obsahuje 1N kyselinu sírovou, chraňte pokožku před potřísněním
- Nepoužívejte kit po uplynutí expiračního data
- Nezaměňujte jednotlivé reagenty mezi jednotlivými kity
- Namodralé zbarvení červeného roztoku substrátu/chromogenu indikuje poškození a reagenty by neměla být používána.
- Hodnota nižší než 0,6 jednotek absorbance pro nulový standard může indikovat poškození reagentů.

#### 2. Příprava vzorku:

- navážit 2,5 g vzorku do skleněné zábrusové baňky s rovným dnem a přidat 50 ml destilované vody. **Poměr vzorku a vody musí být vždy 1:20 (diluční faktor)**
- Baňku uzavřete zábrusovou skleněnou zátkou a pečlivě třepejte 3 minuty.
- Přefiltrujte směs přes skládaný papírový filtr do další skleněné baňky
- Pro stanovení použijte 50 µl čirého filtrátu.

#### 3. Předběžná upozornění:

- Všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu (cca 1 hod.).
- Specifická reakce startuje přidáním specifické protilátky. Nepoužívejte více než 3 proužky, pracujete-li s jednoduchou pipetou. Více proužků - až 6 lze použít, pracujete-li s multikanálovou pipetou.
- Vraťte všechny reagenty ihned po použití do lednice (2-8°C).
- Během práce jamky nesmějí vyschnout. Neprodlužujte intervaly mezi jednotlivými kroky.
- Reprodukovatelnost je hlavně závislá na stejnoměrnosti, s kterou jsou vymývány jamky. Pečlivě sledujte doporučenou sekvenci jamek při vymývání, jak je uvedeno v návodu.
- Zabraňte přístupu přímého slunce k destičce během inkubací (např. přikrytím destičky vrstvou alobalu).

#### 4. Proužky pokryté protilátkou:

- Vyjměte pouze potřebné množství proužků, zbytek pečlivě zabalte a vraťte do lednice (2-8°C).

#### 5. Standardy:

- Standardy jsou připraveny přímo k použití. Při jejich označování byl uvažován diluční faktor 20 pro vzorky. Koncentrace DON tedy mohou být odečítány přímo ze standardní kalibrační křivky.

#### 6. Promývací pufr:

- Kit obsahuje balíček pro přípravu pufru, obsah se rozpustí v 1 l destilované vody. Vydrží 4 týdny při 4°C. Pufr je doporučen pro vzorky pšenice a produkty z ní. Ostatní vzorky mohou být pufrům také promývány.

#### 7. Test

- Vložte odpovídající počet proužků do rámečku. Zapište pozice standardů a vzorků.
- Pipetujte 50 µl standardu nebo vzorku do jamek, užíjte vždy novou špičku pro každý standard či vzorek.
- Přidejte 50 µl enzymového konjugátu na dno každé jamky (červená zátká) – užíjte multikanálovou pipetu
- Přidejte 50 µl DON protilátky do každé jamky (černá zátká) – použijte multikanálovou pipetu. Zamíchejte pečlivě jemným potřepáním destičky a inkubujte ji přikrytou 5 minut (+ - 1 minuta) při pokojové teplotě.
- Vylijte tekutinu z jamek do výlevky. Vyklepněte zbytky tekutiny 3x o filtrační papír (buničinu) – jamky dnem nahoru. Použijte stříčku nebo multipipetu, naplňte jamky destilovanou vodou (pro pšeničné vzorky promývacím pufrům). Znovu vyprázdněte jamky a odstraňte zbytky. Opakujte promytí 2x (raději 3x).



- Přidejte 2 kapky (nebo 100 µl) substrátu/chromogenu do každé jamky (bílé kapátko). Promíchejte, zakryjte alobalem a inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě.
- Přidejte 2 kapky (nebo 100µl) stop činidla do každé jamky (žluté nebo oranžové kapátko). Dobře promíchejte a změřte při 450 nm proti blanku. Odečtěte během 10 minut

#### **8. Poznámka k ředění**

- Některé extrakty ze silně infikovaných materiálů je třeba ředit tak, aby obsah DON odpovídal rozsahu kalibrační křivky. Ředění se provede ve skleněných centrifugačních kyvetkách následovně:
  - **2x (do softwaru se uvede diluční faktor 2) tj. 1:1** - 100 µl vzorku + 100 µl dest. vody - řádně promíchat pomocí wortexu nebo „pumpováním“ pipetovací špičkou
  - **3x (diluční faktor 3) tj. 1:2** - 100 µl vzorku + 200 µl dest. vody – řádně promíchat
  - **5x (diluční faktor 5) tj. 1:4** - 50 µl vzorku + 200 µl dest. vody - řádně promíchat
  - **10x (diluční faktor 10) tj. 1:9** – 50 µl vzorku + 450 µl dest. vody - řádně promíchat
- **atd.**
- Základní nezředěný extrakt uchovat až do konečného výpočtu, kdy jsme si jisti, že ředění bylo dostačující

#### **9. Výpočet**

- Výpočet se provede nejlépe pomocí softwaru RIDA SOFT Win. Hodnoty LOD byla zjištěna mezi pod 0,2 (mg/kg) ppm, hodnota LOQ činí 0,2 ppm.

### 2.2. Imunochemické stanovení zearalenonu – metodika a metodické poznatky

*Sýkorová, S.*

#### **1. Upozornění:**

- Standardy v kitu obsahují zearalenon – zabraňte kontaktu roztoků s pokožkou – používejte rukavice
- Dekontaminaci nádobí a roztoků obsahujících zearalenon je možno provést roztokem chlornanu sodného (10%) přes noc – používáme zředěný přípravek Savo
- Stop činidlo obsahuje 1N kyselinu sírovou, chraňte pokožku před potřísněním
- Nepoužívejte kit po uplynutí expiračního data
- Nezaměňujte jednotlivé reagenty mezi jednotlivými kity
- Namodralé zbarvení červeného roztoku substrátu/chromogenu indikuje poškození a reagenty by neměla být používána.
- Hodnota nižší než 0,6 jednotek absorbance pro nulový standard může indikovat poškození reagenty.
- Všechny reagenty vytemperovat na pokojovou teplotu (cca 1 hod.).
- Specifická reakce startuje přidáním specifické protilátky. Nepoužívejte více než 3 proužky ,pracujete-li s jednoduchou pipetou. Více proužků - až 6 lze použít, pracujete-li s multikanálovou pipetou.
- Vraťte všechny reagenty ihned po použití do lednice (2-8°C).
- Během práce jamky nesmějí vyschnout. Neprodlužujte intervaly mezi jednotlivými kroky.
- Reprodukovatelnost je hlavně závislá na stejnoměrnosti, s kterou jsou vymývány jamky. Pečlivě sledujte doporučenou sekvenci jamek při vymývání, jak je uvedeno v návodu.
- Zabraňte přístupu přímého slunečního světla k destičce během inkubací. Přikryjte destičku např. vrstvou alobalu.

#### **2. Příprava vzorku:**

- navážit 5,0 g vzorku do skleněné zábrusové baňky s rovným dnem a přidat 25 ml 70% methanolu.
- Baňku uzavřete zábrusovou skleněnou zátkou a pečlivě třepejte 3 minuty.
- Přefiltrujte směs přes skládaný papírový filtr do další skleněné baňky
- **k 1 ml filtrátu přidejte 1 ml destilované vody** a řádně promíchejte – tím je dosaženo základního dilučního faktoru 10, který je nakalibrován i pro standardy – hodnoty obsahu ZEA lze pak odečítat přímo z kalibrační křivky
- Pro stanovení použijte 50 µl čirého filtrátu.

### 3. Proužky pokryté protilátkou

- Vyjměte pouze potřebné množství proužků, zbytek pečlivě zabalte a vraťte do lednice (2-8°C).

### 4. Standardy

- Standardy jsou připraveny přímo k použití. Při jejich označování byl uvažován diluční faktor 10 pro vzorky. Koncentrace ZEA tedy mohou být odečítány přímo ze standardní kalibrační křivky.

### 5. Test

- Vložte odpovídající počet proužků do rámečku. Zapište pozice standardů a vzorků.
- Pipetujte 50 µl standardu nebo vzorku do jamek, užijte vždy novou špičku pro každý standard či vzorek.
- Přidejte 50 µl enzymového konjugátu na dno každé jamky (červená zátka) – multikanálová pipeta.
- Přidejte 50 µl DON protilátky do každé jamky (černá zátka) – použijte multikanálovou pipetu. Zamíchejte pečlivě jemným potřepáním destičky a inkubujte ji přikrytou 10 minut ( $\pm 1$  minuta) při pokojové teplotě.
- Vylijte tekutinu z jamek do výlevky. Vyklepněte zbytky tekutiny 3x o filtrační papír (buničinu) – jamky dnem nahoru. Použijte stříčku nebo multipipetu, naplňte jamky destilovanou vodou. Znovu vyprázdněte jamky a odstraňte zbytky tekutiny. Opakujte promytí 2x (raději 3x).
- Přidejte 2 kapky (nebo 100 µl) substrátu/chromogenu do každé jamky (bílé kapátko). Promíchejte, zakryjte alobalem a inkubujte 5 minuty při pokojové teplotě.
- Přidejte 2 kapky (nebo 100 µl) stop činidla do každé jamky (žluté nebo oranžové kapátko). Dobře promíchejte a změřte při 450 nm proti blanku. Odečtěte během 10 minut

### 6. Poznámka k ředění

- Některé extrakty ze silně infikovaných materiálů je třeba ředit tak, aby obsah ZEA odpovídal rozsahu kalibrační křivky. Ředění se provede ve skleněných centrifugačních kyvetkách následovně:
  - **2x (do softwaru se uvede diluční faktor 2) tj. 1:1** - 100 µl vzorku + 100 µl dest. vody - řádně promíchat pomocí vortexu nebo „pumpováním“ pipetovací špičkou
  - **3x (diluční faktor 3) tj. 1:2** - 100 µl vzorku + 200 µl dest. vody – řádně promíchat
  - **5x (diluční faktor 5) tj. 1:4** - 50 µl vzorku + 200 µl dest. vody - řádně promíchat
- atd.
- Základní nezředěný extrakt uchovat až do konečného výpočtu, kdy jsme si jisti, že ředění bylo dostačující

### 7. Výpočet

- Výpočet se provede nejlépe pomocí softwaru RIDA SOFT Win. Hodnota LOD byla zjištěna mezi 17 – 41 µg/kg (ppb), hodnota LOQ činí 50 ppb.

## 2.3. Postup stanovení DON a ZEA metodou HPLC

Matějová, E.

### **2.3.1. Stanovení deoxynivalenolu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – metodika a metodické poznatky**

#### 1. Příprava vzorku

- Navažte 2 g mletého homogenního vzorku do skleněné zábrusové baňky s rovným dnem a přidejte 20 ml roztoku acetonitril/H<sub>2</sub>O (84/16 – objemová procenta, Acetonitril Gradient Grade (Merck)).
- Baňku uzavřete zábrusovou skleněnou zátkou a pečlivě třepejte na třepačce 1 hod. (cca 200 ot/min, IKA).
- Přefiltrujte směs přes filtr SEPAP Z-7 do další skleněné baňky.
- Část filtrátu (nejméně 10 ml) protlačte přes čistící kolonku MycoSep 226 – cca 10 ml filtrátu přelít do zkumavky a kolonku s pevnou přečišťovací fází tlačíme do zkumavky, čímž nám filtrát přechází (směrem vzhůru) přečištěn nad tuhou fází.
- Do odpařovacích 5,0 ml reakčních vialek (ECOM Praha) převed'te 2x 2 ml přečištěného filtrátu a odpařte do sucha v suchém termostatu Termovap (ECOM Praha) při 40°C za mírného proudění dusíku z tlakové lahve – cca 20 min, kontrolovat tlak proudění N<sub>2</sub>.

- Suchý odparek rekonstituujte přidáním příslušného objemu mobilní fáze (1 ml v případě použití vialek bez insertů, 0,15-0,3 ml v případě použití insertů) – pro stanovení DON je mobilní fází 10% Methanol – 10 ml Methanolu Gradient Grade (Merck) + 90 ml vody pro HPLC (Merck).
- V případě utvoření sraženiny po rozpuštění v mobilní fázi směs třepejte na vortexu 3 min a pak vložte na 10 min do ultrazvukové lázně při 40°C. Pokud se sraženina nerozpustí, směs zcentrifugujte a do vialky převed'te pouze čistý supernatant.

## 2. Příprava standardů

- Pro vytvoření kalibrační křivky vytvořte řadu standardních roztoků o různých koncentracích stanovované látky (př. 0,2 – 10 ppm DON). 1 mg DON (SIGMA ALDRICH) rozpusťte v odměrné baňce v 10 ml methanolu (dostanete tzv. zásobní roztok o  $c(\text{DON}) = 100$  ppm). Pro přípravu roztoků na kalibrační křivku si připravte ještě tzv. pracovní roztok o  $c(\text{DON}) = 50$  ppm – 2,5 ml zás. roztok + 2,5 ml MetOH.

- př. příprava standardu o koncentraci 1 ppm (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ):

$$\begin{aligned} 1 \mu\text{g} & \dots\dots\dots 1\ 000 \mu\text{l stand. roztoku} \\ 50 \mu\text{g} & \dots\dots\dots x \mu\text{l prac. roztoku} \\ x & = 1/50 \times 1000 = 20 \mu\text{l prac. roztoku,} \end{aligned}$$

- 20  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku ( o konc. DON 50 ppm) do odpařovací vialky, odpařte do sucha za proudění  $\text{N}_2$  a poté přidejte 1 ml mobilní fáze (10% MetOH). Takto připravte celou řadu standardních roztoků.

## 3. Pracovní postup

Pro stanovení obsahu deoxynivalenolu byla aplikována metoda s gradientovou elucí  
methanol : voda - 0-1 min 10% methanol, 1-10 min 50% methanol.

Podmínky analýzy:

chromatograf Alliance 2690 (WATERS); kolona LiChroCART 125-4 HPLC – Cartridge RP – 18e (5 $\mu\text{m}$  s předkolonou LiChroCART RP- C18e (Merck); teplota kolony 35°C, mobilní fáze - methanol : voda, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, objem nástřiku vzorku(standardu) 20  $\mu\text{l}$ ; detektor UV/VIS, vlnová délka 223 nm. Chromatografické záznamy a výpočty jsou zpracovány programem Millennium32 (WATERS).

## 4. Výpočty

$$c_{\text{DON}} = c_{\text{HPLC}} \cdot \frac{V_{\text{extr}}}{V_{\text{aliquot}}} \cdot D \cdot V_{\text{rekonst}} \cdot \frac{1}{\text{nav}}$$

$c_{\text{DON}}$  koncentrace DON ve vzorku ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

$c_{\text{HPLC}}$  koncentrace DON v extraktu (ng/ml)

$V_{\text{extr}}$  objem extrakčního činidla

$V_{\text{aliquot}}$  objem extraktu použitého pro další zpracování (ml)

D ředění (pozn. k ředění viz. výše – imunochemické stanovení DON)

$V_{\text{rekonst}}$  objem zpracovaného extraktu po převedení do vhodného rozpouštědla pro HPLC (mob. fáze) (ml)

nav navážka (g)

př.:  $c_{\text{DON}} = c_{\text{HPLC}} \cdot \frac{20}{2} \cdot 1 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} = c_{\text{HPLC}} \cdot 5$ , pro výpočet musíme konc. DON v extraktu násobit faktorem 5.

## 5. Stanovení výtěžnosti metody

Pro stanovení výtěžnosti metody se provádí celá analýza s referenčním materiálem o známé koncentraci stanovovaného analytu. Výtěžnost se vypočte podle následujícího vzorce:

$$\text{Rec} = \frac{c_{\text{DON}}}{c_{\text{certif}}} \cdot 100$$

Rec výtěžnost (%)

$c_{\text{DON}}$  námi stanovená koncentrace DON ve vzorku ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

$c_{\text{certif}}$  koncentrace DON v referenčním materiálu ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )



### 2.3.2. Stanovení zearalenonu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – metodika a metodické poznatky

#### 1. Příprava vzorku

- Navažte 2 g mletého homogenního vzorku do skleněné zábrusové baňky s rovným dnem a přidejte 20 ml roztoku acetonitril/H<sub>2</sub>O (84/16 – objemová procenta, Acetonitril Gradient Grade (Merck)).
- Baňku uzavřete zábrusovou skleněnou zátkou a pečlivě třepejte na třepačce 1 hod. (cca 200 ot/min, IKA).
- Přefiltrujte směs přes filtr SEPAP Z-7 do další skleněné baňky.
- Část filtrátu (nejméně 10 ml) protlačte přes čistící kolonku MycoSep 226 – cca 10 ml filtrátu přelít do zkumavky a kolonku s pevnou přečišťovací fází tlačíme do zkumavky, čímž nám filtrát přechází (směrem vzhůru) přečištěn nad tuhou fází.
- Do odpařovacích 5,0 ml reakčních vialek (ECOM Praha) převed'te 2x 2 ml přečištěného filtrátu a odpařte do sucha v suchém termostatu Termovap (ECOM Praha) při 40°C za mírného proudění dusíku z tlakové lahve – cca 20 min, kontrolovat tlak proudění N<sub>2</sub>.
- Suchý odparek rekonstituujte přidáním příslušného objemu mobilní fáze (1 ml v případě použití vialek bez insertů, 0,15-0,3 ml v případě použití insertů) – pro stanovení ZEA je mobilní fází 70% Methanol – 70 ml Methanolu Gradient Grade (Merck) + 30 ml vody pro HPLC (MERCK).
- V případě utvoření sraženiny po rozpuštění v mobilní fází směs třepejte na vortexu 3 min a pak vložte na 10 min do ultrazvukové lázně při 40°C. Pokud se sraženina nerozpustí směs zcentrifugujte a do vialky převed'te pouze čistý supernatant.

