

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra krajinného managementu

Vedoucí katedry: doc. Ing. Pavel Ondr, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv plísní a jejich metabolitů na zdravotní stav zvěře

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Vladimír Hanzal, CSc.

Konzultant: doc. MVDr. Karel Bukovjan, CSc.

Autor diplomové práce: Bc. Lenka Boháčková

České Budějovice, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce, panu doc. Ing. Vladimíru Hanzalovi, CSc. za jeho čas, rady a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat svému konzultantovi, panu doc. MVDr. Karlu Bukovjanovi, CSc. za poskytnuté výsledky a pomoc při zpracování. Poděkování patří také mým blízkým, nejvíce rodině, která mě finančně podporovala po celou dobu studia a hlavně mě držela psychicky.

Abstrakt

Cílem této práce bylo vyhodnotit vyšetřené vzorky jaterní tkáně na obsah aflatoxinu B1 u daňčí zvěře. Celkem bylo vyšetřeno 221 vzorků pro analýzu metodou RIA. Vzorky byly získávány z uhynulých a odlovených kusů daňčí zvěře, pocházejících z obor soukromých a z obor Lesů České republiky. Vzorky daňčí zvěře byly rozděleny do skupin podle typu, pohlaví a věku. Pohlaví bylo určeno vizuálně a věk byl určen podle úbrusu chrupu.

Nejvyšší koncentrace aflatoxinu B1 v játrech byla naměřena u uhynulé 6ti leté samice ($7,39 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Podle statistického vyhodnocení ($P < 0,05$) byl prokázán významný rozdíl mezi uhynulými a odlovenými kusy, mezi samci a samicemi i mezi věkovými skupinami.

Uhynulé kusy mají vyšší koncentraci aflatoxinu B1 v játrech v průměru o $2,12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ než kusy odlovené. U samic také byla prokázána vyšší koncentrace aflatoxinu B1 v játrech v průměru o $0,63 \mu\text{g.kg}^{-1}$ než u samců. U věkových skupin bylo prokázáno, že čím starší zvířata jsou, tím stoupá koncentrace aflatoxinu B1 v játrech.

Klíčová slova: daňčí zvěř, aflatoxin B1, játra, obora

Abstract

The aim of this thesis was to evaluate the examined samples of liver tissue to find out the amount of aflatoxin in deer game. A total of 221 samples were examined for analysis purposes using the RIA method. Samples were obtained from dead and captured heads of deer game coming from private game reserves and game reserves belonging to the Forests of the Czech Republic. Samples of deer game were divided into groups according to their types, sex, and age. Sex was determined visually, and age via the development and grinding of the teeth.

The highest concentration of B1 aflatoxin in liver was measured in a 6 year-old dead female (7,39 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). According to the statistical evaluation ($P < 0,05$), a significant difference was proven between dead and captured heads, between males and females, and even between age groups.

There is a higher aflatoxin B1 concentration in dead heads' liver, approximately in 2,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ higher than in captured heads. Females' liver proved to contain a higher concentration of B1 aflatoxin, approximately in 0,63 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ higher than in males. Age groups have proven that the older the animals, the higher the B1 aflatoxin concentration in their liver.

Keywords: deer game, aflatoxin B1, liver, game park

Obsah

1. Úvod a cíl práce.....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1 Plísně.....	10
2.2 Mykotoxiny.....	13
2.2.1 Faktory ovlivňující produkci mykotoxinů.....	15
2.2.2 Nejvýznamnější rizikové mykotoxiny.....	16
2.2.2.1 Aflatoxiny.....	16
2.2.2.2 Fumonisin.....	18
2.2.2.3 Ochratoxiny.....	18
2.2.2.4 Patulin.....	19
2.2.2.5 Trichothece.....	20
2.2.2.6 Zearalenon.....	20
2.2.3 Výskyt mykotoxinů v krmivech.....	21
2.2.4 Přikrmování zvířete – kvalita krmiv.....	22
2.2.4 Mykotoxikózy.....	23
2.3 Vliv na zdravotní stav zvířete a zvířat.....	24
2.4 Riziko pro konzumenty.....	28
2.4.1 Onemocnění u lidí vyvolané mykotoxiny.....	29
2.4.1.1 Reyeův syndrom.....	29
2.4.1.2 Kwashiorkor.....	30
2.4.1.3 Akutní kardiální beri-beri.....	30
2.5 Stanovení mykotoxinů.....	31
2.6 Dekontaminace mykotoxinů.....	33
3. Metodika.....	35
3.1 Úvod.....	35
3.2 Odběr a vyšetření vzorků.....	36
3.2.1 Odběr vzorků.....	36
3.2.2 Vyšetření vzorků.....	36
3.3 Postup zpracování dat.....	37
4. Výsledky.....	39
4.1 Naměřené koncentrace aflatoxinu B1 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) v játrech daňčí zvířete.....	39
4.2 Statistické vyhodnocení výsledků.....	41
4.2.1 Typ.....	41
4.2.1.1 Popisné statistiky.....	41
4.2.1.2 Mann-Whitneyův test.....	42
4.2.2 Pohlaví.....	42
4.2.2.1 Popisné statistiky.....	43
4.2.2.2 Mann-Whitneyův test.....	43
4.2.3 Věk.....	44
4.2.3.1 Popisné statistiky.....	44
4.2.3.2 Kruskal-Walisova ANOVA.....	45
4.2.3.3 Regrese.....	47
4.3 Souhrnné výsledky.....	48
5. Diskuze.....	49
6. Závěr.....	50
7. Seznam použité literatury.....	51

8. Seznam použitých zkratek.....	58
9. Seznam použitých tabulek.....	59
10. Seznam grafů.....	60
11. Přílohy.....	61

1. Úvod a cíl práce

Houby a plísně jsou organismy, které se vyskytují po celém světě. Plodiny jsou plísněmi napadány při nevhodném počasí i při nevhodných podmínkách skladování. Plísně můžeme rozdělit do tří skupin, na plísně polní, plísně skladištní a plísně polní a skladištní. Toxinogenní plísně produkují sekundární metabolity, zvané mykotoxiny. Nejvýznamnějšími producenty jsou rody *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Mykotoxiny jsou detekovány nejčastěji v obilí (pšenici, ječmeni, žitu), dále pak v nahnílém ovoci a v mléce, které může být kontaminováno hydroxylovaným metabolitem aflatoxinu B1.

V současné době je známo více než 400 druhů mykotoxinů, kdy mezi nejdůležitější mykotoxiny patří aflatoxiny, fumonisiny, ochratoxin A, deoxynivalenol, T-2 toxin a zearalenon. Mykotoxiny jsou považovány za jedny z nejzávažnějších kontaminantů krmiv, které jsou určeny pro krmení zvířat a potravin, které jsou určeny pro lidskou spotřebu.

Cílem této předložené práce je v literární rešerši shrnout téma základní informace o plísních a mykotoxinů, vlivy na zvěř a zvířata a mykotoxiny vyvolané onemocnění. Větší pozornost však poté věnovat zpracování výsledků vyšetřené zvěřiny na přítomnost plísní a jejich metabolitů. Dále pak vyhodnocení jejich vlivu na zdravotní stav a možné konzumenty zvěřiny.

Výsledky byly poskytnuty pracovištěm Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i se sídlem Jíloviště – Strnady, z bývalého oddělení fyziologie a chorob zvěře, respektive z nástupnického oddělení monitoringu. Ve finále pak pracovišti veterinární ošetrovna pro drobná zvířata a zvěř - laboratoře, biomonitoring a Institut ekologie a chovu zvěře s.r.o.

Vzorky pocházejí z oborně chovaných kusů daňčí zvěře. Jedná se jak o obory soukromé, tak i o obory Lesů České republiky. Tyto obory však v této práci nejsou vyjmenovány, protože si nepřály být zveřejněny.

2. Literární přehled

2.1 Plísně

Plísně neboli vláknité mikromycety jsou eukaryotní, heterotrofní, vícebuněčné, mikroorganismy. Tyto organismy mohou být buď saprofytické nebo parazitické. Ne všechny mikroskopické houby vylučují toxiny a ne všechny jsou toxinogenní. Za toxinogenní mikromycety se považují ty, které mají schopnost produkovat mykotoxiny. (WASSERBAUEROVÁ, 2011).

Houby a plísně jsou schopny produkovat enormní počet sekundárních metabolitů včetně antibiotik a mykotoxinů. Produkované mykotoxiny jsou toxické jak pro zvířata, tak i pro člověka (Nyenjel a Ndip, 2013). Kromě antibiotik představují mykotoxiny druhou velkou skupinu biologicky aktivních látek mikrobiálního původu (Burchard, 1984).

Plísně můžeme rozdělit na tři skupiny: 1. skupinou jsou plísně polní (rod *Fusarium* a *Alternaria*), 2. skupinou jsou plísně skladištní (rod *Aspergillus* a *Penicillium*) a 3. skupinou jsou plísně polní a skladištní (rod *Penicillium*). Tyto plísně mohou kontaminovat obiloviny i krmné plodiny v průběhu pěstování, zrání, sklizně, dále pak při skladování a konzervaci krmiv (Suchý a Herzig, 2005).

Polní plísně napadají a poškozují plodiny během vegetace a tím dochází k primární infekci rostlin. Houby rodu *Fusarium* a *Alternaria* se dají považovat za jedny z nejzávažnějších původců kontaminace zemědělských plodin plísněmi a následnému produkování mykotoxinů. Rod *Fusarium* poškozuje zejména obiloviny, kterým je věnována největší pozornost. V našich podmínkách každý rok nejvíce napadají pšenici a ječmen, u kterých následně dochází k snížené technologické kvalitě zrna a výrazným hospodářským ztrátám. Mezi nejdůležitější rody, které charakterizují skladištní plísně, patří *Aspergillus* a *Penicillium*. Tyto plísně způsobují sekundární infekce a tzv. „zaplísnění“. K jejich růstu dochází při nesprávném skladování a porušení hygienických podmínek. Skladové plísně potřebují ke svému růstu vysokou vlhkost substrátu s poměrně vysokými teplotami (Nedělník *et al.*, 2004).

Růst vláknitých hub (plísni) je ovlivňován velkým množstvím faktorů. K nejdůležitějším faktorům pro růst plísni patří teplota, vlhkost, složení atmosféry, aktivita vody, pH, chemické složení a biotické faktory, například přítomnost hmyzu (Sýkorová a Nedělník, 2004). Růst plísni a produkce mykotoxinů souvisí se změnou způsobenou extrémní počasí, poškozením zrna hmyzem, při nedostatečných skladovacích postupech nebo špatnými podmínkami při skladování a krmení. Obecně platí, že podmínky prostředí – teplo, poškození vodou nebo hmyzem, způsobují větší náchylnost rostliny k poškození plísněmi v oblastech skladování nebo přímo už i v krmivu (Whitlow *et al.*, 2010).

Houby do napadených rostlin pronikají přes kořeny, stonky, listy a palice. Nejnovější studie uvádějí, že přes listy a stébla pronikají více než přes palice, které nejsou tolik zatížené (Sýkorová a Nedělník, 2004). Hajšlová *et al.* uvádí (2010), že spory hub infikují zrno a prostřednictvím mízního systému pak celou rostlinu. U pěstovaných plodin poté dochází k jejich znehodnocení, což má za následek snižování výnosů.

Saprofytické houby produkují toxiny během skladování, při čemž endofytické houby během růstu rostlin (Hussein a Brasel, 2001).

Tab. č. 1.: Přehled druhů plísní, produkované toxiny a kontaminované komodity (Havlíček et al, 2014)

Druh plísně	Produkovaný mykotoxin	Komodita
Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. agrenicus, A. nomius	Aflatoxiny	Obiloviny, olejniny
Fusarium culmorum, F. Graminearum, F. roseum	Deoxynivalenol	Kukuřice, obiloviny, seno, siláž
Fusarium verticilloides (moniliforme), F. Oxysporum, F. Proliferatum, F. antrophilum	Fumonisy	Kukuřice
Aspergillus ochraceus, Penicillium viridicatum, P. Cyclopium, P. verrucosum	Ochratoxin	Obiloviny, kukuřice
Penicillium expansum, Aspergillus	Patulin	Shnilé ovoce, siláž
Fusarium sporotrichoides, F. Poae, F. Tricinatum, F. nivale	T-2 toxin	Kukuřice, obiloviny, seno, siláž
Fusarium culmorum, F. Graminearum, F. Oxysporum, F. Roseum, F. Sporotrichoides, F. tricinatum	Zearalenon	Obiloviny

2.2 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované vláknitými houbami, které se přirozeně vyskytují v zemědělských komoditách po celém světě. Jsou škodlivé pro lidské zdraví i zdraví zvířat (Liu *et al.*, 2015). Mykotoxiny můžeme označit za vedlejší produkty metabolismu hub s produkující řadou sekundárních metabolitů (Abbott, 2002). Dosud je známo více než 300 mykotoxinů a mohou být rozděleny na 25 strukturních typů (Burchard, 1984).

Existuje mnoho mykotoxinů, ale jen několik z nich představuje významné riziko v oblasti bezpečnosti potravin. Mezi nejvýznamnější rody patří *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* (Murphy *et al.*, 2006). Aflatoxiny, fumonisiny, deoxynivalenol, ochratoxiny a zearalenon patří k pěti nejdůležitějším přirozeně se vyskytujícím mykotoxinům v krmivech a potravinách (Marasas *et al.*, 2008). Mezi mykotoxiny s největším agroekonomickým významem se dají zařadit aflatoxiny, fumonisiny, ochratoxiny, trichotheceny, zearalenon. Některé mykotoxiny mohou být produkovány více než jedním druhem plísní a některé druhy plísní jsou schopné produkovat více než jeden mykotoxin. Na kontaminovaném substrátu můžeme často nalézt více než jeden mykotoxin (Hussein a Brasel, 2001).

Mykotoxiny byly izolovány, jejich struktura byla stanovena včetně jejich biologické aktivity. Jejich bio-syntéza je nyní také do značné míry objasněna. V souladu s tím jsou mykotoxiny odvozeny pouze ze tří skupin klíčových biogenetických stavebních bloků. Jedná se o polyketidy, izopentenylpyrofosfát a aminokyseliny. Mykotoxiny jsou převážně nepolární, chemicky stabilní, tvoří se ve vysokých koncentracích a neobsahují – na rozdíl od antibiotik – žádné cukry (Burchard, 1984).

Mykotoxiny a hlavně jejich chemické struktury se značně odlišují, ale všechny se dají považovat za organické sloučeniny s poměrně nízkou molekulovou hmotností (Peraic *et al.*, 1999). U téměř většiny mykotoxinů se dá říci, že jsou chemicky stabilní, tudíž mají tendenci přežívat skladování i zpracování. Mohou přežít i var při relativně vysokých teplotách, jako jsou například dosahované teploty při produkci cereálií nebo pečení chleba. Proto se za velmi důležité považuje vyhnout se podmínkám vedoucím k tvorbě mykotoxinů. Bohužel to není vždy možné a dosáhnout toho v praxi také není jednoduché. Protože je značně obtížné

mykotoxiny odstranit, nejlepším způsobem je tedy cílená kontrola prevence (Turner *et al.*, 2009).

Mezi čtyři základní druhy toxicity vyvolané mykotoxiny patří: akutní, chronické, mutagenní a teratogenní. Mezi nejčastěji popisované účinky akutních intoxikací patří zhoršená morfolgie a funkce jater nebo ledvin, což v extrémních případech může způsobit i úhyn. Hlavním chronickým účinkem mnoha mykotoxinů je indukce nádorových onemocnění, zejména jater (Pitt, 2000).

Mykotoxiny mohou vyvolávat onemocnění buď akutní nebo chronické. Akutní onemocnění je způsobeno dávkováním vysokých hladin mykotoxinů, zatímco chronické je důsledkem dlouhotrvajícího vystavení se nízké hladině mykotoxinů. Mykotoxiny vykazují své účinky několika mechanismy (Whitlow *et al.*, 2010).

- a) snížení sání nebo odmítnutí krmení
- b) změna obsahu živin v krmivu a v absorpci živin
- c) účinky na endokrinní a exokrinní systémy
- d) potlačení imunitního systému
- e) antibiotické účinky
- f) buněčná smrt

Mykotoxiny vykazují obrovské množství toxických farmakologických aktivit, mezi které například patří degradace jater, hemoragie, karcinomy. Diagnostika mykotoxikóz je narušena jejich dlouhou inkubační dobou a skutečností, že mají mykotoxiny tendenci se hromadit v organismu zvířat, což může znamenat, že i velmi nízké koncentrace v krmivech nebo potravinách můžeme považovat za potenciální nebezpečí (Burchard, 1984).

Tab. č. 2.: 3 nejvýznamnější rody produkující mykotoxiny (Modrá *et al.*, 2009)

Mykotoxiny	Producenti rodu		
	Aspergillus	Fusarium	Penicillium
Aflatoxiny	×	-	-
Fumonisin	-	×	-
Patulin	(×)	-	×
Ochratoxin	×	-	×
Trichothecen	-	×	-
Zearalenon	-	×	-

2.2.1. Faktory ovlivňující produkci mykotoxinů

Faktory, které ovlivňují produkci toxinů:

1. fyzikální: výskyt plísní, teplota, vlhkost prostředí a daného materiálu, poškození zrna, složení substrátu, způsob sklizně a skladování
2. chemické: hodnota pH, přítomnost mikroprvků a makroprvků, složení sušiny, přítomnost bakteriálních a fungicidních látek, aplikace konzervačních prostředků při skladování
- 3 biologické: toxinogenní vlastnosti plísní, konkurenční vztahy mezi bakterií a plísní, vlastnosti kmene a druhu plísní (Zeman, 2006).

Formy mykotoxinů rostou v teplotním rozmezí od 10 do 40°C, v rozsahu hodnot pH 4 až 8, při aw (aktivita vody) vyšší než 0,7 a obsahu vlhkosti nad 13 – 15%. Většina forem je aerobních a proto vysoké koncentrace vlhkosti, které vylučují adekvátní kyslík může zabránit růstu plísní (Whitlow *et al.*, 2010).

Přítomnost mykotoxinů v krmivech ovlivňuje spousta faktorů, mezi které se zahrnují podmínky prostředí i skladování, dále to jsou vnitřní faktory a vnější faktory, jako je například klima (Hussein a Brasel, 2001).

Tab. č. 3: Faktory ovlivňující růst plísní a produkci mykotoxinů (Tůmová, 2006)

Vnitřní faktory	Vnější faktory
Aktivita volné vody – např. vysoká aktivita volné vody podporuje růst plísní <i>Aspergillus</i> a tím následnou produkci aflatoxinů	Prostředí – plísně jsou aerobní mikroorganismy, např. při 5 % kyslíku a 40 % oxidu uhličitého v atmosféře je růst plísní a produkce mykotoxinů omezena
Vlhkost - saprofytické plísně rostou při optimální vlhkosti nad 13% a fytopatogenní plísně nad 20%	Vlhkost - růst plísní je podporován při relativní vlhkosti nad 70%
pH – růst plísní je omezován při snižování pH	Teplota – důležitý faktor pro růst plísní a produkci mykotoxinů
Složení krmiva – cukry, lipidy, stopové prvky atd.	Velikost zrna – plísně rostou i na povrchu malých zrnin

Tab. č. 4: Obecné charakteristiky pro růst mikromycetů a produkci mykotoxinů v potravinách (Ostrý, 1998)

Faktor	Růst	Produkce mykotoxinů
Eh	aerobní podmínky	aerobní podmínky
a _w	min. 0,62	min. 0,8 – 0,85
Teplota	-12 - 55°C	4 - 40°C
pH	1,7 – 10	2,5 – 8 → optimum 5 - 7
Vliv cukrů	do 50% sacharózy (Aspergillus flavus)	do 50% sacharózy (Aspergillus flavus)
Vliv solí	do 20% NaCl	do 14% NaCl
Vliv látek v koření	Inhibice (eugenol, anetol, tymol)	Inhibice (eugenol, anetol, tymol)
Vliv fytoalexinů	Inhibice	Inhibice
Infekce viry	neuveдено	Inhibice (RNA viry)
Vliv jiných mikromycetů	neuveдено	Inhibice (výskyt Aspergillus sk. niger)

2.2.2 Nejvýznamnější rizikové mykotoxiny

2.2.2.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou produkovány druhy *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus nomius*. Je to jeden z nejsilnějších karcinogenů přírodního původu známý pro člověka (Abbott, 2002). *Aspergillus flavus* produkuje aflatoxiny B1 a B2, zatímco *Aspergillus parasiticus* produkuje aflatoxiny B1, B2, G1 i G2 (Whitlow *et al.*, 2010).

Poprvé byly aflatoxiny identifikovány při zjištění, že jsou příčinou choroby „Turecko-X“, kdy byla nalezena akutní toxicita u komerčních krůt v šedesátých letech minulého století. Toxicita aflatoxinů se vyskytuje u řady zvířat, od ryb přes ptáky až po savce. Uvádí se, že ptáci jsou nejcitlivější, ale i u nich můžeme najít druhové rozdíly. Účinky aflatoxinů a jejich citlivost se liší podle pohlaví, věku a výživného stavu, kdy mladí ptáci budou nejcitlivější (Lawson *et al.*, 2006).

Aflatoxiny se vyskytují v několika chemických formách, které se označují jako aflatoxin B1, B2, G1, G2 a M1. Aflatoxiny B1 a B2 se při vystavení UV záření vyznačují modrou barvou fluorescence (blue), zatímco aflatoxiny G1 a G2 se vyznačují zelenou barvou fluorescence (green). V mléce laktujících žen i samic, konzumující potraviny nebo krmivo kontaminované AFB1, převládá aflatoxin M1, který je hydroxylovaným metabolitem AFB1 (Murphy *et al.*, 2006).

Za nejúčinnější hepatokarcinogen je považován aflatoxin B1 (Betina, 1990). IARC (Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny) posuzovala účinky AFB1 a vyhodnotila jej jako karcinogen patřící do skupiny 1, což znamená, že je karcinogenní pro člověka (IARC, 1993).