#### 2. Příprava standardů

- Pro vytvoření kalibrační křivky vytvořte řadu standardních roztoků o různých koncentracích i stanovované látky (př. 20 – 1000 ppb ZEA). 10 mg ZEA (Sigma Aldrich) rozpust'te v odměrné baňce v 10 ml acetonitrilu (dostanete tzv. zásobní roztok o c(ZEA) = 1000 ppm). Pro přípravu roztoků na kalibrační křivku si připravte ještě tzv. pracovní roztok o c(ZEA) = 50 ppm – 0,25 ml zás. roztok + 4,75 ml acetonitrilu.

- př. přípravy standardu o koncentraci 500 ppb (500 ng/ml):

500 ng .....1 000 µl stand. roztoku

50000 ng .....x µl prac. roztoku

$$x = 500/50\ 000 \times 1000 = 10 \mu\text{l prac. roztoku,}$$

- 10 µl pracovního roztoku ( o konc. ZEA 50ppm) do odpařovací vialky, odpařte do sucha za proudění N<sub>2</sub> a poté přidejte 1 ml mobilní fáze (70% MetOH). Takto připravte celou řadu standardních roztoků.

#### 3. Pracovní postup

Pro stanovení obsahu zearalenonu byla aplikována metoda s gradientovou elucí

methanol : voda - 0-1 min 70% methanol, 1-2,5 min 100% methanol, 2,5-9 min 70% methanol.

Podmínky analýzy:

chromatograf Alliance 2690 (WATERS); kolona LiChroCART 125-4 HPLC – Cartridge RP – 18e (5µm s předkolonou LiChroCART RP- C18e (Merck); teplota kolony 35°C, mobilní fáze - methanol : voda, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min, objem nástřiku vzorku(standardu) 20 µl; detektor fluorescenční, vlnová délka excitace 235 nm, vlnová délka emise 440 nm. Chromatografické záznamy a výpočty jsou zpracovány programem Millennium<sup>32</sup> (WATERS).

#### 4. Výpočty

$$c_{ZEA} = c_{HPLC} \cdot \frac{V_{extr}}{V_{aliquot}} \cdot D \cdot V_{rekonst} \cdot \frac{1}{nav}$$

c<sub>ZEA</sub> koncentrace ZEA ve vzorku (µg/kg)

c<sub>HPLC</sub> koncentrace ZEA v extraktu (ng/ml)

V<sub>extr</sub> objem extrakčního činidla

V<sub>aliquot</sub> objem extraktu použitého pro další zpracování (ml)

D ředění (pozn. k ředění viz. výše – imunochemické stanovení DON)

$V_{\text{rekonst}}$  objem zpracovaného extraktu po převedení do vhodného rozpouštědla pro HPLC (mob. fáze) (ml)  
 $n_{\text{av}}$  navážka (g)

př.: 
$$c_{\text{ZEA}} = c_{\text{HPLC}} \cdot \frac{20}{2} \cdot 1 \cdot 1 \cdot \frac{1}{2} = c_{\text{HPLC}} \cdot 5$$
, pro výpočet musíme konc. ZEA v extraktu násobit faktorem 5.

### 5. Stanovení výtěžnosti metody

Pro stanovení výtěžnosti metody se provádí celá analýza s referenčním materiálem o známé koncentraci stanovovaného analytu. Výtěžnost se vypočte podle následujícího vzorce:

$$\text{Rec} = \frac{c_{\text{ZEA}}}{c_{\text{certif}}} \cdot 100$$

Rec výtěžnost (%)

$c_{\text{ZEA}}$  námi stanovená koncentrace ZEA ve vzorku ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

$c_{\text{certif}}$  koncentrace ZEA v referenčním materiálu ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

## 3. Přehled výsledků průzkumu obsahu mykotoxinů v Evropě a dalších státech (na zákl. jejich prezentací na mezinárodních konferencích)

Sýkorová, S., Matějová, E.

V Bavorsku se plocha pěstování kukuřice zvýšila od roku 1972 (kukuřice na siláž 150 000 ha) až na dvojnásobek v roce 1999 (300 000 ha), stejně tak plocha kukuřice na zrno se od roku 1988 (50 000 ha) do roku 1999 také téměř zdvojnásobila (94 000 ha). V celé SRN pak plocha kukuřice na siláž vzrostla od roku 1956 (50 000 ha) do roku 1999 více než dvacetinásobně (1 196 000 ha), zatímco plocha kukuřice na zrno vzrostla ve stejném období více než padesátinásobně (7 000 ha v roce 1956 – 362 000 ha v roce 1999). Tyto plochy jsou potenciálně rizikové z pohledu šíření fusarióz (Eder, 2000). Uvedený předpoklad byl potvrzen záměrnými polními pokusy na různých lokalitách v SRN, nejen v Bavorsku v letech 1998 a 1999, kdy byla pšenice vysévána po kukuřici při minimálním zpracování půdy nebo při kontaminaci pokusných parcel kukuřičnými posklizňovými zbytky. Zjištěné obsahy DON byly v širokém rozmezí od 0 po téměř 17 ppm a obsahy NIV od 0 do 1,4 ppm. V nejvíce postižených pokusných lokalitách byla nalezena vysoce významná korelace mezi vysokým stupněm vizuálního napadení a obsahem DON ( $r = 0,817^{**}$ ). Potvrdilo se, že tato metoda vizuálního hodnocení na poli byla použitelným parametrem pro odhad obsahu DON, zatímco obsah NIV v zrnu byl sporadický a nepoužitelný pro jakékoli tvrzení týkající se jeho obsahu (Wosnitza, 2000).

V 80. letech bylo v Bavorsku mykologicky testováno zrno ovsa, pšenice a kukuřice a bylo zjištěno, že velmi často docházelo k incidenci houbou *Fusarium graminearum*. Ačkoli v roce 1963 nebyla tato houba vůbec nalezena v hnojících stoncích kukuřice v jižním Německu, v roce 1990 již tento patogen převládal. Bylo konstatováno, že zvýšení ploch kukuřice od 60. let je příčinou výskytu houby. Na kukuřičném strništi se houba nachází zcela pravidelně. Zatímco na kukuřičném strništi se nacházejí izoláty skupiny 1 a 2, u zrna ostatních obilovin jsou to pouze izoláty skupiny 2. (Rintelen, 2000a). Od roku 1982 je v Bavorsku prováděn mykologický průzkum vzorků drobnozrnných obilnin a kukuřice. Zpočátku byly testovány vzorky ovsa, pšenice a ječmene skladovaných na farmách ke krmení, později pak vzorky z polí z celého Bavorska. V letech 1982-1989 byly nejčastěji identifikovány druhy *F. avenaceum* a *F. poae*. Nejdůležitější toxinogenní druh *F. graminearum* byl identifikován masověji jen jednou za pět let, jinak pouze sporadicky, náhodně byly nacházeny *F. culmorum*, *F. tricinctum* a *F. sporotrichioides*. Na kukuřici byly identifikovány ještě *F. verticillioides* a *F. sacchari* var. *subglutinans*, avšak v žádném z uvedených let nebyla kukuřice vážněji atakována (Rintelen, 2000b).

Vzhledem k tomu, že vitalita osiva může být snížena vlivem fusariozy, bylo zjišťováno spektrum fusarií nacházejících se v Bavorsku na nejdůležitějších obilovinách v letech 1987 - 1999. Bylo zjištěno, že nejčastějším patogenem u všech obilovin, ale zvláště u ozimé pšenice, je druh *Microdochium nivale*. Hybridní žito bylo mnohem náchylnější než populace. Patogen většinou napadá zrna a poté již nemůže být eliminován povrchovou sterilizací. Následující, druhý v pořadí - druh *Fusarium graminearum* byl zjištěn hlavně na zrnech pšenice a ovsa. *Fusarium poae* byl zjišťován častěji pouze u ovsa, zatímco *F. culmorum* a *F. avenaceum* byly v uvedených letech identifikovány zřídka (Obst, Fuchs, 2000).

Deoxynivalenol (DON) ze skupiny trichothečenů B se vyskytuje nejčastěji a bývá nacházen ve vyšších koncentracích oproti dalším mykotoxinům z této skupiny. Je produkován hlavně druhy *Fusarium graminearum* a *F.culmorum*. Prvně jmenovaný druh je odpovědný za fusariozy drobnozrnných cereálií známých v německu jako „Partielle Taubährigkeit“. Preferovanou metodou pro detekci DON je HPLC s UV-detekcí. Selektivita detekce může být zvýšena metodou post-kolonové reakce. Detekce stopových hladin DON vyžaduje derivatizaci a je mnohem náchylnější k chybám. Detekce DON je možná i pomocí ELISA metody. DON patří k méně toxickým trichothečenům (LD<sub>50</sub> je 70 mg/kg bw.), avšak symptomy akutní toxicity byly pozorovány při dávkách mnohem nižších než LD<sub>50</sub>. Limity pro DON jsou zavedeny pouze v několika státech. Nivalenol (NIV) ve srovnání s DON obsahuje navíc OH skupinu, je velmi podobný DON jak analyticky, tak i toxikologicky. Hraje pouze minoritní roli. Zearalenon, další fusariový mykotoxin, vykazuje hlavně estrogenní aktivitu. Prasata jsou na zearalenon nejcitlivější ze všech domácích zvířat. Současné znalosti nesvědčí o patrném vlivu zearalenonu na člověka při případné expozici. Jeho potenciální karcinogenita a především genotoxicita, dosud nebyla objasněna (Lepschy, 2000).

V Bavorsku se uskutečnil rozsáhlý monitoring fusarioz v letech 1989-1999, epidemiologicky bylo analyzováno cca 3250 vzorků pšenice. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a byly vytipovány a potvrzeny následující rizikové faktory pro rozvoj fusarioz a předpokládány vyšší obsah mykotoxinů: kukuřice jako předplodina, neobracení (nezpracování) půdy po kukuřici, pěstování náchylných odrůd, aplikace některého z fungicidů Amistar, Brio, Juwel nebo Juwel Top a konečně pro *Fusarium* příznivý průběh počasí v době kvetení (Bauer, 2000). Analýza mykotoxinu DON v rámci tohoto monitoringu i při polních pokusech s umělou infekcí prokázala, že ozimá pšenice je velmi citlivá, tritikale a oves vykazovaly poněkud nižší hladiny DON než ozimá pšenice, zatímco tvrdá pšenice (*Triticum durum*) byla zvláště vysoce citlivá. Naopak hladiny DON u jarního a ozimého ječmene nebyly významné (Beck, Lepschy, 2000). V polních pokusech od roku 1993 byly rovněž zjišťovány „kritické meteorologické podmínky“. Pro úspěšný útok klasů musí být splněny následující požadavky:

1. rozšíření ascospor v růstových fázích 39/41-61 alespoň 1x déšť (více než 4 mm), poté jeden nebo více teplých dnů (průměrná teplota nejméně 16°C).
2. infekce klasů ascosporami bezprostředně po rozšíření ascospor v růstových fázích 55 – 69 alespoň dva dny se srážkami více než 2 mm a teplotou nejméně 17°C.
3. produkce macroconidií na horních listech a infekce klasu – bezprostředně po rozšíření ascospor vlhká (a chladná) perioda; infekce klasů vysokým počtem macroconidií dokonce i při nízké teplotě (Obst, Bechtel, 2000).

Při testování vhodnosti různých fungicidů proti *F. graminearum* bylo zjištěno, že fungicid Amistar (azoxystrobin) a Juwel (kresoxim-methyl+epoxiconazol) mohou zvyšovat riziko vyššího obsahu DON. Tento nežádoucí výsledek byl potvrzen v letech 1997 – 1999 nejen v přesných polních pokusech při umělé inokulaci, ale i v běžných farmářských podmínkách v letech 1998 a 1999 při monitoringu ozimé pšenice v Bavorsku. Další otázkou bylo, jak optimálně načasovat ošetření fungicidem proti fusarioze. Alespoň 60% úspěšnosti ošetření bylo dosaženo, jestliže byl postřik proveden v rozmezí 1 – 2 dny před inokulací až 4 dny po ní. Farmáři tedy mohou provést aplikaci fungicidu i po inokulaci, jestliže dokáží včas odhadnout riziko infekce podmíněné výše uvedenými klimatickými podmínkami (Obst, Gammel, 2000).

Napadení zrna plísněmi má samozřejmě vliv i na klíčivost a následně i na zpracovatelskou kvalitu zrna. Při skladování ve stabilně suchém prostředí může být počet mikrobiálních zárodků snížen, naopak ve vlhkých skladovacích prostorách (> 14% vlhkosti) se zvyšuje vývoj skladištních plísní. Tomu odpovídá pokles nebo ztráta klíčivosti zrna během takového nevhodného skladování. Zvláště při procesu skladování má aktivita klíčení ovlivněná skladováním rozhodující vliv na vývoj plísní a produkci toxinů během fáze klíčení a na kvalitu sladu a následně piva. U téže odrůdy lze gushing (přepěňování) piva výrazně snížit, jestliže není předplodinou kukuřice a zrno je skladováno v suchých prostorách. Během procesu mletí se obsah DON sníží až o 50% (různě podle obsahu popele v mouce). (Beck, 2000).

Pěstování odolných odrůd je nejefektivnějším způsobem jak redukovat poškození pšenice způsobené fusariozou. Zatím však u pšenice ani příbuzných druhů nebyla nalezena komplexní rezistence, avšak ve šlechtitelských programech jsou používány různé zdroje rezistence. Úsilí směřuje k tomu, aby byly kombinací těchto známých zdrojů připraveny nové materiály s lepšími parametry. Podstatné urychlení těchto snah lze očekávat v průběhu cca 5 let, jakmile budou vyvinuty molekulární markery pro QTL rezistence proti fusariosám a „marker-assisted“ šlechtění bude připraveno pro praktické využití V bavorském zemském ústavu



půdoznalectví a rostlinné výroby (LBP) ve Freisingu jsou všechny registrované odrůdy pšenice testovány v různých podmínkách z hlediska jejich rezistence k fusariozám, včetně polních experimentů s umělou inokulací. Výsledky tohoto testování vedou ke klasifikaci odrůd, která je použitelná pro kontrolní orgány. V LBP je ve speciálním programu studován vztah mezi viditelnými symptomy napadení fusariozou, kolonizací houby na zrna a obsahem mykotoxinů (Zimmermann, 2000). Metoda AFLP pro nalezení molekulárních markerů k identifikaci QTL pro rezistenci proti fusariosám je v LBP intenzivně rozvíjena. Pomocí těchto markerů bylo objasněno dosud cca 10 – 25 % fenotypové variability. Identifikované molekulární markery pomohou kombinovat geny rezistence rodičů a vyvinout šlechtitelské materiály s vyšší úrovní odolnosti k fusariozám (Hartl et al., 2000, Buerstmayr et al., 2002).

Bylo prokázáno, že uvnitř druhu *F. graminearum* existují geneticky různé skupiny, které mají rozdílné biologické vlastnosti, hlavně s ohledem na jejich patogenicitu pro různé hostitele (pšenice, kukuřice, rýže) a liší se navzájem i typem produkovaného hlavního trichotheceenového mykotoxinu (NIV nebo DON). Izoláty *F. graminearum* byly rozděleny pomocí molekulárních markerů na tři skupiny A, B a C. Tyto skupiny se liší původem (A, B zahrnovaly izolát z Nepálu), skupina C izoláty z Evropy a USA. Izoláty skupiny A produkovaly buď NIV nebo DON, zatímco izoláty skupiny B produkovaly převážně NIV a izoláty skupiny C převážně DON (Nicholson et al., 2002).

V Itálii byl již po 10 let prováděn průzkum původců hniloby pat stébla (foot rot) a fusariozy klasu pšenice. Bylo zjištěno, že fusariozy klasu jsou časté v severní a střední Itálii a jejich nejčastějším původcem je *Fusarium graminearum*, zatímco hniloba pat stébla je pozorována ve střední a jižní Itálii a původcem je hlavně *Microdochium nivale* a *Fusarium culmorum* (Corazza et al., 2002). V letech 1999 a 2000 byl prováděn monitoring obsahu DON ve vzorcích pšenice z různých částí Itálie. Vzorky ze severní Itálie měly vyšší obsah DON, než vzorky ze střední a jižní Itálie. Tvrdá pšenice byla všeobecně více kontaminována (nejvyšší obsah DON 6,465 ppm) než měkká pšenice (nejvyšší obsah DON 3,010 ppm), ve vzorcích z jižní Itálie byl zjištěn pouze zanedbatelný obsah DON (méně než 0,1 ppm) (Pascale et al., 2002).

V Nizozemsku byl na počátku 90. let identifikován jako dominantní druh *Fusarium culmorum*, což bylo později potvrzeno i RAPD analýzou. Vzhledem k tomu, že v sousedních státech byl zaznamenáván stále častější výskyt *F. graminearum*, byl i Nizozemsku proveden další monitoring druhového zastoupení rodu *Fusarium* a bylo zjištěno, že skutečně nejčastější byly *F. graminearum*, *F. culmorum* a *M. nivale* var. *majus* s převahou *F. graminearum* v letech 2000 a 2001, což plně souhlasilo s nálezy ostatních okolních států Evropy. Agronomické důsledky zvýšení poměru *F. graminearum* / *F. culmorum* dosud nejsou jasné (Waalwijk, 2002).