Podle Nedělníka a Moravcové (2005) jsou aflatoxiny M1 a M2 zařazeny do skupiny tzv. aflatoxinů odvozených, zatímco zbytek patří do skupiny aflatoxinů základních. Při trávení krmiva, které je kontaminováno základními aflatoxiny, vznikají konverzí odvozené aflatoxiny. Například D'Mello (2000) uvádí, že u přežvýkavců jsou aflatoxiny aktivně metabolizovány v bachoru. U skotu v předžaludcích probíhá přeměna aflatoxinu B1 na aflatoxin M1, který je dále vylučován do mléka. Telata tak mohou přijmout aflatoxiny přes mléko.

Aflatoxiny mají akutně toxické, imunosupresivní, karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky. Játra jsou nejčastějším cílovým orgánem karcinogenity (Peraic *et al.*, 1999). Aflatoxiny vstupují do buňky, kde jsou buď metabolizovány v endoplasmatickém retikulu na hydroxylované metabolity, či se oxidují na reaktivní epoxid. Hydroxylované metabolity se mohou dále metabolizovat na glukuronidové a sulfátové konjugáty. Reaktivní epoxid se podrobuje hydrolýze a může se vázat na proteiny, které vedou k cytotoxicitě (Whitlow *et al.*, 2010).

Tab. č. 5.: Maximální přípustné koncentrace aflatoxinu B1 v krmivech (Rada, 2004)

Typ krmiva	Maximální obsah v mg/kg (ppm)
Všechny krmné suroviny	0,02
Kompletní krmiva pro skot, ovce a kozy s výjimkou:	0,02
a) kompletních krmiv pro zvířata chovaná pro mléko	0,005
b) kompletních krmiv pro telata a jehňata	0,01
Kompletní krmiva pro selata a drůbež (kromě mladých zvířat)	0,02
Ostatní kompletní krmiva	0,01
Doplňková krmiva pro skot, ovce a kozy (kromě doplňkových krmiv pro zvířata chovaná pro mléko, telata a jehňata)	0,02
Ostatní doplňková krmiva	0,005

2.2.2.2 Fumonisin

Fumonisin byly objeveny v osmdesátých letech minulého století, jako výsledek dlouhodobého studia onemocnění u koní zvaného leukoencefalomalacie. Jsou složeny z 20 uhlíkového alifatického (nearomatického) řetězce se dvěma esterovými vázanými hydrofilními postranními řetězci, které připomínají sfingosin. Toxické působení fumonisinů je způsobeno důsledkem konkurence se sfingosinem v metabolismu sfingolipidu (Pitt, 2000).

Fumonisin, na rozdíl od všech ostatních potravinových mykotoxinů, jsou vysoce rozpustné ve vodě. U fumonisinů se nenachází aromatická struktura, ani unikátní chromofor pro snadnou analytickou detekci. Jsou to primární aminy se dvěma trialkylovými skupinami, což právě přispívá k jejich lepší rozpustnosti ve vodě (Murphy *et al.*, 2006).

2.2.2.3 Ochratoxiny

Ochratoxiny byly objeveny v Jihoafrické republice při laboratorním vyšetření zemědělských plodin. *Aspergillus ochraceus* byl vyšetřením stanoven jako nejvýznamnější producent ochratoxinů. Nejdůležitějšími producenty ochratoxinu A,

který je považován za nejtoxičtější ochratoxin, jsou penicillia, zejména *Penicillium viridicatum* (Radová-Sypecká a Hajšlová, 2003).

Ochratoxiny mohou být přítomny ve velkém množství potravin, protože jsou produkovány několika kmeny plísní druhů *Penicillium* a *Aspergillus*, které mají různou fyziologii a ekologii. Ochratoxiny mají ve své struktuře přítomný chlór, díky čemuž je jeho struktura jedinečná (Murphy *et al.*, 2006).

Milani (2013) uvádí jako vhodné podmínky pro růst plísně druhu *Aspergillus ochraceus* teploty v rozmezí 8 – 37°C, jako optimální teplotu pro růst na zrnech ječmene něco kolem 30°C. *Aspergillus carbonarius* je odolný proti slunečnímu záření, a jako optimální teploty pro jeho růst jsou uvedeny teploty mezi 32 – 35°C.

Ochratoxin A je akutní nefrotoxin, který má dále embryonální, imunosupresivní a pravděpodobně i karcinogenní účinky. Způsobuje vážné zdravotní problémy u zvířat, mezi kterými můžeme najít i význam v etiologii nefritidy – onemocnění ledvin u prasat ve většině severní Evropy a Skandinávii (Pitt, 2000).

Nejvýmavějšími druhy zvířat jsou mláďata drůbeže, zejména kachňata, krůťata a kuřata. Ze zvířer pak bažanti. Přežvýkavci jsou odolnější vůči ochratoxinům. OTA je bachorovou mikroflórou transformován na méně toxický alfa ochratoxin, než je ochratoxin A (Suchý a Herzig, 2005).

2.2.2.4 Patulin

Podle Kalače a Míky (1997) je produkován plísněmi rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, zejména pak *Penicillium expansum* a *Penicillium patulum*, kdy tyto dva druhy produkují patulin hlavně ve shnilých jablkách. *Byssosclama nivea* a především jeho asexuální forma *Paecilomyces* spp. vytváří patulin v plesnivé siláži, který je poté při procesech kvašení rozkládán tou samou houbou.

Mezi nejčastěji infikované komodity patří meruňky, hrozny, broskve, hrušky, jablka, olivy, obiloviny a ovocné šťávy, které mají nízkou kyselost (jablečný, hroznový, hruškový mošt). Nedávné studie prokázaly, že patulin není karcinogenní, díky čemu se většina výzkumů zaměřila na genotoxicitu (Murphy *et al.*, 2006).

2.2.2.5 Trichotheceny

Je známo, že existuje něco kolem 180 trichothecenů, ale jen některé z nich jsou významné pro lidské zdraví. Mezi významné trichotheceny patří deoxynivalenol (DON), toxin T-2 a nivalenol (Murphy *et al.*, 2006).

Trichotheceny produkuje několik druhů *Fusarium* a příbuzné rody. DON je běžně se vyskytující mykotoxin, který je primárně produkován *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*. *Fusarium sporotrichioides* a *Fusarium poae* primárně produkují T-2 toxin, ale ten je produkován i jinými druhy *Fusarium*. Trichotheceny jsou imunosupresivní a vykazují svou toxicitu prostřednictvím inhibice syntézy bílkovin na úrovni ribosomu (Whitlow *et al.*, 2010).

Trichotheceny se dají podle molekulární struktury rozdělit na makrocyclické a nemakrocyclické (DON a T-2 toxin). Deoxynivalenol a T-2 toxin se mohou označovat také jako fusariotoxiny, které kontaminují plodiny před sklizní za vyšší vlhkosti vzduchu. Trichotheceny jsou v organismu rychle metabolizovány a během několika dní odcházejí z těla močí jako hydroxylované metabolity. Tím se snižuje riziko výskytu trichothecenů ve tkáních zvířat (Havlíček *et al.*, 2014).

2.2.2.6 Zearalenon

Hlavním producentem zearalenonu je *Fusarium graminearum*, ale produkujího i jiné druhy tohoto rodu. Zearalenon je přírodní kontaminant kukuřice, siláží a sena, pšenice, ječmene, ovsa, čiroku a sezamového semínka (Whitlow *et al.*, 2010). Mykotoxiny zearalenon se mohou nacházet pouze v zrnech a ve vysoce proměnlivých množstvích, v rozmezí od několika nanogramů na gram, až po tisíce nanogramů na gram. Vypuknutí zearalenonové mykotoxikózy u zvířat může vést až k neplodnosti (Murphy *et al.*, 2006).

V některých zemích mají stanovené hygienické limity pro obsah zearalenonu v produktech i krmivech. Tyto limity jsou stanoveny kvůli estrogením a potenciálně i karcinogenním účinkům zearalenonu. V České republice zatím žádný limit pro ZEA nebyl stanoven (Radová-Sypecká a Hajšlová, 2003).

2.2.3 Výskyt mykotoxinů v krmivech

Toxinogenní plísně, produkující toxiny, můžeme najít jak v krmivech, potravinách, tak i v tělních tekutinách a tkáních zvířat, jak u zvěře, tak i u hospodářských zvířat. Některé z těchto tkáních mohou sloužit jako potraviny pro člověka (Šmerák, 2003).

Plísně, které napadají krmiva a množí se na nich, potřebují ke svému metabolismu výživné látky. Spotřebovávají tak živiny obsažené v krmivech a tím se snižuje v krmivu jejich obsah. Hlavními spotřebovávanými živinami jsou tuky a sacharidy, což má v krmivu za následek pokles energetické hodnoty (Havlíček *et al.*, 2014).

Mykotoxiny se mohou vyskytovat téměř ve všech krmivech, během vegetačního období, při sklizni, ale i během skladování. Chladné a vlhké počasí upřednostňuje růst toxinů rodu *Fusarium*, zatímco horké a vlhké počasí povzbuzuje růst aflatoxinů (Adams *et al.*, 1993). Nejčastěji se v krmivech vyskytují plísně rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Přítomnost mykotoxinů v krmivech hned nepředstavuje zanedbání výroby daných výrobců, protože toxiny plísní jsou smyslově naprosto nepostřehnutelné, laboratorními metodami obtížně detekovatelné, které ještě ke všemu jsou velmi finančně náročné (Mohelský, 2013a).

Výskyt mykotoxinů v krmivech vykazuje často geografický vzorec, kdy druhy, jako je například *Aspergillus*, je více přizpůsoben tropickým a subtropickým oblastem, zatímco druhy *Fusarium* a *Penicillium* splňují optimální podmínky klimatu Severní Ameriky a Evropy (Fink-Grenmels, 1999). V České republice nedochází ke kontaminaci zemědělských plodin aflatoxiny, kvůli nízkým teplotám, protože aflatoxiny mají požadavky na vyšší teploty. Aflatoxiny se tedy označují jako dovozové mykotoxiny (Modrá *et al.*, 2014). Klimatické podmínky České republiky patří mezi chladnější oblasti s vyšší vlhkostí vzduchu. Z tohoto důvodu bývají zemědělské plodiny nejvíce kontaminovány mykotoxiny deoxynivalenolem a zearalenonem, které produkují plísně *Fusarium*, a ochratoxinem, produkovaným plísněmi *Aspergillus* a *Penicillium* (Havlíček *et al.*, 2014).

Druhy *Fusarium* můžeme označit za destruktivní patogeny vyskytující se na obilovinách i jiných komoditách, kde produkují mykotoxiny před sklizní nebo ihned po sklizni. Některé druhy *Penicillium* a *Aspergillus* patří také mezi rostlinné patogeny, komensaly, kdy je ale nejčastěji můžeme spojit s produkcí mykotoxinů, u komodit a potravin, během sušení a následném skladování (Pitt, 2000).

2.2.4 Příkrmování zvířete – kvalita krmiv

Zvěř může přijímat zaplísněné krmivo i při příkrmování v zimních a jarních měsících. Může být obsaženo v podávaném obilí, kdy nejčastěji kontaminovaným obilím je oves, který nejnadhěji podléhá kontaminaci plísněmi. V časném jarním období může zvěř přijímat stařinu, která ale může být také narušena plísněmi (Mohelský, 2012a). Mykotoxiny mohou být obsaženy i v krmných směsích, v zralých napohled nezávadných obilovinách, slámě i senu. Napadeny mohou být i luční a pastevní porosty, zejména pak vojteška (Mohelský, 2012b).

Mykotoxiny se mohou vyskytovat i u dužnatých krmiv. Při nevhodném skladování, jako je vlhké prostředí s kolísajícími teplotami, jsou vytvořeny podmínky pro růst plísní a jejich toxinů. Krmivo se tak pro zvěř stává nevhodným a dále i nebezpečným. Dochází k rozkladným procesům a tím i ke ztrátám živin (Rajský *et al.*, 2012).

K výskytu plísní a následně i tvorbě mykotoxinů v krmivech pro zvěř dochází při špatných podmínkách skladování nebo při nevhodném zkrmování. Za nevhodný způsob zkrmování se považuje tvoření hromad, které jsou nechráněné před deštěm a vzlínající vlhkostí z půdy, dále při přikrytí takových hromad neprodyšnou plachtou nebo PVC folií, kdy toto opatření zabrání odpařování zbytkové vody z krmiva. Dále zakoupenými nebo darovanými krmivy, které jsou závadné kvůli silné hnilobě nebo zaplísnění a nelze je tedy zkrmovat ani hospodářskými zvířaty (Šmerák, 2003).

Tab. č. 6: Mykotoxiny a komodity, ve kterých se mohou vyskytnout (Bullerman a Bianchini, 2007)

Mykotoxiny	Potraviny / komodity
Aflatoxiny	Kukučice, semena bavlníku, arašídů, ořechy, mléko
Deoxynivalenol	Pšenice, ječmen, kukuřice
Fumonisin	Kukuřice
Ochratoxin	Pšenice, kávová zrna, hrozny, rozinky
Zearalenon	Kukuřice

2.2.4 Mykotoxikózy

Mykotoxiny vyvolávají onemocnění jak u zvířat, tak i u lidí, zvané mykotoxikózy. Povaha toxických účinků onemocnění se liší v závislosti na chemické struktuře toxinu. Stupeň těchto nežádoucích účinků nezávisí pouze na koncentraci toxinů, které jsou přítomné v krmivech nebo potravinách, ale závisí také na době působení (Fink-Greemels, 1999).

Široká škála živočišných druhů je náchylná na onemocnění způsobené mykotoxiny. Mykotoxikózy mohou být docela rozmanité. Toto onemocnění se vyskytuje po konzumaci kontaminovaných komodit mykotoxiny nebo krmiv vyrobených z těchto produktů. Mohou však existovat i jiné způsoby expozice (Richard, 2007).

Závažnost mykotoxikózy závisí na toxicitě mykotoxinu, na jeho rozsahu působení, výživném stavu a věku zvířete, a dále také na možných synergických účincích jiných chemických látek, kterým může být zvíře vystaveno (Peraic *et al.*, 1999). Mykotoxikózy mají skoro stejně rozmanité příznaky, jako jsou chemické struktury samostatných sloučenin (Pitt, 2000).

Diagnostika mykotoxikóz je obtížnější z důvodu dlouhé inkubační doby a tendenci deponovat se v organismu savců, což znamená, že i malé koncentrace toxinů v krmivech mohou být potenciálním nebezpečím pro zvířata. Obzvláště

nebezpečným je AFB1, který je ale těžce diagnostikovatelný (Burchard, 1984). Mykotoxikózy a jejich stanovení je celkem obtížné, protože některé příznaky onemocnění jsou podobné jiným příčinám onemocnění. Správná diagnostika je závislá na odpovídajícím testování mykotoxinů, což zahrnuje správné odebrání a přípravu vzorků s použitím adekvátní analýzy (Richard, 2007).

2.3 Vliv na zdravotní stav zvěře a zvířat

Pokud je zaplísňené krmivo, které je kontaminované mykotoxiny, zkrmováno zvěři, tak se dané toxiny dostávají do organismu zvěře, kde zůstávají nějakou dobu ve tkáních (ve vnitřnostech, ale i svalovině). Pokud člověk požije takto kontaminovanou zvěřinu, tak se mohou toxiny dostávat i do organismu lidí (Šmerák, 2003).

Již v 90. letech minulého století začala být problematice aflatoxinům věnována určitá pozornost. Tento mykotoxin byl zaznamenán v orgánech vybraných druhů volně žijící zvěře. Včetně zvěře zaječí (Bukovjan *et al.*, 1990, 1992).

U zajíce polního byly prováděny mnohé studie, které zkoumaly reakce mykotoxinů na jejich zdravotní stav. Je dokázáno, že jsou zaznamenávány jak změny v krevním séru, kdy je zvýšená hladina bilirubinu, jaterních testů a snížení celkových bílkovin, tak i na vnitřních orgánech. K obdobným výsledkům se dopracoval i Šilha (2005). Při subklinické formě aflatoxikózy, způsobené aflatoxinem B1, byly při biochemickém vyšetření zaznamenány změny v hodnotách ALT, AST, GGT (Bukovjan *et al.*, 1991).

Působení mykotoxinů prostřednictvím krmiva může vést k akutní intoxikaci u zvířat. Chronická intoxikace je vyvolána působením nízkých dávek toxinů, která ale nemusí být detekovatelná, ale přitom může mít za následek snížený přírůstek hmotnosti, sníženou produktivitu a zvýšenou náchylnost k infekcím (Fink-Grenmels, 1999). Mykotoxiny mají na monogastriká zvířata různé akutní i chronické účinky, v závislosti na druhu a náchylnosti. Obecně odolnější vůči nežádoucím účinkům mykotoxinů jsou přežvýkavci, u kterých jsou mikroorganismy v batoru schopny mykotoxiny degradovat na méně toxické metabolity (Hussein a Brasel, 2001).

Mykotoxiny vyvolávají toxické účinky, mezi které například patří jaterní, ledvinová a hematopoetická toxicita, imunitní toxicita, reprodukční toxicita a toxicita plodu, dále teratogenita a především karcinogenita (Creppy, 2002).

Nejvíce náchylnou věkovou kategorií při konzumování kontaminovaného krmiva jsou mladá zvířata, ale odolní nejsou ani dospělí jedinci. Následkem konzumace nekvalitního krmiva, obsahující toxiny, může být úhyn jedince nebo snížený přírůstek mláďat v příštím roce (Rajský *et al.*, 2012).

Aflatoxiny a jejich toxické účinky jsou charakterizovány poškozením jater, hemoragií, koagulopatií i smrtí. Pokud jsou zvířata vystavena dlouhodobějšímu nízkému působení aflatoxinů, vzniká chronická toxicita, která je spojena s řadou zákeřnějších účinků, jako je neoplazie, narušení reprodukce, snížení hmotnosti a potlačení imunitního systému (Lawson *et al.*, 2006). Aflatoxikóza se dá diagnostikovat podle klinických příznaků, ale zejména podle vyšetření krve a stanovení aflatoxinů přímo v krmivu. Krevní testy aflatoxikózu prokazují podle zvýšení jaterních testů, zvýšení bilirubinu, snížení albuminů. Proti aflatoxikóze žádná léčba neexistuje, je zapotřebí začít s ochrannou léčbou jater a je nutné zabránit zvířeti další příjem kontaminovaného krmiva (Havlíček *et al.*, 2014).

Plísně rodu *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* a další) mohou způsobovat onemocnění zvané aspergilóza. Aspergilóza napadá vnitřní orgány ptáků a savců, nejčastěji se projevuje tvorbou žlutošedých uzlíků v plicní tkáni a na vzdušných vacích. U pernaté zvěře bylo zjištěno nejvíce u bažantů a kachen. Nejvíce se vyskytuje v intenzivních chovech pernaté zvěře. Ptáci se nakazí po vdechnutí spór z krmiva nebo z podestýlky (Červený *et al.*, 2003). V plicích srnčí a méně pak zaječí zvěře může být lokalizován tzv. plicní aspergilom (Bukovjan, 1992).

Pokud zvěř hyne a nebo vykazuje abnormální či vážné zdravotní potíže, ale jinak vše vypadá v pořádku, je nutno brát v úvahu intoxikaci krmiva fusáriovými mykotoxiny (Mohelský, 2013b).

Účinky ochratoxinu A jsou různé, byly prokázány imunotoxické, karcinogenní a silně teratogenní účinky. OTA poškozuje játra i ledviny, čímž může způsobit nefrotoxikózu nebo fibrózu ledvin. Při poškození ledvin u prasat se může

vyskytnout polydipsie a polyurie. U prasat, drůbeže i u psů může být ochratoxinem A vyvolána i nefropatie (Suchý a Herzig, 2005). Nejčastěji projevujícím se mykotoxinem v chovech drůbeže, i v chovech bažantů, je ochratoxin A, který způsobuje poškození jater, ledvin a centrální nervové soustavy. Dalšími následky působení OTA je snížení hmotnosti, snížená produkce vajec se zhoršenou kvalitou skořápky (Mohelský, 2013a).

Trichotheceny mezi své toxické účinky zahrnují gastrointestinální účinky, jako je zvracení, průjem, zánět střev, nechutenství, anémie, leukopenie, poruchy reprodukce (Whitlow *et al.*, 2010). Deoxynivalenol působí jako imunosupresivum, což má za následek narušení správné funkce ledvin. Má i hemolytický účinek působící na erytrocyty. Během akutní otravy může docházet k nekróze gastrointestinálního systému, kostní dřeni a lymfatických tkání (Belajová, 2005).

Kukuřice, ječmen i pšenice kontaminované zearalenonem mají za následek problémy s pohlavními orgány u zvířat, nejvíce u prasat. ZEA u prasnic vyvolává edémové otoky vulvy, reprodukční poruchy, jako je neplodnost a potraty, malá selata s nižší velikostí vrhu, vstřebání nebo mumifikace plodu. U prasat způsobuje atrofie varlat, snížené libido (Pitt, 2000).

Pokud zvířata přijmou vyšší koncentrace zearalenonu v krmivu, může u nich dojít k hyperestrogenizaci nebo dalším reprodukčním poruchám, jako jsou nepravidelné říje, atrofie vaječníků, folikulární cysty, zvětšení vulvy nebo dělohy, záněty dělohy, výhřezy pochvy a další poruchy. Chronický příjem ZEA může mít u samců negativní vliv na vývoj pohlavních orgánů a tvorbu spermií. U jalovic dochází ke zvětšení mléčné žlázy již u prepubertálních jedinců. Pokud je zearalenon a deoxynivalenol produkován stejnou plísní, může docházet k synergickému účinku, čímž stoupá toxicita zearalenonu (Havlíček *et al.*, 2014).

Tab. č. 7: Druhy hlavních mykotoxinů a jejich fyziologické účinky (Turner et al, 2009)

Mykotoxiny	Hlavní účinky na zdraví zvířat
Aflatoxiny	Karcinogenní, narušení imunitního systému, akutní hepatitida
Citrinin	Nefrotoxický
Fumonisy	Karcinogenní, hepatotoxický, příčinný činitel u leukoencefalomalacie koní
Ochratoxiny	Karcinogenní, nefrotoxický, hepatotoxický, teratogenní
Patulin	Krvácení do mozku a plic
Sterigmatocystin	Karcinogenní, průjmy, jaterní léze, ztráta laktace, ledvinové léze
Trichotheceny	Imunosupresiva, gastrointestinální krvácení
Zearalenon	Estrogenní účinky

Tab. č. 8: Vybrané mykotoxiny a jejich karcinogenita (Ostrý et al., 1997)

Mykotoxin	Kategorizace
Aflatoxiny (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	1
Aflatoxin M ₁	2B
Ochratoxin A	2B
Fumonisy (B ₁ , B ₂)	2B
Fusarin C	2B
Zearalenon	3
Deoxynivalenol	3
Nivalenol	3
Fusarenon X	3
T-2 toxin	3

Pozn.