Ve Velké Británii je prováděn od roku 2001 do roku 2005 rozsáhlý průzkum týkající se druhů Fusarií, hladin a spektra produkovaných mykotoxinů a efektivity chemické ochrany proti fusariozám. V roce 2001 bylo analyzováno 283 vzorků pšenice se známým způsobem hospodaření. Bylo identifikováno 7 mykotoxinů (zearalenon, DON, 15-AcDON, NIV, T2triol, T2 a HT2), nejčastěji však byly nacházeny DON a NIV (80% vzorků). Z analyzovaných agronomických faktorů měla největší vliv na obsah mykotoxinů lokalita, přičemž jejich obsah stoupal směrem k jihu, což odpovídá tomu, že toxinogenní druhy Fusarií preferují teplejší klima. Nebyl nalezen významný rozdíl mezi obsahem mykotoxinů mezi vzorky z organického a konvenčního pěstování a nebyl zjištěn ani významný vliv různého fungicidního ošetření (Edwards, 2002).

V Belgii byl na vzorcích pšenice v letech 2000 a 2001 rovněž prováděn monitoring nalezených houbových patogenů a následně obsahu mykotoxinů. Ve vzorcích z roku 2000 byl hlavním patogenem druh *M. nivale*, a dále v menším rozsahu *F. culmorum* a *F. graminearum*, minoritně byly nalezeny *F. avenaceum* a *F. poae*, obsah DON se pohyboval od 0 do 1,2 ppm. V roce 2001 byly mnohem častější druhy *F. avenaceum* a *F. poae*, zatímco *M. nivale* bylo minoritní. Obsah DON v roce 2001 kolísal od 0 do 0,4 ppm. Rozdíly obou let jsou vysvětlitelné tím, že v roce 2001 bylo v Belgii neobvykle suché počasí v době kvetení (Kestemont et al., 2002).

Na Ukrajině bylo zjištěno, že převládá 5 druhů: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *F. oxysporum*, přičemž *F. poae* a *F. culmorum* převládají v jižních oblastech Ukrajiny, zatímco *F. graminearum* v západní části státu. V letech 1996, 1998, 2000 a 2001 byl nejčastějším patogenem *F. poae* (Kryuchkova et al., 2002).

Ve Švédsku bylo v roce 2001 testováno použití NIRS (infračervená spektrofotometrie) metody pro rychlé orientační stanovení obsahu DON, Fusarií a ergosterolu vzhledem k tomu, že v EU se připravuje zavedení maximálních limitů 500 a 750 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Metoda NIRS je běžně používána pro stanovení vlhkosti a obsahu

proteinů. Výhodou metody je její rychlost a neinvazivnost. Při kalibracích pro stanovení DON u pšenice záleželo na tom, zda je zrno infikováno pouze *F. culmorum* nebo i *F. graminearum*, při dostatečném počtu měření byly získány velmi dobré korelace mezi metodou NIRS a HPLC. Pro ječmen s vysokými obsahy DON (až do 30 ppm) byla však standardní chyba poměrně vysoká (cca 3 ppm). Pro obsah Fusarií a ergosterolu byly získány velmi vysoké korelační koeficienty. Tato metoda by byla velmi užitečná, např. ve výkupu zrna, kde je třeba každou partii velmi rychle vyšetřit (Pettersson, Aberg, 2002).

V Kanadě byl v roce 2000 proveden počáteční průzkum týkající se rozsahu napadení, spektra Fusarií a hladiny DON u pěstovaných odrůd ovsa. Bylo zjištěno, že rozsah infikovaných zrn se pohyboval v závislosti na odrůdě mezi 25 – 63%, hlavními druhy byly *F. poae* (11 – 32% zrn) a *F. graminearum* (4 – 26%). Vizualní posouzení zrn napadených fusariozou bylo velmi obtížné, bylo založeno na vyčlenění nejvíce barevně odlišných zrn. Hladiny DON se pohybovaly mezi 2,5 – 10 ppm. Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi pluchatým a bezpluchým ovsem. Průzkumy tohoto charakteru budou pokračovat (Tekauz, 2002).

Průzkum obsahu DON a NIV v ovsu byl rovněž prováděn v Polsku v letech 1997 – 1999. Nejvíce pozitivních vzorků bylo zjištěno v roce 1999 (DON 77%, NIV 45%), stejně tak byla v tomto roce nalezena i nejvyšší průměrná koncentrace DON 125 ppb a NIV 75 ppb. Maximální koncentrace DON (767 ppb) byla zaznamenána u odrůdy STH 3798 v roce 1999 a maximální koncentrace NIV (280 ppb) v odrůdě Skrzat v roce 1998. Společný výskyt DON a NIV byl zjištěn ve 46 z 275 analyzovaných vzorků. Nalezené obsahy mykotoxinů jsou rozdílné v závislosti na odrůdě a na lokalitě pěstování (Basiński, Perkowski, 2002).

Výsledky průzkum ve Finsku v letech 1998 a 2000 prokázaly, že důsledkem deštivého a chladného počasí v roce 1998 bylo zaznamenáno na jihu státu silné napadení obilnin, zvláště žita. Byly prováděny přesné molekulárně biologické studie pro identifikaci druhů Fusarií a bylo zjištěno, že nejčastěji byly přítomny druhy *F. avenaceum*, *F. tricinctum* a *F. arthrosporioides*. Nejčastěji zjištěným mykotoxinem byl DON, avšak ve velmi nízkých koncentracích (cca 0,1 ppm). V některých vzorcích žita byl zjištěn beauvericin a enniatiny ve vyšších koncentracích (3,5 příp. 13,5 ppm). Izoláty *F. avenaceum* a *F. poae* z těchto vzorků byly velmi silnými producenty uvedených dvou méně obvyklých mykotoxinů. V roce 2000, kdy bylo také deštivo, ale chladněji než v roce 1998, byly hladiny nalezených trichothecenů vyšší (1,5 ppm) a nejčastěji byl zjištěn nivalenol, přičemž nebylo možno zcela přesně zjistit, kterým druhem Fusaria byl nivalenol syntetizován (Yli-Mattila et al., 2002). Podle italských badatelů může beauvericin vstupovat do potravního řetězce, jeho vliv na zdraví člověka a domácích zvířat dosud není znám a jeho cytotoxicita je studována na modelových buněčných kulturách. Bylo zjištěno, že cytotoxicita beauvericinu závisí na dávce a době působení (Caló et al., 2002, Macchia et al., 2002).

V severní Americe v oblasti pěstování jarních pšenic, zahrnující státy Minnesota, Severní a Jižní Dakota, východ státu Montana a kanadské provincie Manitoba, Saskatchewan a Alberta je prováděn průzkum vzorků pšenic na základě zjištění obsahu poškozených zrn (FDK – Fusarium damaged kernels nebo VSK – visually scabby kernels) a obsahu DON. Za léta 1991 – 1999 byla průměrná hodnota VSK 18 % a průměrný obsah DON 11 ppm. V USA vypočítávají poměr mezi obsahem DON a VSK. Uvádí se, že podle praktické zvyklosti („rule of the thumb“) je akceptovatelná jeho průměrná hodnota 0,5 nebo hodnoty blízké. V USA i v Kanadě probíhá intenzivní výzkum a šlechtění rezistentních odrůd pšenice a ječmene s využitím šlechtitelských školek v Číně (Stack, 2002).

Velmi zajímavý model pro předpověď obsahu DON podle průběhu počasí byl vypracován v Kanadě. Na základě analýz velkého počtu vzorků z různých let při různém průběhu počasí bylo zjištěno, že o obsahu DON rozhodují 3 periody: první 4 – 7 dní před metáním obsah DON stoupá s počtem dní se srážkami >5 mm a klesá s počtem dní <10°C, druhá 3 – 6 dnů po metání obsah DON stoupá s počtem dní se srážkami >3 mm a klesá s počtem dní nad 32°C, třetí 7 – 10 dní po metání se obsah DON zvyšuje s počtem dní se srážkami >3 mm. Model umožňuje předpovědět velmi přesně očekávaný nízký až střední obsah DON a tak pomáhá pěstitelům rozhodnout se, zda použít chemickou ochranu nebo nikoli. Na precizaci modelu se dále pracuje (Schaafsma et al., 2002).

V Kanadě bylo rovněž studovány faktory, které mají vliv na rozvinutí fusariozy. Modelově byl založen pokus, v němž byla promíchána vysoce napadená zrna se zdravými v různých poměrech a směsi vysety. Rozvoj choroby se nelišil mezi parcelami se 100% poškozených zrn a zcela zdravými zrny, nelišily se ani hodnoty HTS a FDK (Fusarium damaged kernels) pouze vzcházení bylo nepříznivě ovlivněno. Dalším



pokusem bylo zjištěno, že *Fusarium graminearum* přežívá z posklizňových zbytků (poškozených zrn) z 85 – 100% až 24 měsíců. Dále bylo sledováno ovlivnění kořenů jiných plodin pěstovaných v blízkosti pšenice napadené fusariozou. Bylo zjištěno, že jsou významně ovlivněny kořeny prakticky všech plodin, s výjimkou rodu *Brassica* (Gilbert, 2002).

### **Ze sborníku: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695, 2001**

Některé toxigenní plísňe žijí jako parazité, jiné mohou kolonizovat zemědělské plodiny (pšenice, kukuřice, vinná réva) nebo zemědělské komodity saprofytickou cestou. Za vhodných podmínek, které jsou příznivé pro růst těchto plísňí dochází v infikovaných plodinách ke značnému hromadění vysoce toxických sekundárních metabolitů - mykotoxinů. Produkce těchto toxinů může začít už během růstu na poli, ale také až po sklizni během uchovávání a zpracovávání. Tato rozsáhlá kolonizace toxigenními plísňemi a následná akumulace mykotoxinů představuje vysoké nebezpečí pro zdraví člověka a zvířat.

Výskyt toxinů kontaminujících potraviny, krmiva, vodu nebo vzduch je jeden z nejvýznamnějších nebezpečí, které může negativně ovlivňovat zdraví lidí a živočichů.

Bylo zjištěno, že 25 % potravinových plodin na celém světě je zasaženo mykotoxiny, pro některé toxiny produkované plísňemi rodu *Fusarium* jako je deoxynivalenol a fumonisin, je pravděpodobně toto procento mnohem vyšší.

Během posledních let bylo zaznamenáno v evropských zemích několik případů živočišných či lidských mykotoxikóz, ztráta produkce vedoucí k neplodnosti a snížení růstu u zvířat.

Výskyt toxigenních plísňí a jejich toxických sekundárních metabolitů v rostlinných produktech je jeden z nejvýznamnějších sociálních a ekonomických problémů Evropské unie. Například, celková produkce obilovin v EU je přibližně 173 mil. tun za rok (Home Grown Cereals Authority 1995, EU) a v nedávné zprávě bylo uvedeno, že ve 20% zemědělských plodin EU, které se užívají pro výrobu potravin či krmiv, bylo měřitelné množství mykotoxinů.

Díky rostoucímu zájmu o výzkum toxigenních plísňí a mykotoxinů, zvláště v poslední dekádě, se momentálně řeší řada rozsáhlých výzkumných projektů v různých zemích Evropy.

Sborník obsahuje příspěvky 16 evropských zemí, které se věnují sledování obsahu mykotoxinů. Tyto příspěvky podávají detailní informace o výskytu toxigenních plísňí a mykotoxinů v rostlinách, potravinách a krmivech v Evropě.

Z poznatků uvedených ve sborníku budou dále uvedeny informace týkající se mykotoxinů plísňí rodu *Fusarium*, především deoxynivalenolu a zearalenonu.

### **Rakousko**

*Lew, H., Adler, A., Thimm, N., Krška, R., Widner, G., Schul, M. (2001)*

Výskytem mykotoxinů a toxigenních plísňí v Rakousku se zabývají od 70. let minulého století, kdy byl sledován estrogení mykotoxin zearalenon jako kontaminant způsobující nespecifickou sterilitu u hovězího dobytka (Lengauer, 1977). Nicméně, hlavní popud pro důkladnou studii výskytu mykotoxinů v rakouském zemědělství byl obrovský problém s krmivem pro vepře obsahujícím fusariové mykotoxiny. Díky neobvyklému počasí (mrazy v září) byly klasy kukuřice silně zasaženy plísňí *Fusarium graminearum* a obsah DONu byl v klasech kukuřice mimořádně vysoký (až 20 ppm). Následkem bylo u mnohých zvířat odmítání potravy. Na konci 80. let bylo spektrum známých druhů *Fusarium* a jejich toxinů velice rozsáhlé. Kromě kukuřice, je nejčastěji ze zemědělských plodin infikován oves a pšenice. Dále můžeme bezpečně říci, že deoxynivalenol a jeho deriváty jako jsou zearalenon, moniliformin, beauvericin a nivalenol jsou nejvíce rozšířené. V letech 1996, 1997 a 1998 byla v Rakousku prováděna studie o obsahu mykotoxinů v kukuřici.

Vzorky klasů a zrn pocházely z 20 různých míst Rakouska. Byl zjišťován obsah DONu, 15-ADONu, 3-ADONu, ZEA, NIV, T-2 toxinu, fumonisinu B1 a B2 a moniliforminu. V roce 1996 bylo analyzováno

46 vzorků, průměrný obsah DON činil 0,645 ppm (0,06 - 2,81 ppm) a byly identifikovány druhy *Fusarium graminearum* (47%), *F. subglutinans* (29%), *F. avenaceum* (14%) a další (<2%). Průměrný obsah ZEA činil 0,09 ppm (0,02 - 0,28 ppm). V roce 1997 bylo analyzováno 58 vzorků, průměrný obsah DON činil 0,14 ppm (0,05 - 0,58 ppm) a byly identifikovány druhy *Fusarium graminearum* (16%), *F. subglutinans* (32%), *F. avenaceum* (23%) a *F. poe* (17%), *F. equiseti* (21%) a další (<8%). Průměrný obsah ZEA činil 0,04 ppm (0,02 - 0,14 ppm). V roce 1998 bylo analyzováno 48 vzorků, průměrný obsah DON činil 0,38 ppm (0,05 - 1,36 ppm) a byly identifikovány druhy *Fusarium graminearum* (31%), *F. subglutinans* (33%), *F. avenaceum* (17%) a další (<8%). Průměrný obsah ZEA činil 0,06 ppm (0,01 - 0,34 ppm).

Rozdíly mezi jednotlivými roky lze přisoudit rozdílným klimatickým podmínkám. V roce 1996 byly letní měsíce relativně chladné a vlhké a pak následoval mírný a deštivý říjen. V roce 1997 byl červenec charakteristický dešťovými srážkami, zatímco v září bylo relativně teplo a sucho. V roce 1998 byla celkové vegetační období teplejší než dlouhodobý průměr, i přestože červenec byl deštivý. Analýza vzorků pšenice ze sklizně ve Spolkové republice Německo v roce 1998 ukázala, že v blízkosti Bavorska, byl obsah DON až 7 mg/kg. V Rakousku se tedy rozhodli zjistit, jak vážná je kontaminace deoxynivalenolem u pšenice na jejich území. Byli analyzovány vzorky pšenice ze sklizně 1998 z různých částí území, jak suchých tak vlhkých. Test ukázal, že obsah DON byl daleko pod stanoveným rakouským limitem, tj. 0,5 mg/kg pšenice.

## Finsko

Rizzo, A., Berg, S., Eskola, M., Perttila, U., Saari, L. (2001)

Cílem studie prezentované v tomto sborníku bylo zjistit hladinu obsahu trichothecenů v reprezentativních vzorcích z Finska a dovezených plodin a krmiv ze sklizní v letech 1987-1988. Koncentrace trichothecenů byla měřena pomocí plynové chromatografie (GC-MSD s SIM). Analyzovány byly vzorky ovsa, pšenice, ječmene, rýže, kukuřice, sojových granulí, semena řepky, rybí maso, krmivo pro drůbež a pro prasata. Téměř všechny vzorky zrn a krmiv obsahovaly DON v množství od 7 – 300 µg/kg a malé množství 13 – 120 µg/kg 3-AcDON. V některých vzorcích byly nalezeny nízké koncentrace ZEA.

## Francie

Bakan, B., Cahagnier, B., Melcion, D. (2001)

Vzorky cereálií ze sklizní 1996 a 1997 pocházely z 10 různých částí Francie. V případě zjišťování obsahu DON, NIV byla použita metoda GC-ELD, u ZEA a fumonisinu metoda HPLC.

V roce 1996 bylo analyzováno 46 vzorků pšenice a 17 vzorků kukuřice, průměrný obsah DON činil 0,039 ppm (stop. množství - 0,58 ppm) u pšenice a 0,4 ppm (stop. množství - 2,8 ppm) u kukuřice. Průměrný obsah ZEA činil 9 ppb (stop. množství - 16 ppb) u pšenice a 0,335 ppm (stop. množství - 1,75 ppm) u kukuřice.