1 znamená, že to je prokázaný karcinogen pro člověka.

2B znamená, že to je možný karcinogen pro člověka.

3 znamená, že zatím nebyl klasifikován jako karcinogen pro člověka.

2.4 Riziko pro konzumenty

Největší riziko otrav mykotoxiny hrozí pravděpodobně lidem z přímé konzumace kontaminovaných obilovin, luštěnin a zeleniny. Riziko u potravin živočišného původu je menší, i když byly mykotoxiny nalezeny v mase, mléce a ve vejcích. Mykotoxiny je možné nalézt i ve zpracovaných surovinách např. v masných produktech (Rada, 2004).

Zdraví matky i dítěte může být ovlivněno řadou různých mykotoxinů, jako jsou aflatoxiny, fumonisiny, ochratoxin a zearalenon, které se nacházejí v kontaminovaných potravinách, jak rostlinného, tak i živočišného původu. Plod může být přímo ohrožen v případě, pokud mykotoxiny překročí placentární bariéru (Hof, 2016).

Za jedny z nejčastějších kontaminantů potravin lze považovat aflatoxiny. Aflatoxiny mohou způsobit biochemické, imunologické a metabolické poruchy plodu, které mohou mít za následek intrauterinní zpomalení růstu a nízké porodní hmotnosti narozeného dítěte (Shuaib *et al.*, 2010).

Aflatoxikóza se dá rozdělit na akutní nebo chronickou. Akutní otravy se nyní vyskytují ojediněle v rozvojových zemích za předpokladu, že jsou dané potraviny kontaminovány aflatoxiny. Mezi příznaky akutní otravy aflatoxiny patří zvracení, bolesti břicha, edém mozku nebo plic, ztučnění a nekróza jater (Modrá *et al.*, 2014). Pohanka (2008) uvádí, že akutní aflatoxikózy vznikají nadměrnou intoxikací, ke které dochází při jednorázovém příjmu vysokých dávek aflatoxinů. Jako nejzávažnější následek uvádí, poškození jater, které může vyvolat i jejich následné selhání.

Pokud jsou lidé vystaveni dlouhodobému, ale nízkému působení aflatoxinů, mohou u nich vyvolat několik onemocnění

- 1) karcinom jater – toto onemocnění se vyskytuje zejména u lidí ve střední a západní Africe a jihovýchodní Asii, vzniká vzájemným působením hepatitidy B nebo C a aflatoxinů
- 2) ovlivnění reprodukčního systému – postihuje hlavně mužské pohlaví, u kterého dochází k degeneraci a opožděnému vývoji varlat, morfologickým změnám varlat, což má za následek snížení

koncentrace testosteronu a poklesu reprodukčních schopností, dále ke sníženému počtu spermií a dalším příznakům

- 3) ovlivnění imunitního systému – u tohoto onemocnění dochází ke snížení rezistence organismu k bakteriálním, parazitárním a plísňovým infekcím, dále se snižuje imunitní odpověď na vakcinace a také u B a T lymfocytů dochází k poklesu aktivity
- 4) encefalopatie s tukovou degenerací orgánů – připomíná Reyův syndrom,
- 5) pulmonální intersticiální fibróza – vzniká nejspíše inhalací aflatoxinů (Modrá *et al.*, 2014)

Dalším rizikem pro konzumenty je vepřové maso obsahující ochratoxin A. Ochratoxin A je mykotoxin, který je rozpustný v tucích, ale těžko vylučitelný. U prasat se hromadí v depotním tuku a odtud se dostává ke spotřebitelům. Ochratoxin A obsažen v chlebu z pšenice nebo ječmene, patří mezi druhý zdroj rizika pro konzumenty. Byl nalezen i v mateřském mléku a krvi lidí (Pitt, 2000).

2.4.1 Onemocnění u lidí vyvolané mykotoxiny

2.4.1.1 Reyův syndrom

Reyův syndrom neboli syndrom encefalopatie a tukové degenerace vnitřních orgánů byl v mnoha zemích udáván jako příčina vážných zdravotních problémů nebo úmrtí u malých dětí. Etiologie onemocnění však zůstává neznámá. Některé zdroje uvádějí, že možnou příčinou onemocnění je kontaminace potravin aflatoxiny. Podloženo to je i patologickými nálezy, kdy byly nalezeny poškozená játra. U dvou dětí byly v daných tkáních aflatoxiny nalezeny (Becroft a Webster, 1972).

Dvořáčková *et al.* (1974, 1979) považují aflatoxin B1 za jeden z možných etiologických faktorů tzv. Reyova syndromu u dětí. Jedná se o akutní onemocnění, u kterého je charakteristický edém mozku a poškození funkce jater (Šnajdr, 2012). Reyův syndrom má dvě stádia onemocnění. V první fázi tohoto onemocnění jde o respirační potíže, druhá fáze se pak vyznačuje zvracením a průjmy, dále se vyskytují neurologické příznaky, jako jsou křeče a většinou končí smrtí (Malíř *et al.*, 2003).

2.4.1.2 Kwashiorkor

Další onemocnění je kwashiorkor. Toto onemocnění je zapříčiněno příjmem aflatoxinů v potravinách. Vyskytuje se převážně u dětí v rozvojových zemích. U nejtěžších forem kwashiorkor byly aflatoxiny nalezeny ve významných množstvích v potravinách, v krvi i moči u lidí. V některých afrických zemích byly dokonce zjištěny i v mateřském mléku a u novorozců v pupečnickové krvi (Šimůnek, 2004).

2.4.1.3 Akutní kardiální beri-beri

Jedním z dalších onemocnění u lidí po konzumaci kontaminovaných potravin je „žlutá rýžová choroba“ (akutní srdeční beri-beri), související s citreoviridinem nacházející se v plesnivé rýži. Citreoviridin je produkován *Penicillium citreonigrum*, který rychle kontaminuje uskladněnou rýži v chladnějších oblastech Japonska. Další mykotoxikózou u lidí, která se již v dnešní době nevyskytuje, je jedovatá toxická aleukie, běžná v třicátých a čtyřicátých letech 20. století v SSSR. Toto onemocnění bylo způsobeno trichotheceny produkovánými kmeny *Fusarium* v nezralých zrnech obilovin (Peraic *et al.*, 1999).

2.5 Stanovení mykotoxinů

Mykotoxiny můžeme diagnostikovat několika metodami, kdy použité metody lze rozdělit na fyzikálně-chemické a biologické. Detekci daných toxinů rozlišujeme na detekci kvalitativní (látka je nebo není přítomna), semikvantitativní nebo kvantitativní (může stanovovat i množství) (Šimek, 2004).

Houby se vyvíjejí v izolovaných kapsách, což znamená, že nejsou rovnoměrně rozloženy ve skladovaných komoditách. Proto je nutné vypracovat protokol, který zajistí, že odebíraný vzorek k dané analýze bude reprezentativní pro odebíraný materiál. Skoro 90 % chyb spojených s analýzou mykotoxinů ve zkoumaných vzorcích je způsobeno chybně odebranými vzorky. Z důvodu nerovnoměrně rozptýlených mykotoxinů v zrnech nebo v krmivech, je obtížné vzít vzorek, který by dal smysluplný výsledek při analýzách. Mykotoxiny jsou toxické již při velmi nízkých dávkách, což vyžaduje použití citlivé a spolehlivé metody pro jejich diagnostiku (Turner *et al.*, 2009).

Pokud chceme posoudit rizika u mykotoxinů, měli bychom vyřešit stanovení denního tolerovatelného příjmu (TDI), nebo dočasného tolerovatelného týdenního příjmu (PTWI) (Speijers a Speijers, 2004).

Mezi mykotoxiny podstatného významu patří aflatoxiny i ochratoxiny, kvůli kterým se objevil významný výzkum s širokým spektrem detekčních a analytických technik, které se dají označit za praktické a užitečné. Vzhledem k různým strukturám daných sloučenin, toxinů, nepřipadá v úvahu použít pouze jednu standardní techniku pro analýzu nebo detekci (Turner *et al.*, 2009).

V krmivu se dá výskyt plísní produkující mykotoxiny zjišťovat i kultivačními metodami. Mezi používané selektivní půdy pro kultivaci plísní se využívají např. Czapek-Doxův agar, Sabouraudův agar a sladivý agar. Pro zamezení růstu bakterií na kultivačních půdách je možno použití antibiotik (Modrá a Svoboda, 2009).

Existuje mnoho metod založených na laboratorním vyšetření, ale ani u jedné techniky nemůžeme říci, že by vynikala nad ostatními. Mezi nejběžněji používanou patří analytická kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektroskopií (Turner *et al.*, 2009). Mezi další používané metody patří například separační metody,

jako chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a ELISA (Turner *et al.*, 2009).

Při porovnání kvantifikace mykotoxinů metodou TLC (chromatografie na tenké vrstvě) a HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie) musíme uznat, že každá metoda má své pro i proti. Chromatografie na tenké vrstvě není tak přesná (chyba 5 – 10 % dle použitého přístroje) jako vysokoúčinné kapalinové chromatografie, ale čištění vzorku není tak náročné. Vysokou přesnost kvantifikace představuje metoda HPLC, bohužel tato metoda vyžaduje velmi účinné čistící postupy, při kterých ale dochází k podstatným ztrátám. V praxi to může znamenat, že metoda TLC bude mít přesnější výsledky než metoda HPLC (Šimůnek, 2004).

Metodu ELISA řadíme do metod imunochemických, které vedle chromatografických metod jsou hojně využívány pro stanovení mykotoxinů. Imunochemické metody jsou založeny na reakci antigenu (mykotoxinu obsaženého ve sledovaném materiálu) s protilátkou proti tomuto antigenu. ELISA je v této době nejpoužívanější metodou (Modrá a Svoboda, 2009).

2.6 Dekontaminace mykotoxinů

K odstranění mykotoxinů se dají použít fyzikální, chemické nebo biologické metody. Mezi fyzikálně chemické metody patří kombinace tepla a tlaku, použití čpavku nebo chloridu vápenatého. Dnes se v praxi nejvíce používají adsorbenty, které adsorbují mykotoxiny na různé látky (např. živočišné uhlí, minerální jíly), čímž se u mykotoxinů sníží schopnost vstřebávání ze střev do jiných tkání. Dále se dají použít enzymy (esterázy, epoxidázy), které pomocí rozštěpení funkčních skupin degradují mykotoxiny na nezávadné metabolity (Havlíček *et al.*, 2014).

Mezi další způsoby dekontaminace mykotoxinů se řadí chemické metody. První možností snížení aflatoxinů v kontaminovaném krmivu je použití amoniaku. Pomocí amonizace je aflatoxin B1 transformován na méně toxické produkty. Pokud se za vhodných podmínek přidá plynný amoniak nebo hydroxid amonný, může se amonizací snížit hladina aflatoxinů v produktech až o 99 %. Další metodou, která se dá použít, je ozonizace (Chaytor *et al.*, 2011).

U biologických metod jsou k dekontaminaci mykotoxinů využívány buď bakterie nebo enzymy. Při biologickém způsobu dekontaminace dochází k chemickým změnám ve struktuře mykotoxinů. U obou možností může docházet k vytvoření stejně toxických produktů, jako měly dané mykotoxiny (Tamames a Zaviezo, 2003). Velíšek a Hajšlová (2009) uvádějí, že vzniklé metabolity mohou být buď méně toxické než daný mykotoxin a nebo mohou být toxicky nezávadné. K jedné z výhod při použití biologických metod u dekontaminace mykotoxinů v krmivech patří, že se nemusejí používat agresivní činidla, která mohou negativně ovlivnit kvalitu dekontaminovaného krmiva. Mezi používané bakterie patří některé druhy plísní rodu *Rhizopus* nebo bakterie rodu *Flavobacterium aurantiacum*.

Enzymatická degradace neboli biotransformace je velmi účinnou metodou dekontaminace mykotoxinů, které jsou neadsorbovatelné, např. DON nebo T-2 toxin. Účelem této metody je degradace mykotoxinů v trávicím traktu zvířat. Toxicitu trichothecenů má za následek 12.13-epoxy skupina, která je při procesu biotransformace odstraněna, čímž se výrazně snižuje toxicita trichothecenů. U zearalenonu dochází ke ztrátě estrogenních účinků. Při analýze nebyl nalezeny alfa ani beta zearalenon, které mají ještě větší estrogenní účinky než samotný ZEA.

Nejběžnější metodou používanou proti mykotoxinům a mykotoxikózám jsou tzv. adsorbenty (vyvazovače mykotoxinů v krmivu). Tyto vyvazovače mají schopnost vyvézt mykotoxiny z gastrointestinálního traktu. Nevýhodou je, že jsou nejvíce účinné na aflatoxiny, které ale nepředstavují problém v našich podmínkách. U nás to jsou nejvíce DON, T-2 toxin a ZEA, jako uvádí například Pavelková a Bořutová (2012).

3. Metodika

3.1 Úvod

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení vyšetřených vzorků u uhynulých a odlovených kusů daňčí zvěře na obsah aflatoxinu B1 v játrech. Celkem bylo vyšetřeno 221 vzorků daňčí zvěře. Vzorky byly rozděleny podle typu uhynulý – odlovený, dále podle pohlaví samci – samice a podle věku, kdy byly jednotlivé roky rozděleny do určitých kategorií. Rozdělení podle typu vycházelo, že 95 vzorků bylo z uhynulých kusů a 126 vzorků z kusů odlovených - nejčastěji sanitární odstřel. U pohlaví to bylo 54 vzorků samčího pohlaví a 167 vzorků samičího pohlaví. Vyšetřeny byly i různé věkové kategorie, jak juvenilní jedinci, tak i 10ti letí jedinci. Bylo vytvořeno 5 věkových kategorií od A do E, skupina A byla do 1 roku, skupina B od 2 do 3 let, skupina C od 4 do 5 let, skupina D od 5 do 6 let a skupina E byla nad 7 let. Věk daných kusů byl určen podle úbrusu chrupu.

Vyšetřené vzorky pocházejí z oborně chovaných kusů daňčí zvěře (Dama dama L.). Názvy jednotlivých obor, z kterých vyšetřované vzorky pocházejí, nebyly zveřejněny, protože dané obory si to nepřály. Jedná se o obory jak soukromé, tak i obory Lesů České republiky. Vzorky byly sbírány několik let, v průběhu byly vyšetřeny a nyní i vyhodnoceny.

Pro vytvoření vhodných dat a jejich analýzu byly soubory vloženy do programu Microsoft office Excel. K vyhodnocení vyšetřených vzorků byly použity statistické metody s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$, kdy je pravděpodobnost chyby 1. druhu rovna 5 %.

3.2 Odběr a vyšetření vzorků

3.2.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků a jejich vyšetření proběhlo ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i se sídlem Jíloviště – Strnady na oddělení monitoringu, fyziologie a chorob zvěře podle schválených norem, které jsou ustanoveny pro řešení výzkumných a státních úkolů, jsou to metodiky N 03-331-865-01 a 12-331-814/03, C 16-331-207/01-04.

K odběru vzorků došlo po úhynu nalezené ohlášené zvěře nebo odlovu určených kusů zvěře, poté byla provedena extrakce a samotné vyšetření biologického materiálu a výsledná koncentrace aflatoxinu B1 v játrech byla stanovena screeningovými radioimunologickými metodami (metoda RIA). Pro upřesnění výsledků, které byly stanoveny metodou RIA, byla použita ještě plynová chromatografie. Ke každému odebranému vzorku byl přiložen protokol o odběru vzorků. Vzorky byly odebrány do speciální čisté nádoby.

3.2.2 Vyšetření vzorků

Jako jedním z prvních kroků, pro vyhodnocení koncentrace aflatoxinů B1 v játrech, bylo provedení histologického vyšetření. Nejprve musela být provedena pitva u odlovených kusů, kdy byli odebírány játra v rozměrech 10 x 10 mm nebo odebrání vhodných vzorků u uhynulých kusů. Takto odebrané vzorky byly řádně označeny zkratkou latisnkého názvu, z kterého je biologický materiál odebrán (HEP (hepar)– játra) a číslem vyšetřovaného jedince. Následné histologické vyšetření bylo provedeno v co nejkratší době, ihned po odebrání a správném označení vzorků. Pokud nemohlo být vyšetření provedeno bezprostředně, musely být vzorky uchovány při teplotě -21°C. Používanou metodou u histologického vyšetření byla parafinová metoda. Odebrané vzorky byly obarveny hematoxylin-eozinem (HE), v případě dalších požadavků lze využít selektivní a speciální metody jako jsou například Hematoxylin-eozin-Luxolová modř, Perlsova ferrokyanidová reakce, Sudanová a Nisslova modř. Poté byly takto připravené preparáty zkoumány ve fluorescenčním mikroskopu při vlnové délce 366 nm a dvou vlnách ultrafialového záření – 425 a 480 nm.

Poté byla prováděna extrakce neboli vyluhování. Význam extrakce spočívá v transportu co největšího množství zkoumané látky do vhodného rozpouštědla. Při extrakci byly používány laboratorní třepačky. Následně samotné vzorky byly čištěny, protože všelijaké nečistoty a příměsi nám negativně působily na správné vyhodnocení koncentrace aflatoxinů. Čištění (imunoafinní čištění) bylo prováděno přes imunoafinní kolonky, které představují propustné gely, v nichž jsou uloženy specifické protilátky proti mykotoxinu – aflatoxinu. Extrakt je protlačen nebo sám proteče přes kolonku, nežádoucí látky jsou odplaveny a kolonky jsou promyty roudpouštědlem, které rozruší vazbu mykotoxin – protilátka.

Hlavními metodami, kterými byly aflatoxiny v játrech zkoumány, jsou metody RIA a plynová chromatografie. Metoda RIA (radioimunoassay) spojuje jednoduchou imunologickou reakci antigenu s radioaktivně značenou protilátkou. Patří mezi jedny z nejpoužívanějších screeningových imunologických a biologických metod pro stanovení mykotoxinů. Mykotoxiny při metodě RIA působí jako hapteny, což znamená, že při reakci antigenu s protilátkou nevyvolávají imunitní odezvu s následnou tvorbou protilátek. Specifické protilátky se vytvářejí až po navázání na vhodný nosič, kterým může být například bílkovina.

Metoda GC byla použita při naměření extrémních hodnot aflatoxinů B1. Princip plynové chromatografie spočívá na systému plyn – pevná látka nebo plyn – kapalina.

3.3 Postup zpracování dat

Po obdržení výsledných hodnot aflatoxinů B1 v játrech uhynulých nebo odlovených kusů daňčí zvěře, byly tyto data zpracována do tabulek v programu Microsoft Office Excel. V tomto programu byla roztríděna pomocí kontingenčních tabulek a podle nich byly vypracovány grafy, které znázorňují dané kontingenční tabulky.

Poté byla data vyhodnocena pomocí programu STATISTICA Cz 12 podle typu (uhynulé, odlovené), věku (1 až 10 let), pohlaví (samci, samice). K vyhodnocování výsledků byly použity popisné statistiky, Mann-Whitneyův test, Kruskal-Walisova ANOVA, jednoduchá regrese, kterou se vyhodnocovala závislost koncentrace aflatoxinů B1 na věku. Metoda popisných statistik vychází ze zjišťování

a sumarizace informací, které jsou zpracovávány do tabulek nebo grafů a z daných informací jsou vypočítávány číselné charakteristiky, jako jsou průměr, minimum a maximum, rozptyl, směrodatná odchylka. Mann-Whitneyův test patří do neparametrických testů, které jsou používány pro porovnání souborů statistických dat, u kterých nelze předpokládat normální rozdělení. Mann-Whitneyův test je používán pro hodnocení nepárových pokusů, kdy jsou porovnávány 2 různé soubory. Dochází zde k testování hypotézy, zda tyto 2 soubory mají totéž rozdělení pravděpodobností.

Cílem mé práce bylo vyhodnotit soubor uhynulých a odlovených kusů daňčí zvěře z hlediska koncentrace aflatoxinů B1 ve vztahu k věku a pohlaví.

4. Výsledky

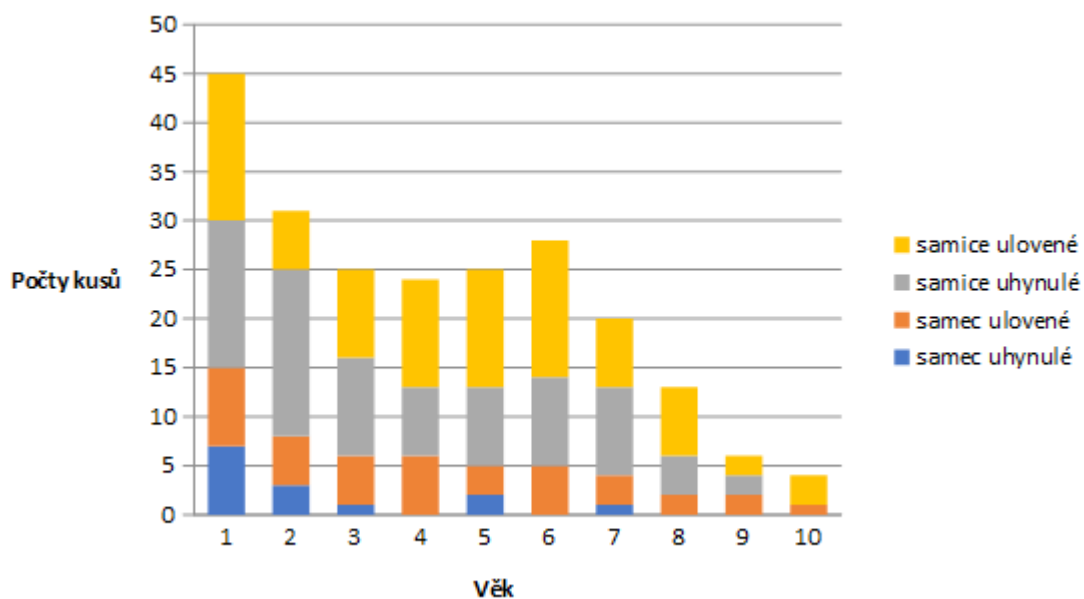
4.1 Naměřené koncentrace aflatoxinu B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech daňčí zvěře

Zpracované tabulky koncentrací AFB1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech uhynulých a odlovených kusů daňčí zvěře jsou umístěny v příloze. Pro lepší přehled byla vytvořena tabulka a následně i graf, které ukazují počty odebraných vzorků v jednotlivých kategoriích zvířat. Poté byl vytvořený další graf, který znázorňuje maximální koncentraci aflatoxinu B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) mezi typem, věkem, tak i pohlavím.