V roce 1997 bylo analyzováno 69 vzorků pšenice a 24 vzorků kukuřice, průměrný obsah DON činil 0,087 ppm (stop. množství - 0,65 ppm) u pšenice a 0,1 ppm (stop. množství - 0,558 ppm) u kukuřice. Průměrný obsah ZEA činil 7 ppb (stop. množství - 9 ppb) u pšenice a 0,015 ppm (stop. množství - 0,04 ppm) u kukuřice. Převládajícími druhy, které byly izolovány ze sklizně pšenice v roce 1996, byly *F. culmorum* a *F. graminearum*. Co se týče zastoupení dalších jednotlivých druhů, tak následovaly druhy *F. poae* a *F. proliferatum*. *F. moniliforme* byl převládajícím druhem izolovaným ze vzorků kukuřice. Všechny testované kmeny byly schopny produkovat DON a ZEA, zatímco výrazná produkce NIV byla pozorována pouze u izolátů *F. culmorum*.

## Německo

Kuhlmann, I., Valenta, H., Goll, M., Oldenburg, E., Flachowsky, G. (2001)

Ellner, F.M. (2001)

V roce 1996 bylo analyzováno 21 vzorků pšenice a 13 vzorků ječmene. Vzorky pocházely z oblastí Durynska a Saska, průměrný obsah DON činil 0,76 ppm (0,14 - 2,84 ppm) u pšenice a 0,82 ppm (0,17 - 2,07 ppm) u ječmene. Průměrný obsah ZEA činil 40 ppb (3 - 215 ppb) u pšenice a 41 ppb (4 - 193 ppb) u ječmene. Na přítomnost fusariových toxinů byly také analyzovány vzorky ze sklizně 1998, kdy bylo

shromážděno 84 vzorků pšenice, ječmene a ovsa z 22 míst (10 regionů) středního a severního Německa. 93% testovaných vzorků bylo infikováno *Fusarium spp.* *F. graminearum* byl nejvíce zastoupeným druhem, následovaly pak druhy *F. culmorum* a *F. avenaceum*. Počet pozitivních vzorků na DON dosáhl hodnoty 85%, zatímco v případě positivity na obsah ZEA bylo dosaženo hodnoty 65%.

## **Maďarsko**

*Hornok, L., Toth, A. (2001)*

Pravidelný monitoring obsahu mykotoxinů začal v Maďarsku analýzami aflatoxinů. Před třiceti lety se díky studiím došlo k závěrům, že klimatické podmínky v Maďarsku nejsou příčinou produkce mykotoxinů. Koncem šedesátých let se výzkum soustředil na obsah zearalenonu, dále na Fusariové toxiny, jako je T-2 toxin a deoxynivalenol. Maďarská Organizace na ochranu rostlin každoročně provádí průzkum o celostátním šíření infekce Fusariovými toxiny. Z posledních let bylo epidemické šíření zaznamenáno v letech 1996, 1997 a 1998. Míra infekce *Fusarium spp.* byla v těchto letech v rozmezí od 15,5 do 19,3% vzorků, zatímco v jiných letech tato hodnota nepřesahuje 10% (Aponyi et al., 1998). Epidemie sněti obilné byla zapříčiněna deštivým počasím během metání pšenice. Stupeň infekce byla také do jisté míry ovlivněna ochrannými prostředky – správně načasovaná aplikace příslušných fungicidů. Výsledky průzkumu, vedeném v období 1990 – 1994 v jižním Maďarsku (nejsušší a nejteplejší oblast), ukazují, že DON a ZEA jsou hlavními toxickými kontaminanty pšeničných a kukuřičných zrn.

## **Itálie**

*Bottalico, A., Logrieco, A. (2001)*

V roce 1976 Botallico (1978) vyšetřil na přítomnost ZEA a plísní rodu *Fusarium spp.* 56 vzorků pšeničných zrn, které pocházely z několika lokalit střední a jižní Itálie. Žádné toxiny nalezeny nebyly a zastoupení druhů *Fusarium* bylo také velice nízké. Visconti a Pascale aplikovali rychlou a přesnou metodu na stanovení ZEA - HPLC s fluorescenční detekcí, kdy vzorek je předem přečištěn na imunoafinitní kolonce. Vyšetřováno bylo 15 vzorků kukuřice ze sklizně 1997 pocházející ze severní Itálie a bylo zjištěno, že 13 z 15 vzorků obsahovalo ZEA v rozsahu hodnot od 0,004 do 0,14 mg/kg. Visconti et al. aplikovali pro stanovení obsahu DON ve vzorcích také HPLC s detektorem diodového pole. Analyzováno bylo 70 vzorků ze sklizně 1995 z různých částí Itálie. Výsledek ukázal velice rozšířenou kontaminaci deoxynivalenolem (obsah až 3,085 ppb).

## **Polsko**

*Chelkowski, J., Perkowski, J., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Kostecki, M., Golinski, P. (2001)*

Výskyt toxigenních plísní a produkce mykotoxinů se v Polsku sleduje od roku 1969. Vyšetřovány jsou především zemědělské plodiny a krmiva. V roce 1996 bylo analyzováno 21 vzorků pšenice, průměrný obsah DON činil 0,131 ppm, v roce 1997 dvanáct vzorků, průměrný obsah DON činil 1,532 ppm a v roce 1998 (Žulawy) bylo vyšetřeno 66 vzorků pšenice a průměrný obsah DON činil 0,190 ppm.

## **Norsko**

*Langseth, W., Elen, O., Rundberget, T. (2001)*

Od roku 1988 probíhá v Norsku každoročně monitoring obilnin na přítomnost trichothecenů. Analyzovány byly vzorky, které byly následně použity pro výrobu potravin či výrobu krmiv. Nejfrekvencovanějším toxinem byl deoxynivalenol. Obsah DON byl extrémně vysoký především v letech 1988 a 1992, kdy byly velice suchá jara a pak následoval deštivý červenec. V oblasti severního Norska byl také vysoký obsah DON v letech 1991 a 1993, jelikož léta byla chladná a deštivá, sklizeň byla později než obvykle. V roce 1988 bylo analyzováno 6 vzorků ječmene, 122 vzorků ovsa a 4 vzorky pšenice. Průměrný obsah DON činil u ječmene 0,65 ppm (max. 1,10), u ovsa 1,12 ppm (max. 14,6) a u pšenice 0,22 ppm (max. 0,43). V roce 1992 bylo analyzováno 92 vzorků ječmene, 92 vzorků ovsa a 142 vzorků pšenice. Průměrný obsah DON činil u ječmene 0,237 ppm (max. 4,40), u ovsa 0,614 ppm (max. 8,00) a u pšenice 0,197 ppm (max. 1,65). Na přítomnost ZEA a ochratoxinu A byly analyzovány pouze ty vzorky obilnin, které byly určeny pro lidskou spotřebu. Všeobecně by se dalo říci, že kontaminace těmito toxiny byla velice nízká.

## Rusko

Levitin, M. (2001)

Na území Ruska byla v posledních 10-15 letech infekce plísněmi rodu *Fusarium* velice rozšířena. V oblasti Krasnodaru (jižní Rusko) byly tři rozsáhlé epidemie sněti obilné. Ztráta výnosu ze sklizně pšenice dosáhla hodnoty 25-50% a kontaminace zrn obilnin mykotoxiny vzrostla více než 25krát (Levitin et al., 1994). V 25-80% vzorků pšenice přesáhla koncentrace DON povolenou hranici. Během 1989-1992 bylo v Rusku v průměru 23% vzorků obilnin (pšenice, ječmen, žito) kontaminováno deoxynivalenolem, přičemž 9% vzorků obsahovalo DON v koncentraci, která překračovala povolenou mez (Tuteljan, 1995). Analýza vzorků pšenice pocházejících z oblasti kolem Krasnodaru v roce 1992 ukazuje, že DON byl přítomen ve 100% analyzovaných vzorků v rozsahu 0,15 – 10,5 mg/kg. V 57% vzorků byl obsah DON nad stanovenou hodnotou. ZEA byl zjištěn v 68% vzorků v rozsahu 0,01 – 1,4 mg/kg (L'vova et al., 1997).

## Slovensko

Šrobárová, A. (2001)

Na území Slovenska se pravidelně vyskytuje 6 *Fusarium spp.* kontaminující pšenici. Jedná se o *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* a *F. nivale* – uspořádáno dle klesající frekvence výskytu. Fusariové nákazy se vyskytují prakticky na celém území Slovenska a prakticky i ve všech zemědělských plodinách (v kukuřici, cukrové řepě, bramborách). Tyto nákazy se objevují ve všech nadmořských výškách; byly prokázány jak ve 140 m nad mořem, tak i v 700 metrech nad mořem. Fusariósy se také vyskytují různých typech půd. V závislosti na produkci a půdních podmínkách jsou zaznamenávány pouze rozdíly v počtu zastoupených druhů Fusaria.

## Velká Británie

P. Jennings (2001)

Na přítomnost deoxynivalenolu bylo celkově analyzováno 43 krmného a 42 sladovnického ječmene pocházejícího z různých oblastí Velké Británie. Pro stanovení obsahu DON byla použita metoda GC-MS. Průzkum ukázal, že významná hodnota obsahu DON byla pouze u 1,2% celkového počtu vzorků, kdy tato hodnota přesáhla hranici 100 µg/kg.

V letech 1980-82 bylo také analyzováno celkem 199 vzorků pšenice pěstovaných na území Velké Británie. DON byl detekován ve 32 případech a to v rozsahu hodnot 20 – 400 µg/kg.

## Literatura:

- Aponyi, I., Nagy, G., Princzinger, G., Kajati, I. 1998: Fusarium infection of wheat seeds in Hungary between 1970 and 1997. *Cereal Research Communications* 26: 253-258.
- Bakan, B., Cahagnier, B., Melcion, D. 2001: Natural occurrence of Fusarium toxins in domestic wheat and corn harvested in 1996 and 1997- production of mycotoxin by Fusarium isolates from these symplex. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Basiński, T., Perkowski, J. 2002: Natural contamination of oat with deoxynivalenol and nivalenol in Poland. Proc. of the VIIth European Seminar „Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp 83.
- Bauer, G. 2000: Zur Analyse der Daten des Fusarium-Monitorings Bayern. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, *Bodenkultur und Pflanzenbau* 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.33-37.
- Beck, R., Lepschy, J. 2000: Ergebnisse aus dem Fusarium-Monitoring 1989-1999 – Einfluss der produktionstechnischen Faktoren Fruchtfolge und Bodenbearbeitung. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, *Bodenkultur und Pflanzenbau* 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.39-47.



- Beck, R. 2000: Einfluss von Lagerbedingungen auf die Keimfähigkeit und Verarbeitungsqualität von Winterweizen. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S 99-104.
- Bottalico, A. 1978: Indagine sulla presenza di zearalenone nelle cariossidi di frumento alla raccolta del 1976, in Italia. *Phytopath. Medit.*, 17: 139-140.
- Bottalico, A., Logrieco, A. 2001: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L., Steiner, B., Ruckenbauer, P. 2002: Molecular mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. *Petria* 12, (1/2) 2002, 21-24.
- Caló, L., Fornelli, F., Nenna, S., Marrone, D., Tursi, A., Filomena, C.M., Macchia, L. 2002: Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9. Proc. of the VIIth European Seminar „*Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity*“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland. pp.27 – 28.
- Corazza, L., Balmas, V., Sanatori, A., Vitale, S., Luongo, L., Maccaroni, M. 2002: Head blight and foot rot of wheat in Italy. *Petria* 12, (1/2) 2002, 25-36.
- Eder, J. 2000: Die Entwicklung der Maisanbauflächen in Bayern und in der Bundesrepublik Deutschland. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.9-10.
- Edwards, S. 2002: Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK wheat production. Proc. of the VIIth European Seminar „*Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity*“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.30.
- Ellner, F. M. 2001: Levels of mycotoxins in cereals of various regions of Germany in the 1998 harvest. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Gilbert, J. 2002: Effects of *Fusarium graminearum* infection of wheat seed. *Petria* 12, (1/2) 2002, 43-50.
- Hartl, L., Bürstmayr, H., Schweizer, G., Zimmermann, G. 2000: Molekulargenetische Analysen zur Charakterisierung der *Fusarium*-Resistenz bei Weizen. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.75-79.
- Hornok, L., Toth, A. 2001: Reports on the natural occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Hungary between 1990-1999. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Chelkowski, J., Perkowski, J., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Kostecki, M., Golinski, P. 2001: Toxigenic fungi and mycotoxins in cereals grains and feeds in Poland. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Kestemont, M. H., Donis, T., Chandelier, A., Cavelier, M. 2002: Occurrence of head blight agents and deoxynivalenol in Belgian wheat. Proc. of the VIIth European Seminar „*Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity*“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.98.
- Kryuchkova, L., Dragovoz, I., Yavorska, V. 2002: *Fusarium* ear blight of wheat in Ukraine. Proc. of the VIIth European Seminar „*Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity*“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.100.
- Kuhlmann, I., Valenta, H., Goll, M., Oldenburg, E., Flachowsky, G. 2001: Incidence of moulds and mycotoxins in cereals from the German regions Thuringia a Sachsen-Anhalt in 1996. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- L'vova, L.S., Kotlinko, O.L., Shulgina, A.P., Omelchenko, M.D., Zakharova, L.P., Piminova, V.V., Gagkaeva, T.Yu. 1997: Peculiarities of deoxynivalenol and zearalenon synthesis in wheat grain infected by fusariosis of spike. *Mycology and Phytopathology*, 31,6: 52-58 (in Russia).



- Langseth, W., Elen, O., Rundberget, T. 2001: Occurrence of mycotoxins in Norwegian cereals 1988-1999. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Lengauer, E. 1977: Zur Stellung und Aktualität von Mykotoxinen in der heimischen Landwirtschaft. In: Aktuelle Probleme der landwirtschaftlichen Forschung. Veröffentlichungen der landwirtschaftlich-chemischen Bundesversuchsanstalt Linz, Bd. 11, 33-70.
- Lepschy, J. 2000: Die häufigsten Fusariumtoxine in Getreide – Analytik, Toxikologie, Grenzwerte. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.27-32.
- Levitin, M. 2001: Distribution and toxicology *Fusarium* species on cereals in Russia. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Levitin, M.M., Ivaschenko, V.G., Shipilova, N.P., Gagkaeva, T. Yu. 1994: *Fusarium* head blight of cereals and problems of breeding for resistance. *Plant Sci.*, 31,4:7-10, 158-160.
- Lew, H., Adler, A., Thimm, N., Krska, R., Widner, G., Schulz, M. 2001: Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in Austria. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Macchia, L., Caiaffa, M., Fornelli, F., Caló, L., Marrone, D., Nenna, S., Moretti, A., Logrieco, A., Tursi, A. 2002: Apoptosis induced by the *Fusarium* mycotoxin beauvericin in mammalian cells. Proc. of the VI<sup>th</sup> European Seminar „*Fusarium* – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland. pp.31.
- Nicholson, P., Carter, J.P., Chandler, E., Simpson, S. 2002: Pathogenicity and genetic diversity in *Fusarium graminearum* and relationship to nivalenol and deoxynivalenol. Proc. of the VII<sup>th</sup> European Seminar „*Fusarium* – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.18.
- Obst, A., Bechtel, A. 2000: Witterungsvoraussetzungen für den Ährenbefall des Weizens mit *Fusarium graminearum*. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S. 81 -88.
- Obst, A., Fuchs, H. 2000: Der *Fusarium*-Besatz bei Winter- und Sommergetreide – Untersuchungsergebnisse von Saatgetreidestichproben aus Bayern 1987-99. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S. 21 – 25.
- Obst, A., Gammel, P. 2000: Fungicide gegen den Ährenparasiten *Fusarium graminearum*. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S. 89-98.
- P. Jennings 2001: Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereal grain in the UK. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Pascale, M., Bottalico, A., Pancaldi, D., Perrone, G., Visconti, A. 2002: Occurrence of deoxynivalenol in cereals from experimental fields in different Italian regions. *Petria* 12, (1/2) 2002, 123-129.
- Pettersson, H., Aberg, L. 2002: Rapid estimation of deoxynivalenol and *Fusarium* by near infrared spectroscopy. Proc. of the VII<sup>th</sup> European Seminar „*Fusarium* – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.34.
- Rintelen, J. 2000: Erste Untersuchungen in den Jahren 1982 bis 1989 zum Befall von Futtergetreide, Mais, Hafer- und Weizenkörnern mit *Fusarium*. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, Bodenkultur und Pflanzenbau 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.15-20.

- Rintelen, J. 2000: Ist das starke Auftreten von *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) an Getreideähren auf die Zunahme des Maisbaus zurückzuführen? Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, *Bodenkultur und Pflanzenbau* 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.11-13.
- Rizzo, A., Berg, S., Eskola, M., Perttilä, U., Saari, L. 2001: Occurrence of mycotoxins in cereals and foodstuffs in Finland between years 1987 -1999. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Schaafsma, A.W., Hooker, D.C., Tamburic, L. 2002: Using weather variables pre-and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. Proc. of the VIIth European Seminar „Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.111.
- Stack, R. 2002: Variability in the interaction between visually scabby kernels and DON in spring wheat infected with *Fusarium* head blight. Proc. of the VIIth European Seminar „Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.104.
- Šrobárová, A. 2001: *Fusarium* spp. on cereals in Slovakia. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, COST Action 835, EUR 19695.
- Tekauz, A. 2002: *Fusarium* head blight of oat in Western Canada – Preliminary studies on the *Fusarium* species involved and levels of mycotoxin(s) in grain. Proc. of the VIIth European Seminar „Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp. 41.
- Tuteljan, V. 1995: Medical-biological requirements to quality and safety of grain products and bread-loaf goods. *J. The bread baking in Russia*, 2:17-19 (in Russia).
- Visconti, A., Pascale, A., Sarzi Amade, P.L. 1997: Impiego di minicolonne ad immunoaffinità nell'analisi di deossinivalenolo (vomitossina) in campioni di frumento. *Boll. Chim. Igien.*, 48: 127-131.
- Visconti, A., Pascale, A. 1998: Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 815: 133-140.
- Waalwijk, C. 2002: *Fusarium* species on Wheat in the Netherlands: Inventory and molecular identification. Proc. of the VIIth European Seminar „Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp. 24-25.
- Wosnitza, A. 2000: Verbesserung der *Fusarium*-Resistenz-Bewertung bei Weizen. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, *Bodenkultur und Pflanzenbau* 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S.59-74.
- Yli-Mattila, T., Paavanen – Huhtala, S., Parrika, P., Konstantinova, P., Gagkaeva, T., Eskola, M., Jestoi, M., Rizzo, A. 2002: Occurrence of *Fusarium* fungi and their toxins in Finnish cereals in 1998 and 2000. Proc. of the VIIth European Seminar „Fusarium – Mycotoxin, Taxonomy and Pathogenicity“, WG-4 COST 735 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Sept. 4-7, 2002, Poznan, Poland., pp.42-43.
- Zimmermann, G. 2000: Nutzung der genetischen Resistenz zur Eindämmung von *Fusarium*-Ährenkrankheiten bei Weizen. Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbund, *Bodenkultur und Pflanzenbau* 3/00, 4.Jahrgang, ISBN 1433-3155, S. 49 – 55.