Tab. č. 9: Rozdělení odebraných vzorků podle počtu kusů daňčí zvěře

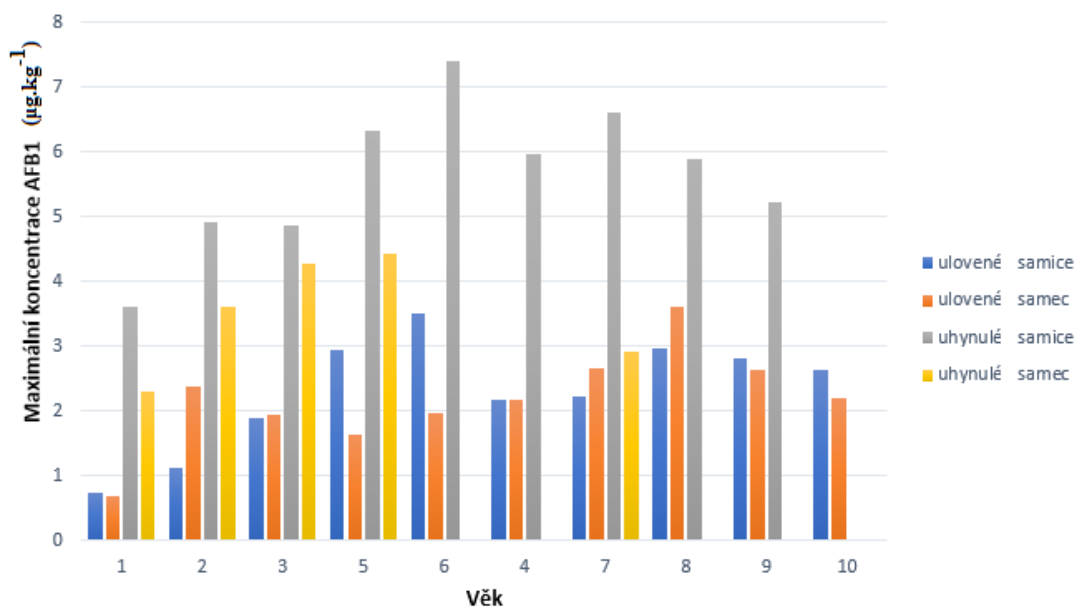
Počty odebraných vzorků v jednotlivých kategoriích zvířat							
Věk	Úhyn		Úhyn celkem	Odlov		Odlov celkem	Celkem
	Samec	Samice		Samec	Samice		
1	7	15	22	8	15	23	45
2	3	17	20	5	6	11	31
3	1	10	11	5	9	14	25
4	-	7	7	6	11	17	24
5	2	8	10	3	12	15	25
6	-	9	9	5	14	19	28
7	1	9	10	3	7	10	20
8	-	4	4	2	7	9	13
9	-	2	2	2	2	4	6
10	-	-	-	1	3	4	4
Celkem	14	81	95	40	86	126	221

Graf č. 1: Rozdělení odebraných vzorků podle počtu kusů daňčí zvěře



Na grafu č. 1 vidíme rozdělení odebraných vzorků podle počtu kusů a daňčí zvěře. Z toho grafu vidíme, že samice převládají. Nejméně pak bylo vzorků uhynulých samců.

Graf č. 2: Maximální koncentrace AFB1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)



Na grafu č. 2 vidíme maximální koncentrace AFB1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) mezi uhynulými a odlovenými samci a samicemi. Nejvyšší koncentrace aflatoxinu B1 v játrech byla naměřena u uhynulé 6ti leté samice ($7,39 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

4.2 Statistické vyhodnocení výsledků

4.2.1 Typ

Vzorky byly odebrány z uhynulých i odlovených kusů daňčí zvěře. Vzorků z uhynulých kusů daňčí zvěře bylo odebráno k vyšetření 95 a z odlovených kusů bylo odebráno 126 vzorků. Vyšetřované vzorky byly vyhodnocovány popisnými statistikami a Mann-Whitneyův testem.

4.2.1.1 Popisné statistiky

Tab. č. 10: Popisné statistiky pro typ

Proměnná	Počet pozorování	Průměr	Minimum	Maximum	Rozptyl	Směrodatná odchylka
Úhyn i odlov	221	2,097511	0,190000	7,390000	2,329251	1,526188
Úhyn	95	3,304105	0,980000	7,390000	1,931407	1,389751
samec	14	2,692857	1,690000	4,420000	0,860053	0,927390
samice	81	3,409753	0,980000	7,390000	2,052960	1,432815
Odlov	126	1,187778	0,190000	3,610000	0,706366	0,840456
samec	40	1,247000	0,210000	3,610000	0,786078	0,886610
samice	86	1,160233	0,190000	3,510000	0,675685	0,822000

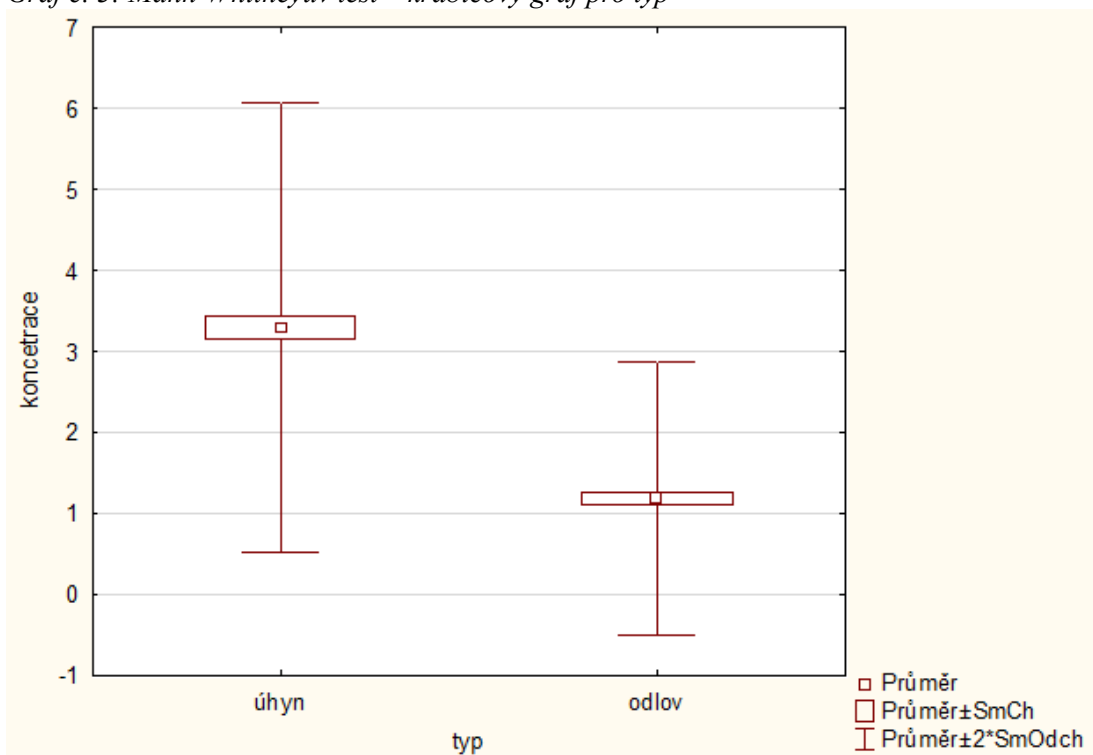
Na základě výsledků z uvedené tabulky si můžeme položit ihned několik hypotéz. Zda je, a jak je veliký, rozdíl mezi uhynulými a odlovenými kusy daňčí zvěře, které pohlaví je vnímavější na aflatoxin B1. Tyto hypotézy si můžeme následně statisticky ověřit. V této tabulce vidíme, že vzorků z uhynulých kusů bylo odebráno a vyšetřeno méně než z kusů odlovených, přesto ale mají uhynulé kusy vyšší obsah aflatoxinu B1 v játrech než kusy odlovené v průměru o 2,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a v maximální koncentraci se liší o 3,78 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

4.2.1.2 Mann-Whitneyův test

Tab. č. 11: Mann-Whitneyův test pro typ

Proměnná	Úhyn	Odlov	U	Z	p-hodnota	Počet pozorování úhyn. kusů	Počet pozorování odlov. kusů
Koncentrace	15518,5	9012,5	1011,5	10,56782	0,000000	95	126

Graf č. 3: Mann-Whitneyův test – krabicový graf pro typ



Mann-Whitneyův test prokázal statisticky průkazný rozdíl mezi uhynulými a odlovenými kusy daňčí zvěře z hlediska koncentrace aflatoxinu B1. Uhynulé kusy mají vyšší obsah aflatoxinu B1 v játrech než kusy odlovené v průměru o $2,12 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Podle p – hodnoty = 0,000000 se potvrdil statisticky vysoce významný rozdíl mezi uhynulými a odlovenými kusy daňčí zvěře.

4.2.2 Pohlaví

Celkem bylo vyšetřeno 221 vzorků, z čehož bylo 54 vzorků samčího pohlaví a 167 vzorků samičího pohlaví. Vyšetřované vzorky byly vyhodnocovány popisnými statistikami a Mann-Whitneyův testem, protože data nesplňovala podmínky pro použití parametrického t-testu.