## 4. Kontaminace siláží mykotoxiny

Nedělník, J.

V textu používané zkratky: deoxynivalenol – DON, nivalenol – NIV, T-2 toxin – T-2, HT-2 toxin – HT-2, zearalenone – ZEA, fumonisiny – FUM, moniliformin – MON, aflatoxiny – AFL, ochratoxin A - OTA

V návaznosti na rešeršní studii s názvem „Mykotoxiny, jejich výskyt v surovinách, produktech a krmivech rostlinného původu – rešerše aktuálních poznatků“ vypracovanou v roce 2002 byla v letošním roce pozornost zaměřena na shrnutí aktuálního stavu poznatků o mykotoxinové kontaminaci především kukuřičných siláží jako hlavního krmiva pro přežvýkavce. Práce je členěna do tří částí: úvod do problematiky a rešerše současných poznatků, výsledky analýz kukuřičných siláží a dalších objemných krmiv v ČR v letech 2000-2002 a v poslední části jsou uvedeny některé metodické poznámky k odběru vzorků a vlastnímu analytickému postupu.

### 4.1. Mykotoxiny

V poslední době se stále více objevuje v popředí zájmu odborné i laické veřejnosti problematika mykotoxinů spojená především s potenciálním ohrožením zdraví lidí a hospodářských zvířat. Mykotoxiny jsou definovány jako nízkomolekulární sekundárně metabolické produkty houbových organismů, toxické pro rostliny i teplokrevné živočichy včetně člověka. Z hlediska historické posloupnosti poznávání účinku těchto látek lze mykotoxiny zařadit do několika hlavních skupin: alkaloidy produkované houbou *Claviceps purpurea*, aflatoxiny, ochratoxin, trichothecény a fumonisiny.

#### Ergotoxin, ergotamin

Prvními popsány mykotoxiny byly produkty houby *Claviceps purpurea* nazvané později ergotoxin a ergotamin. Tyto alkaloidy, které v malém množství jsou lékem, jsou i poměrně silnými jedy. Jejich konzumace může končit i smrtí. Vzhledem k okruhu hostitelských rostlin se s těmito látkami při kontaminaci siláží prakticky nesetkáme.

#### Aflatoxiny

Dosud nejintenzivněji studovanými byly toxické metabolity aflatoxiny a ochratoxin produkované rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Aflatoxiny jsou typickými toxiny kontaminujícími suroviny produkované v tropických a subtropických regionech. Jsou produkovány určitými druhy *Aspergillus* a nalézají se na různých nezpracovaných výrobcích, jako například obilniny, dehydratované ovoce, koření, fíky, sušené ovoce apod. Mezi více než dvaceti známými typy aflatoxinů se v potravinách nalézají hlavně čtyři sloučeniny (aflatoxiny B1, B2, G1 a G2). Odvozené aflatoxiny se mohou nacházet také v mléku a v mléčných výrobcích (aflatoxiny M1 a M2). Tyto odvozeniny jsou produkovány v procesu trávení přežvýkavci, kteří jsou krmeni kontaminovanými krmivy. V podmínkách České republiky jsou tyto mykotoxiny zjišťovány v surovinách z dovozu a dále při kontaminaci skladovaných produktů včetně siláží.

#### Ochratoxin A

Obdobně je významným toxinem produkovaným tzv. skladovými plísněmi i ochratoxin A. Jeho výskyt je zaznamenáván v některých evropských i mimoevropských regionech (západní Evropa, Kanada a některé oblasti v Jižní Americe), kde je tvořen druhem *Penicillium verrucosum*, plísní, která se často tvoří během skladování obilnin. Dalším druhem velmi často izolovaným ze siláží je *P. roqueforti*.

#### Fusariotoxiny

Vedle výše uvedených toxinů jsou stále aktuálnější i toxické látky produkované rodem *Fusarium*. V současné době publikované údaje uvádí, že ze 61 druhů *Fusarium spp.*, které byly izolovány z různých rostlinných druhů a surovin pro výrobu potravin, byla u 35 prokázána schopnost v laboratorních podmínkách produkovat sekundární toxické metabolity. Celkový počet dosud popsáných sekundárně-metabolických sloučenin u rodu *Fusarium* se blíží k číslu 150.

Historicky první zmínky o akutních a chronických mykotoxikozách lidí a hospodářských zvířat souvisejících s konzumací obilnin kontaminovaných druhu *Fusarium* jsou staré více než 100 let. Historická a epidemiologická data indikují mnohé další souvislosti mezi častými epidemiemi chorob a konzumací zrnin infikovaných těmito houbami. Jsou známy případy alimentární toxické aleukie, celé řady nemocí jako např. anemií, imunosupresí, krvácení, abortace plodů apod. z mnoha zemí světa. K dispozici je velké množství vědeckých publikací a monografií věnovaných těmto problémům.

Hlavními skupinami mykotoxinů produkovaných *Fusarium spp.* jsou látky známé pod triviálními názvy trichothecény, zearalenon, fumonisiny a kyselina fusarová.

**Trichothecény** jsou skupina toxických sloučenin sesquiterpenoidní struktury, jež inhibují syntézu eukaryotických enzymů. Způsobují některé mykotoxikózy hospodářských zvířat a jsou považovány za látky odpovědné i za některé choroby člověka jako je např. alimentární toxická aleukie nebo Akakabi nemoc v Japonsku. Ze souboru trichothecénových derivátů jsou jako kontaminanty rostlinných produktů nejdůležitější T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol (syn. vomitoxin), nivalenol, diacetoxyscirpenol a několik dalších.

Druhou skupinou toxických sloučenin je **zearalenon** a jeho deriváty. Jedná se o látky se silným estrogením účinkem spojeným s poruchami fertility u hospodářských zvířat.

Z *Fusarium moniliforme* získaného z kukuřice určené pro lidský konzum v Jižní Africe byly izolovány toxiny s karcinogenními a hepatotoxickými účinky, které byly označeny jako **fumonisin**. Fumonisin mohou vyvolávat akutní toxikózy domácích zvířat (např. koňská leukoencephalomalasia, plicní edémy apod.). Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny Světové zdravotnické organizace (IARC-WHO) jsou klasifikovány jako možné karcinogeny pro člověka (třída 2B). Fumonisin jsou strukturálně podobné sfingosinu a mohou uplatnit svou biologickou aktivitu v blokaci klíčových enzymů biosyntézy sfingolipidů.

Často opomíjeným toxinem produkovaným *Fusarium spp.* je **kyselina fusarová**. Toxicita této látky pro teplokrevné živočichy je ve srovnání s trichothecény a fumonisiny podstatně nižší, ale nejnovější experimenty prokázaly, že tato látka zesiluje toxické účinky ostatních fusariotoxinů. Tento toxikologický synergismus může být do určité míry vysvětlen skutečností, že zkrmování přirozeně kontaminovaného krmiva má mnohdy výrazně vyšší negativní účinky na konzumenta, než zkrmování krmiva uměle kontaminovaného shodným toxinem.

## 4.2. Siláže

V souladu s cílem zajistit dobrý zdravotní stav a výkon zvířat, je základem produkovat siláže s vysokou výživnou hodnotou a dobrou hygienickou kvalitou. Nehledě na kontaminaci siláží nežádoucími nebo patogenními mikroorganismy, např. *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* nebo *Escherichia coli* (Woolford 1990, Fenlon a Wilson 2000, Tylin 2000) je výskyt vláknitých hub a jejich sekundárních toxických metabolitů (mykotoxiny) dalším významným faktorem podmiňujícím v mnoha případech horší výkon a zdravotní potíže dobytka (Nibbelink 1986, Dieckman a Green 1992, Diaz a Boermans 1994, Bauer 2002). Zároveň je ale nutné konstatovat, že ve srovnání s obilovinami či proteinovými krmnými materiály je úroveň znalostí o těchto mikroorganismech a jejich metabolitech v silážích a jejich efektech na zdravotní stav zvířat a kvalitu živočišných produktů stále nízká (Scudamore a Livesey 1998). Skupina vláknitých mikromycet (mnohdy v literatuře označovaných jako plísně), se kterými se můžeme setkat v souvislosti se silážemi je tvořena rozmanitou skupinou rodů a druhů, které jsou všudypřítomné v přírodě a existují jako saprofyty nebo rostlinné patogeny. Rody *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* a *Aspergillus* jsou v této souvislosti považovány za nejfrekventovanější (Lacey a Magan 1991, Auerbach a Geissler 1992, Miller 1995, Scott 2001).

Největší pozornost výzkumu byla zaměřena na aflatoxiny, ochratoxiny, trichothecény, fumonisiny a zearalenony. Mykotoxiny vykazují mnoho rozličných biologických efektů na zvířata. Mohou být karcinogenní, teratogenní, genotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické, hematotoxické, imunosupresivní, estrogení, tremorgení nebo mutagení (Trenholm 1997, Dirheimer 1998, Oswald a Comera 1998, Parent-Massin a Parchment 1998, Riley a kol. 1998, Shier 1998). Ačkoliv je dobře zjištěno, že významná část celosvětových obilných sklizní je každoročně ovlivňována mykotoxiny a vede k ekonomickým ztrátám, kontaminace píce a siláží toxickými houbovými metabolity byla dlouho ignorována (Smith a kol. 1993). Proto i tato rešerše se snaží shrnout dostupné informace o faktorech ovlivňujících tvorbu a přítomnost mykotoxinů v silážích.



#### 4.2.1. Vlákňité houby a mykotoxiny v silážích

##### Primární kontaminace

Velká část mykotoxinů analyz. v silážích je produkována již během vegetace před sklizní a uskladněním. Patogenní mikroorganismy, především zástupci rodu *Fusarium* byly izolovány ze všech částí rostlin. Způsobují poškozování vzcházejících rostlin, vyvolávají hnilobu stébel a palice a v neposlední řadě také poškození zrn. Houby pronikají do hostitelských pletiv přes kořen, stonek, listy a palice nebo také prostřednictvím vektorů, např. nematod. Podle nejnovějších poznatků jsou listy a stébla častěji a více zatíženy než palice.

V průběh fytopatogenního procesu dochází ke kontaminaci hostitelských rostlin mykotoxiny, které jsou v tomto období již detekovatelné. Obsah mykotoxinů narůstá v posledních pěti až šesti týdnech před silážní zralostí, přičemž napadení je častější na odumřelých pletivech. Experimenty naznačují, že hybridy kukuřice s rychlejším dozráváním zbytku rostliny vykazují vyšší obsah mykotoxinů. Maximální úrovně obsahu toxinů jsou zaznamenávány v období sklizně a dále se významněji nemění.

Výskyt mykotoxinů produkovaných *Fusarium spp.* na kukuřici je popsán z celé řady světových regionů. Informace o celosvětové kontaminaci obilnin včetně kukuřice publikovali japonští autoři. Průzkum v 19 zemích prokázal závažnost mykotoxinů *Fusarium spp.* i jejich celosvětovou rozšířenost. Z celkového množství 500 vzorků bylo např. 244 nivalenol pozitivních, 223 deoxynivalenol pozitivních a 219 zearalenon pozitivních. Podrobné údaje o kontaminaci cereálních potravin ze vzorků získaných v letech 1997-1998 v obchodní síti v Německu byly publikovány v roce 1998. Nejvyšší míra kontaminace byla u výrobků z kukuřice, např. maximální koncentrace deoxynivalenolu byla 910 µg/kg, u fumonisinů dokonce 2600 µg/kg. Ve Velké Británii, kde je roční spotřeba kukuřice přes 1,6 milionů tun a přitom většina tohoto množství se dováží jak z kontinentální Evropy, tak zámorí, provedli rozbory 140 vzorků surové kukuřice na obsah mj. zearalenonu a fumonisinů. Oba typy sloučenin byly zjištěny téměř ve všech vzorcích, přičemž 41,7% vzorků kukuřice obsahovalo více než 100 µg/kg zearalenonu a 48% vzorků více než 1000 µg/kg celkových fumonisinů. Prvotním čištěním surové kukuřice se snížil obsah celkových toxinů o 32 %. Potraviny vyrobené z kukuřice byly analyzovány na přítomnost fumonisinů také v USA s maximálními koncentracemi až 7450 µg/kg. Kukuřičná zrna byla obecně kontaminována detekovatelnými hladinami deoxynivalenolu i při výzkumu na Novém Zélandu, Korei i v celé řadě dalších regionů. Přirozený výskyt mykotoxinů *Fusarium spp.* byl zaznamenán i v Číně v oblastech označených za vysoce rizikové pro výskyt rakoviny jícnu. Protože většina siláží je tvořena z celých rostlin (např. celé rostliny kukuřice a celé rostliny obilnin), infekce jakékoliv části rostliny může vést ke kontaminaci dané siláže mykotoxiny.

Oldenburg (1999) shrnul dostupná data o výskytu mykotoxinů v pícninách. Některé trichothece (např. DON a ZEA) byly nalezeny v travách v koncentracích přibližně 2 mg/kg. Silážní kukuřice také obsahovala DON a ZEA v různém množství, a to v rozpětí od 0,005 do 13,75 mg/kg DM. Incidence těchto mykotoxinů a jejich koncentrace byly zřetelně ovlivněny analyzovanou částí rostliny. Bylo zajímavé, že palice obsahovaly méně ZEA a v nižších koncentracích ve srovnání se stonky. Oldenburg (1996) zaznamenal statisticky významnou korelaci mezi úrovní sušiny při sklizni a obsahem ZEA. U silážní kukuřice byla zaznamenána také přítomnost OTA před sklizní (Oldenburg 1991). Toxinogenní *Alternaria* reprezentují často se vyskytující houbový rod na silážní kukuřici, hlavně na listech a obalech klasů (Muller 1991, Muller 1992), přítomnost jejich toxinů je také pravděpodobná.

Gotlieb (1997) shrnul výsledky mnoha studií v USA, indikujících vysokou incidenci DON v silážích na úrovni až kolem 3 mg/kg. V Německu byly ZEA, DON a OTA nejčastěji izolovány ze siláží vyrobených z celých rostlin kukuřice (Kampfe 1999). Koncentrace v silážích se pohybovala mezi 33 a 51 ppb u ZEA, 673-4297 ppb u DON a 17-37 ppb u OTA. Přezkoumání provedené Oldenburgem (1999) odhalilo, že travní a kukuřičné siláže mohou být kontaminovány množstvím trichothece a zearalenonem. Obsahy mykotoxinů byly zaznamenány v nižším rozptylu.

Whitlow a Hagler (2002) analyzovali kukuřičné siláže z farem v Severní Karolíně a prokázali celou řadu toxických houbových metabolitů. Střední koncentrace pro AFL, DON, ZEA a T-2 toxin byly 28 ppb, 525 ppb, 1991 ppb, resp. 569 ppb. Často byly také nalezeny fumonisin. Kukuřičné siláže z Mexika byly kontaminovány aflatoxiny v koncentracích mezi 500 a 5000 ppb (Rosiles 1978).

Patologické změny a tvorba mykotoxinů v rostlinách před sklizní je nejpravděpodobnějším vysvětlením pro kontaminaci siláží toxiny, protože druhy produkující toxiny jsou poměrně rychle během počátečních fází fermentace nahrazovány charakteristickou silážní mikroflórou.



#### **4.2.2. Změny v obsahu mykotoxinů pocházejících z primární kontaminace během fermentace**

Změny mykotoxinů pocházejících z fytopatogenního procesu v procesu silážování nejsou stále zcela objasněny. Nicméně je prokázáno, že většina těchto metabolitů vykazuje vysokou stabilitu v silně kyselém prostředí (Muller 1983). V průběhu fermentace kukuřičné siláže nebyl pozorován pokles koncentrací ZEA a DON (Lepom a kol. 1988, Lepom a kol. 1990). V sérii laboratorních pokusů se silážováním trav a kukuřice, Oldenburg nenašel žádný podstatný efekt fermentace na obsah DON. Spodní hranice koncentrace pro tento mykotoxin byla 570 ppb, a po prodloužené době fermentace byla zjištěna průměrná koncentrace DON 620 ppb. Lindenfelser a Ciegler (1970) studovali změny v obsahu aflatoxinů během silážování a našli jen malé nebo vůbec žádné snížení koncentrace obsahu těchto látek po 26 dnech skladování. Neúčinnost aflatoxinů popisovaná některými autory může být vysvětlena působením organických, především mléčných kyselin. Účinek byl silně závislý na koncentraci a periodách použití.

#### **4.2.3. Dynamika růstu hub během fermentace a po otevření siláží**

Růst vláknitých hub (plísňí) je determinován a ovlivňován množstvím faktorů, které ovlivňují konečné složení mykoflóry siláží. Nejdůležitější faktory jsou teplota, složení atmosféry, vlastnosti substrátů zahrnující aktuální vlhkost, vodní aktivitu, pH a chemické složení, stejně jako biotické faktory (přítomnost hmyzu, obratlovců a ostatních mikroorganismů) (Ramakrishna a kol. 1993, Ominski a kol. 1994).

Jak uvádějí Jonsson a Pahlow (1984) nebo Chiunjian a kol. (1992), populace vláknitých hub prodělávají nepřetržité významné změny mezi obdobími vegetace před silážováním až po otevření hotové siláže. Během vegetace je mykoflora kukuřice reprezentována hlavně druhy rodů *Fusarium*, *Cladosporium* a *Alternaria*, ale také některými zástupci tzv. „skladištních plísňí“ jako jsou *Penicillium* a *Aspergillus* (Niles 1980, Muller 1991; Auerbach a Geissler 1992, Miller 1995). Stejně jako ve změně mykoflóry během prvních fází silážování hraje dostupnost kyslíku. Jakmile se v počáteční fázi fermentace vytvoří anaerobní prostředí *Fusarium spp.* nemohou delší dobu přežít (Damaglou a kol. 1984, Lepom a kol. 1988). Stejně tak brzy odumírají *Alternaria spp.* a *Cladosporium spp.* Je tedy zřejmé, že případné opožděné uzavření siláže může mít za následek vzrůst počtu houbových propagujících v silážích v počátečních fázích uskladnění (Mills a Kung 2002).

Podle Pelhata (1977), který klasifikoval vláknité houby v silážích na základě jejich tolerance k deficitu kyslíku, druhy rodu *Fusarium* jsou přísně aerobní. Mezi tolerantní plísně řadí *A. fumigatus*, některé *Mucorales* a *Penicillium* stejně jako *Monascus ruber*. Některé další druhy např. rodu *Mucor* nebo *Penicillium varioti* a *P. roqueforti* jsou považovány za indiferentní ve vztahu k přítomnosti kyslíku.

V sériích pokusů na rostlinách kukuřice Auerbach a kol. (2000) ukázal pokračující snižování počtu nativních houbových propagulí, když byl materiál od začátku uskladněn v anaerobních podmínkách. Přístup vzduchu v počátečních fázích fermentace měl za následek růst některých druhů plísňí dříve než jejich počet začal klesat. Jediným druhem vláknitých hub nalezeným v životaschopném stavu i po 60 dnech uskladnění byl *P. roqueforti*. Na druhou stranu, permanentní přítomnost kyslíku nesnížila během celého zkušebního období množství hub.

Dalším faktorem ovlivňujícím sukcesi mikroorganismů během fermentace jsou změny pH způsobené přirozenou produkcí organických kyselin (mléčná, propionová aj.). Ačkoliv úroveň pH per se zřejmě neovlivňuje vláknité houby, které mohou růst nebo zůstat v latentní fázi při širokém rozpětí pH od 3 do 8, kolísání mezi těmito hodnotami může mít vliv na jejich citlivost vůči ostatním okolním faktorům (Lacey 1989). Odolnost houbových struktur vůči organickým kyselinám je rozdílná mezi rody a druhy (Fencl a Leopold 1957, Muller a kol. 1981). Mléčná kyselina nemá většinou žádné negativní účinky na rozdíl od kyseliny propionové, která je možným inhibitorem plísňí. Konidie *P. roqueforti* se ukázaly jako méně narušitelné touto kyselinou než ostatní *Penicillium spp.* nebo *Aspergillus spp.* (Poisson a Cahagnier 1973).

Nicméně je to pouze pH-závislost na nedisociovaných formách organických kyselin, které jsou schopny pasivně penetrovat do buněčných struktur (hyfy, konidie). Stupeň disociace klesá zároveň s klesajícím pH (Luck 1985). Výzkumy provedené Auerbachem (2000) naznačily signifikantní negativní korelaci mezi obsahem nedisociovaných kyselin a počtem propagujících *P. roqueforti* na konci anaerobního skladování.

Růst vláknitých hub je možný také během odebrání krmiva, kdy je siláž znovu okysličována. Kyslík umožňuje růst vláknitých hub, jestliže ostatní faktory, jako jsou teplota, obsah antimykotických organických kyselin, složení substrátu a konkurenční organismy neomezují jejich vývoj. Všechny micro-aerofilní druhy mají tu výhodu, že se mohou začít prudce množit při nízkých koncentracích kyslíku a relativně vysokých koncentracích oxidu uhličitého. Experimentálně bylo prokázáno, že např. *P. roqueforti* potřebuje pro růst minimální koncentraci kyslíku 4,2%, pokud koncentrace CO<sub>2</sub> nedosahuje 80% (Moreau 1981).

#### 4.2.4. Mykoflora hotových siláží

Pelhate (1975,1977) analyzoval mykoflóru ze 1230 vzorků hotových kukuřičných siláží z francouzských a italských farem a izoloval téměř 70 druhů hub. *P. roqueforti* byla nicméně dominantní plísní, nalezena v 76% vzorků. Výskyt rodů *Monascus*, *Aspergillus*, *Byssosclamyces* a *Paecilomyces* byl 31%, 21%, 41%, respektive 27%. Hojně byly také zastoupeny *Mucoraceae*. Srovnatelné výsledky publikoval Escoula a kol. (1972).

Veselý a kol. (1981) zkoumali rozšíření *P. roqueforti* v silážích v České republice, zvláště během zimní krmné sezóny. Tato vláknitá houba byla dominantní i v japonských podmínkách (Nakane 1946, Tubaki 1956, Ohomo a Kitamoto 1994). Další studie (Gedek a kol., 1981) zahrnuje 260 faremních siláží v Německu a ukazuje vysoký stupeň kontaminace *P. roqueforti* a *A. fumigatus*. Tyto druhy byly nalezeny u 71,3%, respektive 13,3% vzorků. Další autor studoval složení mykoflóry kukuřičných siláží (celé rostliny kukuřice a kukuřičný mix) v jižním Německu a zjistil, že nejhojněji se vyskytujícím druhem byl opět *P. roqueforti*. Frevel a kol. (1985), také v Německu, zjistil přítomnost *P. roqueforti* u 38.8% z testovaných siláží. *Mucor* a *Absidia* byly izolovány z 36.4% vzorků.

Mykologické rozbory vzorků z 98 travních siláží a 135 kukuřičných siláží shromážděných během let 1997 a 1998 v jižním Německu prokázaly také dominanci tří hlavních druhů. *P. roqueforti* byl objeven ve 30% vzorků a *M. ruber* a *A. fumigatus* byly přítomny v 19% a 9% siláží (Shneweis a kol. 2000). Jiný výzkum zabývající se složením mykoflóry v silážích v jižním Německu ukázal rozšíření *P. roqueforti*, která byla izolována ve 27% vzorků. Druhy s menším výskytem byly *Rhizopus nigricans*, *A. fumigatus* a *M. ruber*.

V Rakousku bylo ve vzorcích 455 travních a kukuřičných siláží analyzováno spektrum vláknitých hub, převládalo v 53.6% *P. roqueforti*, *B. nivea*, *A. glaucus* a *M. ruber* (Adler 1993). Výskyt *A. fumigatus* je běžně hlášen ze siláží ve Spojených státech a může se vyskytovat zvláště ve vyšších vrstvách siláže (Dutkiewicz a kol. 1989). V Indii mykologické výzkumy krmiv včetně siláží ukázaly, že druhy *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*) činí kolem 19.3% všech izolovaných hub. Zbývající části mykoflóry jsou nicméně stále málo popsány (Mor a Singh 2000).

Proměnlivé výsledky výzkumu mykoflóry v silážích, s ohledem na přítomnost, četnost a dominanci určitých druhů hub, mohou být připisovány mnoha faktorům. Vliv mohou mít metody používané pro laboratorní analýzy vláknitých hub. Pelhate (1977) poukázal na to, že inkubace v anaerobním nebo aerobním prostředí ovlivňuje rozsah pěstovaných druhů. Teplota a složení růstových medií hraje také důležitou roli (Jarvis a kol. 1983, Skaar a Stenwig 1996).

Výsledky také naznačují, že populace hub se mohou lišit podle typu siláže. Frevel a kol. (1985) zaznamenal více rozdílnou mykoflóru v travních silážích než v kukuřičných. Armbruster (1994) prokázal, že obecně převládající *Penicillium spp.* bylo zřetelně méně často se vyskytující, když byly zároveň přítomny druhy *Monascus*. Autor spojuje tyto nálezy s produkcí inhibičních látek, které produkuje *Monascus*, která zatím nicméně nebyly určena. Odběr vzorků, vzorkovací místo (na povrchu nebo v nižších vrstvách, průřez), vizuální vzezření vzorků (viditelná plesnivost) stejně jako stupeň aerobního zhoršení sou dalšími příčinami rozdílností dat v literatuře.

#### 4.2.5. Formování mykotoxinů v silážích

Zjištění vláknitých hub v silážích není definitivním důkazem přítomnosti mykotoxinů. Stejně jako u výše popisovaného růstu hub, je také formování mykotoxinů ovlivňováno množstvím faktorů prostředí (Lacey a Magan 1991, Ramos a kol., 1998). Stejně jako všechny druhy daných rodů plísní nejsou schopné tvořit

mykotoxiny, tak vývoj toxigenních druhů v silážích je předpokladem pro produkci toxických metabolitů v těchto krmivech. Ačkoli mykotoxiny formované in vitro v umělých podmínkách se ukazují být společnou charakteristikou mezi silážními plísněmi, opatrnost se zdá být na místě, zda-li tato schopnost byla pozorována in situ.

Výsledky získané pro druhy *Paecilomyces* z konzervovaných krmiv prokázaly, že některé druhy jsou toxinogenní. Z množství 26 izolátů jich bylo 21 schopno produkovat patulin (Hacking a Rosser 1981). Escoula a Henry (1975) potvrdili, že 6 z 10 druhů *B. nivea*, všechny 4 druhy *B. fulva* a 3 ze 6 druhů *P. varioti* vyprodukovaly v čistých kulturách byssochlamic kyselinu v různých koncentracích. Izoláty *P. verrucosum* získané ze siláží prokázaly toxigennický potenciál in vitro. 32.1% z 28 izolátů produkovalo penicillic kyselinu (Gedek a kol. 1981).

Ze 13 druhů toxigenních *A. fumigatus* pocházejících z fermentovaných krmiv 46,2% produkovalo zároveň fumitremorgen B a C, verruculogen a TR-2 toxin. Mimoto fumitremorgen C a TR-2 toxin byly zjištěny u 53.8% těchto izolátů (Gedek a kol. 1981). Cole a kol. (1977) identifikoval v přítomnosti *A. fumigatus* ze siláže několik mykotoxinů náležících ke skupině fumitremorgenů. Mezi 10 *A. flavus* získaných ze siláže jich 9 produkovalo kojic kyselinu a jeden produkoval cyclopiazonic a kojic kyseliny zároveň (Gedek a kol. 1981). V jiné studii, výskyt *A. flavus* a *A. parasiticus* produkujících aflatoxiny ze siláže byl stanoven na 9.1% respektive 18.2% (Mor a Singh 2000).

Když po otevření siláže pronikne vzduch, růst plísní a produkce mykotoxinů tím může být zahájena. Bylo prokázáno, že *P. roqueforti* a *A. fumigatus* v travních a kukuřičných silážích mohou formovat ve výrazných koncentracích roquefortine C stejně jako verruculogen a fumitremorgen B (Tuller a kol. 1995, Auerbach 1996). Je poskytnut důkaz, že produkce a vzrůst množství toxických metabolitů se liší podle substrátu (Olivigni a Bullermann 1977) a produkovaného mykotoxinu. Je velmi pravděpodobné, že typ dosažitelných uhlíkových zdrojů a jejich využitelnost může lépe podporovat růst *P. roqueforti* a formování roquefortine C v kukuřičných silážích ve srovnání s travní siláží. Tyto siláže mají často přebytek cukru a plísně rostou dvakrát rychleji na cukrech jako na produktech fermentace (Muck a Bolsen 1991, Pitt a kol. 1991).

Muller a Amend (1997) studovali nárůst mycophenolic kyseliny, patulinu, penicillic kyseliny a PR toxinu v kukuřičné siláži naočkované *P. roqueforti* během 160 dní aerobního skladování. Všechny mykotoxiny byly tvořeny v rozdílných koncentracích, přičemž dosahovaly nejvyšší úroveň 3.56 ppm u mycophenolic kyseliny, 15.1 ppm u patulinu, 3.06 ppm u penicillic kyseliny a 2.17 ppm u PR toxinu. Bylo zjištěno, že koncentrace mykotoxinů klesla pod hranici zaznamenanosti po prodloužené experimentální době. O chemických reakcích těchto sloučenin s ammonia, aminy, volnými aminokyselinami a enzymy obsahujícími skupiny sulfhydryl (SH) se diskutovalo jako o příčinách poklesu úrovně mykotoxinů, činiteli je nezjistitelnými používanými metodami (Wei a kol. 1973, Lieu a Bullermann 1978, Amend 1990). Vzájemné reakce mezi patulinem a kvasinkovou flórou jsou také zmiňovány jako potenciální příčiny poklesu koncentrace mykotoxinů v průběhu fermentace. Byl zde obrácený vztah mezi počtem kvasinek a hladinou patulinu (Dutton a kol. 1984).

Z 39 viditelně zaplísňených vzorků z kukuřičných siláží z jižního Německa jich 5 obsahovalo penicillic kyselinu v koncentraci 0.23-2.1 ppm a pět bylo kontaminováno 0.1-4.2 ppm mycophenolic kyselinou (Muller a Amend 1997). Adler (1993) testoval vzorky z rakouských faremních siláží na mycophenolic kyselinu a našel hodnoty do 80 ppm. Novější Schneweisova studie (2001) potvrdila široký výskyt mycophenolic kyseliny v komerčních silážích. Z celkem 233 travních a kukuřičných silážních vzorků jich 31.8% obsahovalo mykotoxin. Průměrná koncentrace byla 1.4 ppm, pohybující se mezi 0.02 ppm a 35 ppm. Výskyt roquefortinu C, sekundárního metabolitu *P. roqueforti*, v komerčních silážích přitahuje značnou pozornost. Adler (1993) determinoval roquefortine C do 5 ppm v těchto krmivech. Rozdíly mezi maximálním obsahem roquefortinu C mezi silážemi tvořenými z trav, kukuřičných klasů a celorostlinnými silážemi byly zaznamenány Armbrusterem (1994). Pohybovaly se mezi 0.099-0.58 ppm u travních siláží, 0.086-2.1 ppm u corn-cob-mix a 0.047-28.15 ppm u siláží z celých rostlin. Tyto nálezy byly potvrzeny Auerbach a kol. (1998). Schmerbauch a kol. (1999) našli roquefortine C pouze v několika málo balících siláže z trav. Nejvyšší hladina roquefortinu byla 0.35 mg/kg DM.



## 5. Výskyt mykotoxinů v silážích a krmivech v ČR

### 5.1. Kukuřičné siláže v letech 2001-2002 – případová studie

V posledních 2 letech se mykologický výzkumný tým ve Výzkumném ústavu pícninářském, spol. s r.o. Troubsko začal zabývat studiem výskytu mykotoxinů v kukuřičných silážích. Pro kontinuální sledování byly vybrány siláže ve třech podnicích jižní Moravy. V této studii jsou stručně zhodnoceny výsledky mykotoxinové kontaminace siláží krmených v roce 2002 a siláží v roce 2002 nově založených.

#### 1. Kukuřičné siláže krmené v roce 2002

Z otevřených silážních jam s kukuřičnou siláží byly z čela silážní stěny odebrány ve třech horizontálních úrovních vždy tři vzorky o průměrné hmotnosti 1,5 kg. Tento průměrný vzorek byl důkladně homogenizován, případně mechanicky upraven.

Aflatoxiny: ve srovnání s ostatními analyzovanými mykotoxiny byl obsah AFL nejnižší. Z třiceti testovaných vzorků mělo 15 nulový obsah tohoto toxinu. Maximální vyhodnocená koncentrace AFL: 0,0018 ppm.

Deoxynivalenol: koncentrace DON jsou oproti hodnotám aflatoxinu vyrovnanější. Žádný z testovaných vzorků nebyl vyhodnocen jako nulový, koncentrace DON ve vzorcích se pohybovala nejčastěji kolem hodnot 1 – 1,5 ppm. Maximální vyhodnocená koncentrace byla 2,3 ppm.

Fumonisin: z celkového počtu vzorků bylo osm negativních, u žádného z testovaných vzorků nepřekročila hodnota fumonisinu 1 ppm.

Zearalenon: koncentrace zearalenonu se u testovaných vzorků pohybovaly v širokém rozmezí do 0,6 ppm, což byla nejvyšší nakalibrovaná koncentrace standardu. V 16 vzorcích bylo naměřeno vyšší množství ZEA než 0,6 ppm. Žádný ze vzorků nebyl nulový.

#### Závěr:

Ze srovnání obsahů jednotlivých analyzovaných mykotoxinů vyplývá, že obecně byl nejméně detekován AFL, z fusariotoxinů bylo nejméně ZEA a nejvíce DON. Neprokázalo se, že nejvíce mykotoxinů bylo v horních vrstvách, srovnatelné obsahy těchto látek byly i ve střední a dolní vrstvě. Pokud jsou rostliny kukuřice napadeny *Fusarium* spp. již během vegetace a dojde během fytopatogenního procesu ke tvorbě mykotoxinů, jsou tyto obsaženy již v naskladněné hmotě a jsou proto analyzovány ve všech vrstvách profilu silážní jámy. V průběhu silážování se mohou obsahy těchto látek měnit, ale v žádném případě nedochází k jejich výraznému poklesu. V procesu silážování může dojít k druhotné kontaminaci především v závislosti na pečlivosti udusání a zakrytí naskladněné hmoty za účelem zabránění přístupu vzduchu a srážkové vody.

Z hlediska hodnocení jednotlivých podniků byla nejméně kvalitní siláž, která byla pouze oseta obilovinou a nebyla přikryta plachtou. Docházelo proto k poškození siláže klimatickými vlivy. Nekvalitní založení této siláže koresponduje s výsledky testů především u AFL.

#### 2. Kukuřičné siláže založené v roce 2002

Ve stejných zemědělských podnicích jako v předchozím textu byly v roce 2002 zahájeny odběry vzorků nově založených kukuřičných siláží. Pro experimenty byly vybrány podniky, kde jsou k dispozici odlišné silážovací prostory (klasická zapuštěná silážní jáma s betonovými stěnami, silážní jáma částečně zapuštěná v zemi s pevným dnem, silážní nadzemní žlab z prefabrikátů). První vzorek tvořila čerstvá kukuřičná řezanka před naskladněním do silážních žlabů, další odběry byly dělány vždy v intervalu 3-4 týdnů. Hlavním cílem těchto analýz, které budou pokračovat i v roce 2003, je pokusit se postihnout mj. dynamiku ve tvorbě mykotoxinů v průběhu procesu silážování.

Aflatoxin: vyhodnocené koncentrace aflatoxinu se vyznačovaly vysokou diferenciací. Ze všech třiceti testovaných vzorků mělo šestnáct vzorků nulový obsah tohoto toxinu. Maximální vyhodnocená koncentrace aflatoxinu 0,00975 ppm.

Deoxynivalenol: koncentrace DON byly oproti předcházejícím výsledkům poněkud vyrovnanější. Žádný z testovaných vzorků nebyl vyhodnocen jako nulový, koncentrace DON ve vzorcích se pohybovala nejčastěji kolem hodnot 0,25 – 0,35 ppm. Maximální vyhodnocená koncentrace: 1,1 ppm.



Fumonisy: u žádného z testovaných vzorků nepřekročila hodnota fumonisinu 1 ppm. Pouze 2 byly nulové.

Zearalenon: koncentrace zearalenonu se u testovaných vzorků pohybovaly v širokém rozmezí 0 – 0,6 ppm. Nulových vzorků bylo šest, dva vzorky obsahovaly 0,6 ppm ZEA.

#### Závěr

Ve všech podnicích již ve vzorcích čerstvě sklizené kukuřice určené pro silážování byly detekovány obsahy mykotoxinů. Výjimku tvoří aflatoxiny zachycené v čerstvé hmotě jen u jednoho podniku, navíc v nízké koncentraci. Fusariotoxiny byly zachyceny ve všech čerstvých vzorcích. Z hlediska celkového obsahu bylo relativně nejméně AFL a ZEA, DON a FUM byly detekovány ve vyšších koncentracích.

### 5.2. Mykotoxinová kontaminace růz. typů siláží – srovnání 2001-2003 (Nečasová, Nedělník, 2003)

Mykologická skupina ve Výzkumném ústavu pícninářském spol. s r.o Troubsko již delší dobu analyzuje mikrobiální, ale především mykotoxinovou kontaminaci různých typů siláží s využitím imunoenzymatických postupů na obsah některých mykotoxinů: **zearalenon (ZEA)**, **deoxynivalenol (DON)**, **T-2 toxin (T2)**, **fumonisy (FUM)** a **aflatoxiny (AFL)**.

Pro srovnání bylo vybráno 15 jetelotravních, 9 travních, 7 vojtěškových a 25 kukuřičných siláží kontinuálně odebíraných v letech 2001 až 2003 v zemědělských podnicích na jižní i severní Moravě. Analyzovány byly s využitím imunoenzymatických postupů: **zearalenon (ZEA)**, **deoxynivalenol (DON)**, **T-2 toxin (T2)**, **fumonisy (FUM)** a **aflatoxiny (AFL)**.

**Tab.1 - DON [ppm]**

	<b>počet nulových vzorků</b>	<b>rozpětí koncentrací</b>	<b>průměrná koncentrace</b>
travní siláže	-	0,59 – 2,65	1,15
vojtěškové siláže	-	0,18 – 1,5	0,2
jetelotravní siláže	-	0,13 – 2,86	1,9
kukuřičné siláže	-	0,373 – 2,79	2,4

**Tab.2 - T-2 [ppb]**

	<b>počet nulových vzorků</b>	<b>rozpětí koncentrací</b>	<b>průměrná koncentrace</b>
travní siláže	-	71 - 300	133
vojtěškové siláže	-	60 - 115	90
jetelotravní siláže	-	164 - 330	242
kukuřičné siláže	-	250 – 649,8	347

**Tab.3 - ZEA [ppb]**

	<b>počet nulových vzorků</b>	<b>rozpětí koncentrací</b>	<b>průměrná koncentrace</b>
travní siláže	-	30 - 150	93
vojtěškové siláže	-	23 - 1400	524
jetelotravní siláže	3	0 - 1450	480
kukuřičné siláže	-	25 - 1810	700

**Tab.4 - AFL [ppm]**

	<b>počet nulových vzorků</b>	<b>rozpětí koncentrací</b>	<b>průměrná koncentrace</b>
travní siláže	-	0,69 – 2,97	1,11
vojtěškové siláže	-	0,44 – 3,03	1,3
jetelotravní siláže	-	0,08 - 8	2,8
kukuřičné siláže	4	0 – 3,09	1,3

Tab. 5 - FUM [ppm]

	počet nulových vzorků	rozpětí koncentrací	průměrná koncentrace
travní siláže	-	0,05 – 1,4	0,76
vojtěškové siláže	2	0 – 0,6	0,25
jetelotravní siláže	1	0 – 0,7	0,34
kukuřičné siláže	-	0,05 – 1,05	0,51

Mykotoxiny jako produkty sekundárního metabolismu významným patogenních mikroorganismů byly detekovány ve všech typech analyzovaných siláží. Zjištěné koncentrace DON a T2 byly poměrně vyrovnané, koncentrace T2 byla ale na řádově nižší úrovni. U ZEA byly záchyty oproti předcházejícím dvěma toxinům méně vyrovnané.

Primárním zdrojem kontaminace je napadení hostitelských rostlin patogenními organismy již v průběhu vegetace. Během sklizňového a konzervačního procesu se již obsah mykotoxinů výrazněji nemění s výjimkou látek produkovaných *Aspergillus spp.* či *Penicillium spp.*, kdy v počátku skladování může ještě dojít k sekundární infekci a následné tvorbě těchto látek. Z hlediska spektra hostitelských rostlin byly nejvyšší průměrné koncentrace mykotoxinů zaznamenány u kukuřičných siláží, nejnižší obsahy byly obecně analyzovány především u vojtěškových siláží. Zajímavý je záchyt fumonisinů u travních siláží. Tento typ mykotoxinů byl zatím popisován především z kukuřice, zřejmě zde může existovat vazba mezi produkujícími druhy *Fusarium spp.* a jednoděložným typem hostitele.

### 5.3. Mykotoxiny v objemných krmivech – analýzy SVÚ Jihlava (Hanzlová, 2003)

Státní veterinární ústav v Jihlavě je akreditovaných pracovištěm pro analýzu vybraných mykotoxinů. V letech 2000-2002 analyzoval široké spektrum vzorků objemných krmiv na obsah DON, ZEA, T-2 a FUM. Z monitoringu krmiv na obsah DON vyplynulo, že např. v roce 2000 z 48 vzorků úsušků píce bylo 48 pozitivních s průměrným záchytem 1,61 mg/kg, u sena ze 3 vzorků byly 2 pozitivní s průměrem 0,35 mg/kg. V roce 2002 bylo analyzována na obsah DON mj. 7 vzorků kukuřičné siláže, všech 7 bylo tímto toxinem kontaminováno s průměrem 0,93 mg/kg. Při analýze obsahu ZEA bylo ze zmiňovaných 48 vzorků úsušků píce 44 pozitivních s průměrem 0,19 mg/kg, u kukuřičných siláží bylo opět všech 7 vzorků pozitivních s průměrným záchytem 1,01 mg/kg. U T-2 toxinu byla u kukuřičné siláže průměrná kontaminace 0,32 mg/kg. Na obsah těchto tří mykotoxinů byly kromě zmíněných objemných krmiv analyzovány také cukrovarnické řízky, šrot pšenice, řepky, vojtěšky, KS, pokrutiny apod.

### 5.4. Prevence

Pro zmírnění rizika rozvoje patogenní mikroflory a následné produkce mykotoxinů je možné doporučit:

- ◆ Výběr vhodného hybridu pro danou pěstitelskou oblast s adekvátním číslem FAO
- ◆ Vyrovnanou výživu
- ◆ Včasnou sklizeň v optimální silážní zralosti, nejčastěji ve stadiu 33-35% celkové sušiny
- ◆ Neprodlené silážování s dokonalým pořezáním na optimální velikost částic, maximálním utužením, vytěsněním vzduchu a neprodyšným uzavřením
- ◆ Aplikace vhodných probiotických přípravků

Znovu je třeba zdůraznit, že primární nebezpečí mykotoxikóz nespočívá v konzumaci viditelně kontaminovaných zemědělských produktů, ale spíše v konzumaci makroskopicky nepoškozených potravin či krmiv, kde již není patrná přítomnost houbových organismů, a přesto jsou kontaminovány mykotoxiny. Pozvolná a dlouhodobá akumulace mykotoxinů v buňkách a tkáních konzumenta je tím největším nebezpečím. Nebezpečí je o to větší, že mnohé mykotoxiny jsou látky vysoce termostabilní a ani tepelná sterilizace neinhibuje jejich účinnost. Navíc jako sloučeniny o nízké molekulové hmotnosti poměrně snadno ulpívají i v mikropórech např. skleněných obalů a tyto mohou být zdrojem další kontaminace. Při konzumaci nízkých dávek mykotoxinů může docházet ke zvýšenému nebezpečí sekundárních infekcí, selhávání účinnosti vakcín, zeslabení imunity apod.

Velký význam v boji proti mykotoxikózám mají preventivní opatření. Integrovaný systém pěstování polních plodin respektující nároky daného druhu na optimální stanoviště, výživu a další technologické vazby je jedním ze základních předpokladů zabraňujících kontaminaci houbovými patogenními organismy. Zcela na místě je v rámci technologie pěstování zařazení přiměřené fungicidní ochrany. V této souvislosti neobstojí často užívaný argument o nadměrném zatěžování životního prostředí pesticidy. Srovnáme-li LD 50 běžně užívaných fungicidů s hodnotami, kterých tento index dosahuje u mykotoxinů je zřejmé, že fungicidní látky jsou mnohdy méně toxické než mykotoxiny.

Mykologické a toxikologické rozbory zemědělských produktů a surovin by se měly stát součástí posklizňového procesu. U skladovaných produktů je to o to důležitější, že se zde může vytvářet vhodné mikroklima pro sekundární rozvoj houbových mikroorganismů. Riziko nadměrného růstu houbových mikroorganismů a následné tvorby mykotoxinů např. u skladovaných krmiv lze do určité míry snížit aplikací tzv. „protiplísňových“ přípravků. Hlavními součástmi uvedených přípravků jsou kyseliny a látky snižující korozivnost přípravku a naopak zlepšující mechanické vlastnosti krmiv. Nejčastěji se v těchto přípravcích objevuje kombinace organických kyselin a esenciálních olejů či jiných látek, které jsou účinné proti širokému spektru houbových organismů, zlepšují sypkost naskladněných krmiv a mají sníženou korozivnost. Pokud ale v dané komoditě (krmivu, siláži apod.) jsou již mykotoxiny přítomny, efekt těchto „protiplísňových“ přípravků je nulový. V této fázi musíme hovořit o možnostech vyvázání mykotoxinů, což je nepoměrně složitější.

Eliminace mykotoxinů, především v našich podmínkách nejrozšířenějších fusariotoxinů, je komplikována nízkou polaritou jejich molekul a tím i omezenou možností adsorpce, která je navíc málo stabilní. Na vyvazování mykotoxinů se donedávna používaly přípravky na bázi jílu, které selektivně adsorbují polární mykotoxiny (aflatoxiny, částečně ochratoxin). Adsorpční složkou jsou speciálně upravené aktivované hlinitokřemičitany s krystalickou strukturou. Velikost pórů v krystalické struktuře zajišťuje selektivitu účinku pouze na žádanou velikost molekul a rozmístění polárních skupin. Adsorpce je však možná pouze u molekul, které mají funkční polární skupiny. Adsorbované mykotoxiny nemohou být vstřebány přes střevní stěnu do krve, procházejí trávicím traktem zvířete a v trusu ven z těla.

V současnosti je do těchto přípravků inkorporována inaktivovaná biomasa *Sacharomyces cerevisiae* se zachovanou enzymatickou aktivitou esteráz a epoxidáz. Tyto enzymy degradují molekuly trichothecenu a zearalenonu na netoxické metabolity, které jsou opět vyloučeny přirozenou cestou ze zvířete. Tyto přípravky se míchají do krmiva jako prevence. Aplikace např. do silážované hmoty se zatím neprovádí.

Biodegradace mykotoxinů mikroorganismy je popisována často (Smith a Harran 1993). Nicméně degradace mykotoxinů během silážování je stále příčinou spekulací. Bohm a kol. (1999) opatřili důkaz, že NIV a DON, stejně jako OTA, ZEA a FUM být degradovány in vitro kvasinkami rodů *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* a *Rhodotorula*. Degradční kapacita se liší podle druhu a studovaného mykotoxinu. Mimoto určité bakterie mléčného kvašení např. *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus lactis* snižují koncentraci fumonisinu v prostředí in vitro, když jsou kultivovány společně s *F. moniliforme*, potencionálním producentem tohoto mykotoxinu. Nebylo prokázáno, že bakterie mléčných kyselin potlačují formování fumonisinů nebo degradují produkci toxinů v prostředí.

Další možností jak do určité míry eliminovat toxické látky v silážích je aplikace bakteriálních očkovacích látek. Homofermentativní bakterie zvyšují kvalitu fermentace, ale nemusí mít žádný účinek na aerobní stabilitu způsobenou vyšší produkcí mléčné kyseliny (Muck 1997, Danner a kol. 2003). Specificky vybrané druhy heterofermentativních bakterií, např. *L. buchneri*, mohou být dalším nástrojem k ochraně aerobní stability mimořádně choulostivých typů siláže, jako jsou kukuřičné siláže a siláže z malých zrn. (Driehuis a kol. 1996, Driehuis a kol. 2001).

Nové přístupy ve vývoji silážních aditiv vedou ke kombinaci používání některých skupin aditiv ve snaze o vyšší účinnost a více možností aplikace. Simultánní použití homofermentativních a heterofermentativních bakterií pozitivně ovlivňuje aerobní stabilitu a může úspěšně zmírňovat riziko růstu plísní a produkce mykotoxinů v silážích (Auerbach 1996, Auerbach a kol. 2000, Driehuis a kol. 2001, Owen 2002).

## 6. Metodické poznámky k odběru vzorků a analytickému stanovení mykotoxinů

### 6.1. Odběr vzorků

Stanovení mykotoxinů v krmivech či jiných komoditách je poměrně nákladná záležitost. Je proto třeba zajistit, aby takové vyšetření mělo co nejvyšší vypovídací schopnost. Maximální pozornost je proto třeba věnovat nejen vlastnímu analytickému stanovení, ale také vzorkování a přípravě vzorků pro analýzu. Výsledky analýz mohou být bezcenné, pokud vzorek nebyl dostatečně reprezentativní pro celou šarži a navážka vstupující do testu dostatečně reprezentativní pro daný vzorek. Chybné vzorkování materiálu a odběr poměrného vzorku z celkového odebraného vzorku tvoří dle mnohých autorů většinou přes 90% celkové chyby mykotoxinové analytiky. Důležitost správného vzorkování testované šarže pro přesný výsledek je dána dvěma typickými vlastnostmi kontaminace mykotoxiny: nízkou koncentrací těchto látek v dané komoditě a jejich nerovnoměrným rozložením. Pravděpodobnost záchytu kontaminace je možno zvýšit pouze zvýšením objemu jednotlivých vzorků a zvýšením jejich počtu – odběr z co nejvíce míst sila nebo v tomto případě silážní jámy. Jen pro ilustraci výskytu mykotoxinů v nízkých koncentracích jsou uvedeny některé srovnávací příklady. Průměrný výskyt mykotoxinů se uvádí v jednotkách mg/kg tj. ppm (parts per milion) nebo µg/kg tj. ppb (parts per bilion). Pro srovnání, jak nepatrná je to koncentrace několik příkladů:

1 mg/kg = 1 ppm – v 1 kg pšenice je asi 30000 zrn, 1 zrno ve 30 kg představuje 1 ppm.

1 µg/kg = 1 ppb – 1 zrno kukuřice ve 3,5 gáónech.

Odběr vzorku je definován jako odebrání určitého množství materiálu z celku pro test tak, aby výskyt a množství testovaných látek ve vzorku odpovídalo výskytu a množství v celku. Odběr vzorků na mykotoxiny ze silážních jam musí sestávat z odebrání množství siláže a jejich promíchání do průměrného vzorku. Pro otevřené silážní jámy s kukuřičnou siláží doporučujeme z čela silážní stěny odebrat ve třech horizontálních úrovních vždy po třech vzorcích o průměrné hmotnosti 1,5 kg, tedy celkem získat 4,5 kg vzorek. Tento průměrný vzorek je třeba důkladně homogenizovat, případně mechanicky upravit velikost částic. Poté se odebere proporcionální analytický vzorek o hmotnosti 1 kg a z něho vlastní 100g vzorek + o stejné hmotnosti vzorek záložní. Vzorky se uloží ihned po odběru do mrazáku do teploty -20°C pro další zpracování. Zamražení vzorků je důležité proto, aby nedošlo během skladování k další produkci toxických látek metabolizujícími mikroorganismy. Samozřejmě, že ideální je analyzovat obsah mykotoxinů ihned po odběru vzorků, ale z provozních důvodů to není většinou možné.

### 6.2. Analytické stanovení obsahu mykotoxinů

Pro stanovení mykotoxinů jsou využívány různé analytické postupy. Jednou skupinou jsou metody chromatografických analýz (TLC, GC, HPLC), skupinou druhou, která je vhodná pro screeningová stanovení je imunoenzymatická analýza pomocí ELISA metod.

V současné době jsou k dispozici na tuzemském trhu ELISA soupravy od dvou zahraničních výrobců. Principiálně se neliší, určité odlišnosti jsou ve spektru nabízených analytů pro jednotlivé toxiny a v citlivosti (ppm, ppb). Testovací soupravy obsahují základní sadu reagentů včetně ředící řady standardů. Přesnější výsledky dávají soupravy, kde se výsledky odečítají na spektrofotometru při určité vlnové délce procházejícího světla (kvantitativní stanovení). Orientační výsledky lze získat použitím tzv. FAST testů, kde výslednou barevnou reakci odečítá laboratorní personál vizuálně. Tyto testy dávají semi-quantitativní výsledky - méně, shodně nebo více než zvolený standard. Tyto testy trvají bez přípravy vzorku cca 20 minut. V dalším textu se budeme věnovat kvantitativnímu stanovení mykotoxinů.

Používané ELISA testy jsou založeny na reakci antigenu s protilátkou. Jedná se o přímé kompetitivní testy prováděné v mikrotitračních jamkách. Protilátka je enzymový konjugát daného mykotoxinu, který je specifický většinou k myšimu antigenu. Volné mykotoxiny a enzymový konjugát soutěží o vazebná místa na protilátce. Současně se mykotoxin protilátky navazuje imobilizovanými protilátkami – vazači. Všechny nenavázané enzymové konjugáty se poté odstraní v promývacím kroku, přidá se substrát/chromogen a po doporučené době inkubace se reakce zastaví stop činidlem. Výsledné zabarvení - jeho absorbance se proměří většinou při vlnové délce 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci toxinu ve vzorku.

Extrakt testovaných komodit by měly mít pH 6-8. Především v případě siláží je hodnota pH většinou nižší. V tomto případě je nutné tuto reakci upravit pufrům.



Přesto, že ELISA stanovení obsahu mykotoxinů je instrumentálně méně náročné než většina chromatografických postupů, i zde je třeba mít v laboratoři některá nezbytná zařízení, pomůcky a chemikálie. K vyhodnocování získaných výsledků je možné použít speciálně vyvinutý software nebo výsledky odečítat z ručně nakreslené kalibrační křivky.

**Uvedené výsledky byly získány při řešení projektů QE1056 a QD 040 podporovaných Mze ČR.**

#### **Literatura:**

- Adler, A. 1993. In: BAL-Bericht über die österreichweite Silagetagung vom 13./14. Januar 1993. Bundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft, Gumpenstein, Austria, pp. 45-53.
- Auerbach, H. and C. Geissler. 1992. *Übers. Tierern.* 20:167-208.
- Auerbach, H., E. Oldenburg and F. Weissbach. 1998. *J. Sci. Food Agric.* 76:565-572.
- Auerbach, H., E. Oldenburg and G. Pahlow. 2000. *Mycotoxin Res.* 16A (2):146-149.
- Bauer, J. 2002. In: *Proceedings of the XXII World Buiatrics Congress* (M. Kaske, H. Scholz and M. Höltershinken, eds). Hildesheimer Druck- u. Verlags-GmbH, Hildesheim, Germany, pp. 168-180.
- Böhm, J., E. Razzazi, J. Grajewski and I. Styriak, 1999. In: *Proceedings 21. Mykotoxin-Workshop* (H. Rosner and P. Kielstein, eds). 7-9 Juni 1999, Jena, Germany. Pp. 188-191.
- Chujian, L., K.K. Bolsen, B.E. Brent and D.Y.C. Fung. 1992. *J. Appl. Bacteriol.* 73:375-387.
- Cole, R.J., J.W. Kirksey, J.W. Dorner, D.M. Wilson, J.C. Johnson, A.N. Johnson, D.M. Bedell, J.P. Springer, K.K. Chexal, J.C. Clardy and R.H. Cox. 1977. *J. Agric. Food Chem.* 25:826-830.
- Damaglou, A.P., W. Shannon and G.A. Downey. 1984. *J. Sci. Food Agric.* 35:279-284.
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber and R. Braun. 2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 562-567.
- Diaz, G.J. a H.J. Boermans. 1994. *Vet. Human Toxicol.* 36:548-555.
- Diaz, D.E., W.M. Hagler Jr., B.A. Hopkins, J.A. Eve and L.W. Whitlow. 1999. *J. Dairy Sci.* 82:838.
- Dieckmann, M.A. and M.L. Green. 1992. *J. Anim. Sci.* 70:1615-1627.
- Dirheimer, G. 1998. *Rev. Med. Vet.* 149:605-616
- Driehuis, F., S.F. Spoelstra, S.C.J. Cole and R. Morgan. 1996. In: *Proceedings of the XIth International Silage Conference* (D.I.H. Jones, R. Dewhurst, R. Merry a P.M. Haigh, eds). University of Wales, Aberystwyth, 8-11 September 1996, pp. 106-107.
- Driehuis, F., S.J.W.H. Oude Elferink a P.G. Van Wikselaar. 2001. *Grass Forage Sci.* 56:330-341.
- Dutkiewicz, J., S.A. Olenchock, W.G. Sorenson, V.F. Gerencser, J.J. May, D.S. Pratt a V.A. Robinson. 1989. *Apl. Environ. Microbiol.* 55(5): 1093-1099.
- Dutton, M.F., K. Westlake a M.S. Anderson. 1984. *Mycopathol.* 87:29-33.
- Escoula, E. a G. Henry. 1975. *Ann. Rech. Veter.* 59:537-543
- Escoula, E., J. Le Bars a G. Larrieu. 1972. *Ann. Rech. Veter.* 3:469-481.
- Fencl, Z. a J. Leopold. 1957. *Nature* 179:922
- Fenlon, D.R. a J. Wilson. 2000. *Letters Appl. Microbiol.* 30:118-121.
- Frevel, H.-J., G. Engel a M. Teuber. 1985. *Milchwiss.* 40(3):129-132.
- Gedek, B., J. Bauer a H. Schreiber. 1981. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 68:299-301.
- Gotlieb, A. 1997. In: *Proceedings from Silage: Field to feedbunk North American Conference*. February 11-13 1997, Hershey, Pennsylvania. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, New York, pp. 213-220.

- Hacking, A. a W.R. Rosser. 1981. J. Sci. Food Agric. 32:620-623.
- Hanzlová, A.: NRL mykotoxiny a další přírodní toxiny, barviva a antibakteriální látky. In: Mykotoxiny a toxigenní mikromycety v potravinách – současný stav v ČR a SR. Odborný seminář SZÚ Brno, 1.10.2003.
- Jarvis, B., D.A.L. Seiler, A.J.L. Ould a A.P. Williams. 1983. J. Appl. Bacteriol. 55:325-336.
- Jonsson, A. a G. Pahlow. 1984. Anim. Res. Dev. 20:7-22.
- Kämpfe, K. 1999. In: Proceedings 111. VDLUFA-Kongress in Halle/Saale. September 13-17 1999, Halle/Saale, Germany, pp. 313-315.
- Lacey, J. 1989. J. Appl. Bacteriol. 67:Symposium Supplement 11S-25S.
- Lacey, J. a N. Magan. 1991. In: Cereal grain-Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Developments in Food science 26(J. Chelkowski, ed). Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo, pp. 77-118.
- Lepom, P., H. Baath a O. Knabe. 1988. Arch. Anim. Nutr. 38:817-823.
- Lepom, P., O. Knabe a H. Baath. 1990. Arch. Anim. Nutr. 40:1005-1012.
- Lieu, F.Y. a L.B. Bullerman. 1978. Milchwiss. 33:16-20.
- Lindenfelser, L.A. a A. Ciegler. 1970. J. Agric. Food. Chem. 18:640-643.
- Lück, E. 1985. Anim. Feed Sci. Technol. 58:77-89.
- Miller, J.D. 1995. J. Stored prod. Res. 31(1):1-16.
- Mills, J.A. a L. Kung, Jr. 2002. J. Dairy Sci. 85:1969-1975.
- Mor, S. a K. Singh. 2000. Indian J. Anim. Sci. 70(7):766-768.
- Moreau, S. 1981. Internat. Biodeter. 27:195-204.
- Muck, R. 1997. In: Proceedings from the Silage: Field to Feedbunk North American Conference. February 11-13 1997, Hershey, Pennsylvania. Northeast regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, New York, pp. 105-126.
- Müller, H.-M. 1983. Anim. Res. Developm. 18:8-37.
- Müller, H.-M. a R. Amend. 1997. Arch. Anim. Nutr. 50:213-225.
- Müler, H.-M., E. Schröppel a M. Thaler. 1981. Landwirtsch. Forsch. 34(1-2):23-33.
- Müller, M. 1991. Zentralbl. Mikrobiol. 146:481-488.
- Müler, M. 1992. Zentralbl. Mikrobiol. 147:207-213.
- Nakane, M. 1946. J. Appl. Mycol. 1:17-29, 30-41.
- Nečasová, H. – Nedělník, J.: Kontaminace siláží mykotoxiny. In: Sb. XVI. Slovenská a česká konferenci o ochrane rastlín, Nitra 16.-17.9.2003, 132-133.
- Nedělník, J., Moravcová, H.: Mykotoxiny a kvalita produkce. Farmář 9, 2003, 14-15.
- Niles, E.V. 1980. Pest Sci. 11:458-466.
- Nibbelink, S.K. 1986 Iowa State University Veterinarian. 48:28-31.
- Ohomo, S. a H.K. Kitamoto. 1994. J. Sci. Food Agric. 64:2111-215.
- Oldenburg, E. 1991. Landbauforsch. Völkenrode. Sonderheft 123:191-205.
- Oldenburg, E. 1996. In: Weissbach, F. a H. Auerbach: Wann ist der Mais siloreif; Mais 27(2):72-77.
- Oldenburg, E. 1999. Landbauforsch. Völkenrode. Sonderheft. 206:91-109.
- Olivigni, F.J. a L.B. Bulerman. 1977. J. Food Sci. 42:1654-1657, 1665.
- Ominski, K.H., R.R. Marquardt, R.N. Sinha a D. Abramson. 1994. In: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins (J.D. Miller a H.L. trenholm, eds). Egan Press, St. Paul, MN, USA, pp. 287-314.

- Oswald, I.P. a C. Comera. 1998. *Rev. Med. Vet.* 149:585-590.
- Owen, T.R. 2002. In: *Conference Proceedings The XIIIth International Silage Conference* (L.M. Gechie a C. Thomas, eds). September 11-13, 2002, Auchincruive, Scotland, pp. 196-197.
- Parent-Massin, D. a R.E. Parchment. 1998. *Rev. Med. Vte.* 149:591-598.
- Pelhate, J. 1975. *Rev. Mycol.* 39(2):65-95.
- Pelhate, J. 1977. *Folia Vet. Lat.* 7:1-16.
- Pitt, R.E., R.E. Muck a N.B. Pickering. 1991. *Grass Forage Sci.* 46:301-312.
- Poisson, J. a B. Cahagnier. 1973. *Ann. Technol. Agric.* 22(4):567-586.
- Ramakrishna, N., J. Lacey a J.E. Smith. 1993. *Mycol. Res.* 97(11):1393-1402.
- Ramos, A.J., F. Rull, V. Sanchis a S. Marin. 1998. *Rev. Med. Vet.* 149:523.
- Riley, RT, KA Voss, WP Norred, RP Sharma, E Wang a AH Merrill, Jr. 1998. *Rev. Med. Vet.* 149:617-626.
- Rosiles, M.R. 1978. *Vet. Mexico* 9:163-167.
- Schmerbauch, K.-J., E. Kaiser, C. Fürll a M. Schuster. 1999. In: *Proceedings 111. VDLUFAKongress in Halle/Saale*. September 13-17 1999, Halle/Saale, Gemany, pp. 345-348.
- Schneweis, I., K. Meyer, S. Hörmansdorfer a J. Bauer. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8):3639-3641.
- Schneweis, I., K. Meyer, S. Hörmansdorfer a J. Bauer. 2001. *J. Anim. Nutr. Anim. Physiol.* 85:38-44.
- Scott, P.M. 2001. *J. AOAC Internat.* 84(6):1809-1817.
- Scudamore, K.A. a C.T. Livesey. 1998. *J. Sci. Food Agric.* 77:1-7.
- Scudamore, K.A., S. Nawaz a M.T. Hetmanski. 1998. *Food Add. Contam.* 15(1):30-55.
- Shier, W.T. 1998. *Rev. Med. Vet.* 149:599-604.
- Skaar, I. A H. Stenwig. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(10):3614-3619.
- Smith, J.E. a G. Harran. 1993. *Internat. Biodeterior. Biodegrad.* 32(1-3):205-211.
- Tylin, I. 2000. *Acta Univerisitatis Agriculturae Sueciae. Agraria* 223.
- Trenholm, H.L., DB Prelusky, JC Young a JD Miller. 1989. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18:443-451.
- Trenholm, H.L., L.L. Charmley a D.B. Trenholm. 1997. In: *Proceedings of the C. F. I. A. Eastern Nutrition Conference 1997*. May 6-7 1997, University of Guelph, Guelph, Ontario, pp. 21-27.
- Tubaki, K. 1956. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 1:6-7.
- Tüller, G., N. Hertkorn, W. Richter a J. Bauer. 1995. *Landbauforsch. Völkenrode. Sonderheft* 157:124-127.
- Vesely, D., D. Vesela a A. Adamkova. 1981. *Veterinarni Medicina (Praque)* 26:109-115.
- Wei, R.D., P.E. Still, E.B. Smalley, H.K. Schnoes a F.M. Strong. 1973. *Appl. Microbiol.* 25:111-114.
- Whitlow, L.W. a W.M. Hagler, Jr. 2002. *Feedstuffs*. July 10, pp. 68-77.
- Woolford, M. 1990. *J. Appl. Microbiol.* 68:101-116.

## Obsah:

<b>1. Výsledky 3-letého monitoringu obsahu fusariových mykotoxinů v zrnú obilovin v ČR</b>	<b>1</b>
<b>2. Metodické poznatky získané při analytických stanoveních mykotoxinů</b>	<b>4</b>
2.1. Imunochemické stanovení deoxynivalenolu – metodika a metodické poznatky	4
2.2. Imunochemické stanovení zearalenonu – metodika a metodické poznatky	5
2.3. Postup stanovení DON a ZEA metodou HPLC	6
2.3.1. Stanovení deoxynivalenolu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – metodika a metodické poznatky	6
2.3.2. Stanovení zearalenonu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – metodika a metodické poznatky	8
<b>3. Přehled výsledků průzkumu obsahu mykotoxinů v Evropě a dalších státech (na zákl. jejich prezentací na mezinárodních konferencích)</b>	<b>9</b>
<b>4. Kontaminace siláží mykotoxiny</b>	<b>20</b>
4.1. Mykotoxiny	20
4.2. Siláže	21
4.2.1. Vlákňité houby a mykotoxiny v silážích	22
4.2.2. Změny v obsahu mykotoxinů pocházejících z primární kontaminace během fermentace	23
4.2.3. Dynamika růstu hub během fermentace a po otevření siláží	23
4.2.4. Mykoflora hotových siláží	24
4.2.5. Formování mykotoxinů v silážích	24
<b>5. Výskyt mykotoxinů v silážích a krmivech v ČR</b>	<b>26</b>
5.1. Kukuřičné siláže v letech 2001-2002 – případová studie	26
5.2. Mykotoxinová kontaminace růz. typů siláží – srovnání let 2001-2003 (Nečasová, Nedělník, 2003)	27
5.3. Mykotoxiny v objemných krmivech – analýzy SVÚ Jihlava (Hanzlová, 2003)	28
5.4. Prevence	28
<b>6. Metodické poznámky k odběru vzorků a analytickému stanovení mykotoxinů</b>	<b>30</b>
6.1. Odběr vzorků	30
6.2. Analytické stanovení obsahu mykotoxinů	30