4.2.2.1 Popisné statistiky

Tab. č. 12: Popisné statistiky pro pohlaví

Proměnná	Počet pozorování	Průměr	Minimum	Maximum	Rozptyl	Směrodatná odchylka
Samec	54	1,621852	0,210000	4,420000	1,198434	1,094730
Samice	167	2,251317	0,190000	7,390000	2,606927	1,614598

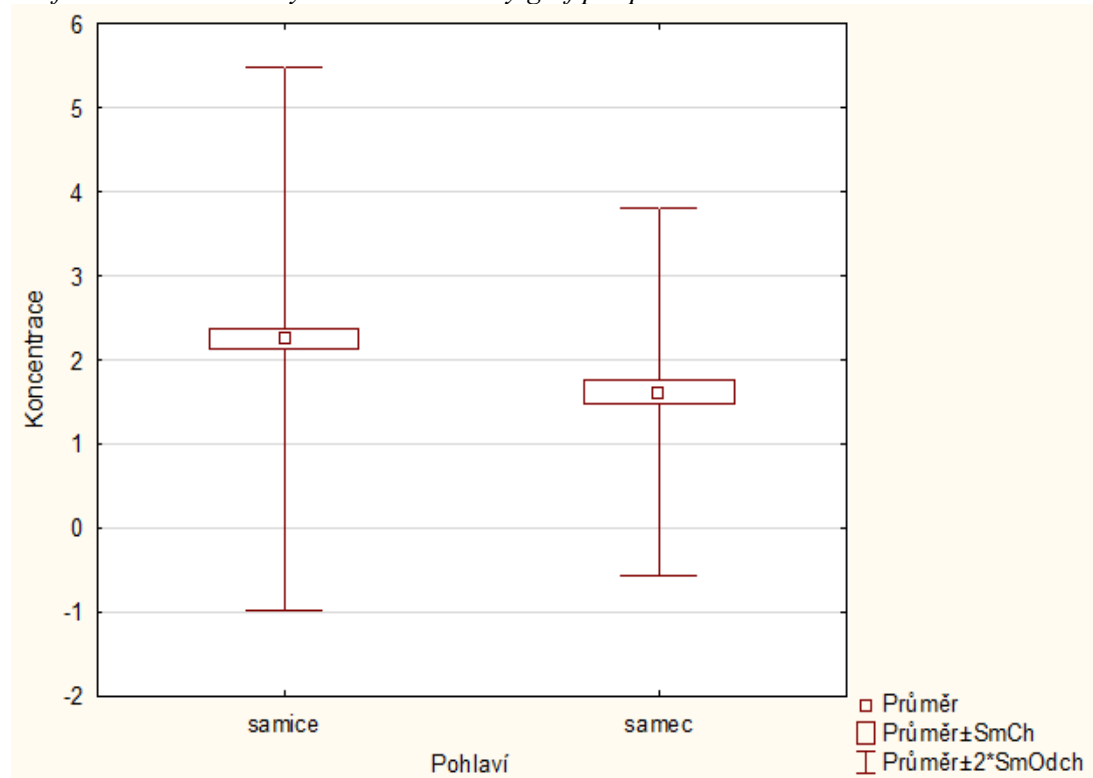
Z průměrů \pm směrodatné odchylky u samec a samice se můžeme domnívat, že samice jsou náchylnější a více vnímavější na aflatoxin B1. Můžeme si povšimnout rozdílů v průměru, kdy průměr u samic je $2,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a u samců to je $1,62 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Potvrzují to i maxima, kdy u samice je vyšší obsah aflatoxinu B1 v játrech o $2,97 \mu\text{g.kg}^{-1}$ než u samce.

4.2.2.2 Mann-Whitneyův test

Tab. č. 13: Mann-Whitneyův test pro pohlaví

Proměnná	Samice	Samec	U	Z	p-hodnota	Počet samic	Počet samců
Koncentrace	19466,00	5065	3580,000	2,27322	0,023014	167	54

Graf č. 4: Mann-Whitneyův test - krabicový graf pro pohlaví



Opět i zde Mann-Whitneyův test potvrzuje výsledky z popisných statistik. Ukazuje nám, že samice mají v průměru vyšší obsah aflatoxinů B1 v játrech o $0,63 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ než samci. Tento výsledek by mohl být ovlivněn počtem vzorků samčího a samičího pohlaví, kdy ale tento počet odebraných vzorků spíše ovlivnil to, že porovnávané soubory měly různé rozptyly a tudíž nešlo použít parametrický t-test. Podle p -hodnoty = 0,023014 se potvrdil statisticky významný rozdíl mezi samci a samicemi.

4.2.3 Věk

Stáří kusů daňčí zvěře v souborech jak uhynulých, tak odlovených bylo velmi rozmanité. Mezi vyšetřovanými vzorky se nacházeli jak juvenilní jedinci, tak i 10ti letí jedinci, kteří byli pouze ve skupině odlovených kusů. Zvířata byla poté podle věku rozdělena do 5 kategorií, kdy kategorie A byla do 1 roku, kategorie B byla od 2 do 3 let, kategorie C byla od 4 do 5 let, kategorie D byla od 5 do 6 let a kategorie E byla nad 7 let. Vyšetřované vzorky byly vyhodnocovány popisnými statistikami, dále Kruskal-Walisova anovou, jelikož data nesplňovala předpoklady pro použití parametrického testu ANOVA. Závislost koncentrace aflatoxinu B1 na věku zvířat byla vyhodnocována pomocí lineární regrese.

4.2.3.1 Popisné statistiky

Tab. č. 14: Popisné statistiky pro věk

Proměnná	Počet pozorování	Průměr	Minimum	Maximum	Rozptyl	Směrodatná odchylka
Všechny sk.	221	2,097511	0,190000	7,390000	2,329251	1,526188
A	45	1,207333	0,190000	3,610000	0,808838	0,899354
B	56	1,926429	0,210000	4,910000	1,451423	1,204750
C	49	2,066122	0,230000	6,330000	3,075558	1,753727
D	48	2,703750	0,290000	7,390000	2,730275	1,652354
E	23	3,057391	0,590000	5,900000	2,040429	1,428436

Podle výsledků z popisných statistik můžeme vidět, že nejvíce vzorků bylo ve skupině B, což byla kategorie 2 až 3 roky. Maximální koncentrace $7,39 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ byla naměřena ve skupině D, nebo-li v kategorii od 5 do 6 let. Nejvyšší průměr $3,06 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ však vychází u skupiny E, kdy v této kategorii byly kusy zvěře nad 7 let věku. To může být ale způsobeno nízkým počtem vyšetřených vzorků z této skupiny.

4.2.3.2 Kruskal-Walisova ANOVA

Výsledky Kruskal-Walisovy ANOVY

Počet pozorování = 221, Stupně volnosti = 4, p-hodnota = 0,0000

Tab. č. 15: Kruskal-Walisova ANOVA pro věk

Koncentrace (závislá)	Kód	Počet platných	Součet pořadí	Průměr pořadí
Věk (nezávislá)				
A	101	45	3153,500	70,0778
B	102	56	6137,000	109,5893
C	103	49	5197,000	106,0612
D	104	48	6476,000	134,9167
E	105	23	3567,500	155,1087

Jako výsledek Kruskal-Walisova testu uvádíme dosaženou hladinu významnosti. Dosažená p-hodnota = 0,0000 nám potvrzuje, že jsme prokázali statisticky vysoce významný rozdíl mezi věkovými skupinami. Kruskal-Walisova ANOVA nepracuje s původními hodnotami, avšak s pořadovými čísly, které jim byli přiřazeny. Nulovou hypotézou je rovnost mediánů koncentrace aflatoxinu B1 porovnávaných věkových skupin.

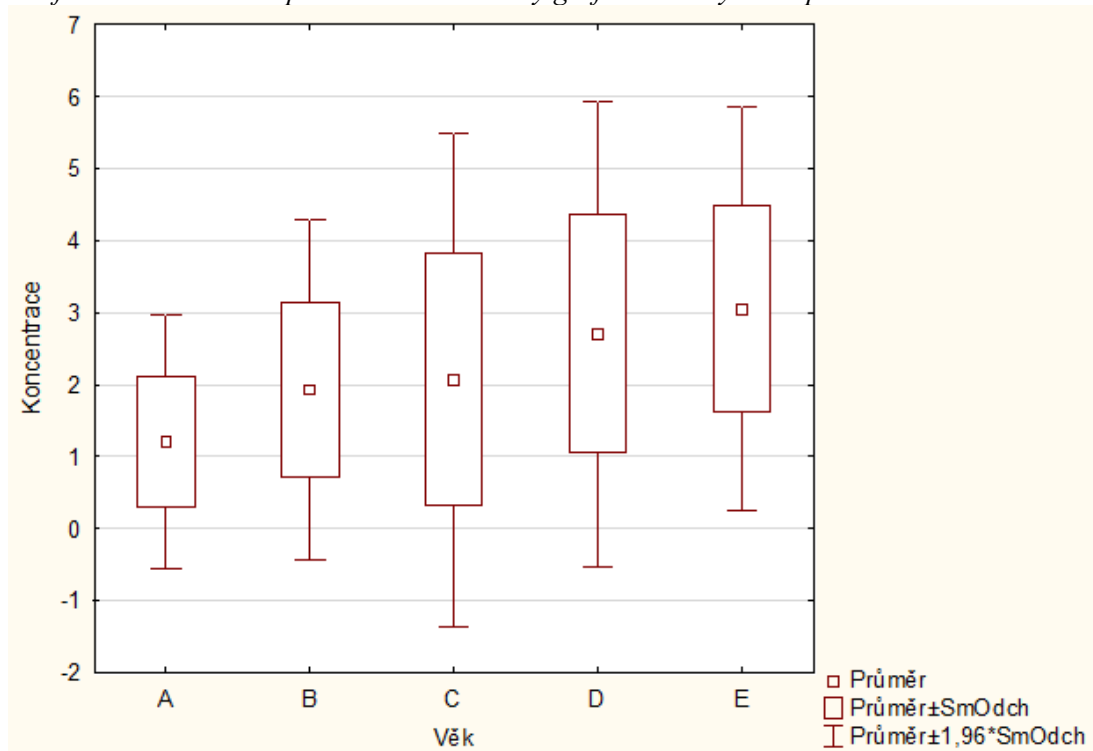
Vícenásobné porovnání p-hodnot: koncentrace

Počet pozorování = 221, stupně volnosti = 4, p-hodnota = 0,0000

Tab. č. 16: Vícenásobné porovnání p- hodnot

Koncentrace	A	B	C	D	E
Věk					
A		0,020246	0,064186	0,000010	0,000002
B	0,020246		1,000000	0,440355	0,040470
C	0,064186	1,000000		0,262714	0,024069
D	0,000010	0,440355	0,262714		1,000000
E	0,000002	0,040470	0,024069	1,000000	

Graf č. 5: Vícenásobné porovnání - krabicový graf dle věkových skupin



Na základě vícenásobného porovnání vidíme statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými věkovými skupinami. Tyto dvojice mají v tabulce p-hodnotu $< 0,05$ a jsou označené červenou barvou. Skupina do 1 roku (A) se tedy významně liší od skupin 2 až 3 roky (B), od 5 do 6 let (D) a nad 7 let (E). Dále jsou významné rozdíly mezi skupinou 2 až 3 roky (B) a nad 7 let (E) a skupinou od 4 do 5 let (C) a nad 7 let (E).

Průměry jednotlivých skupin jsou, průměr skupiny A je $1,21 \mu\text{g.kg}^{-1}$, průměr skupiny B je $1,92 \mu\text{g.kg}^{-1}$, průměr skupiny C je $2,07 \mu\text{g.kg}^{-1}$, průměr skupiny D je $2,70 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a průměr skupiny E je $3,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Průměr skupiny A se liší od průměru skupiny B o $0,72 \mu\text{g.kg}^{-1}$, od průměru skupiny D o $1,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a od průměru skupiny E se liší o $1,85 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Průměr skupiny B se od průměru skupiny E liší o $1,13 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Posledními skupinami, které se od sebe liší, jsou skupina C a E. Průměr skupiny C se liší od průměru skupiny E o $0,99 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Tyto rozdíly vidíme i na přiloženém grafu, kdy skupina A je pouze překrývána skupinou C, proto také mezi nimi nevznikl daný rozdíl. Totéž je i u skupin B i C, u kterých se řádně nepřekrývá jen skupina E, tudíž tam rozdíly vznikají.

4.2.3.3 Regrese

Jednoduchá regrese byla použita pro analýzu závislosti koncentrace aflatoxinu B1 v játrech na věku zvířete.

Výsledky regrese

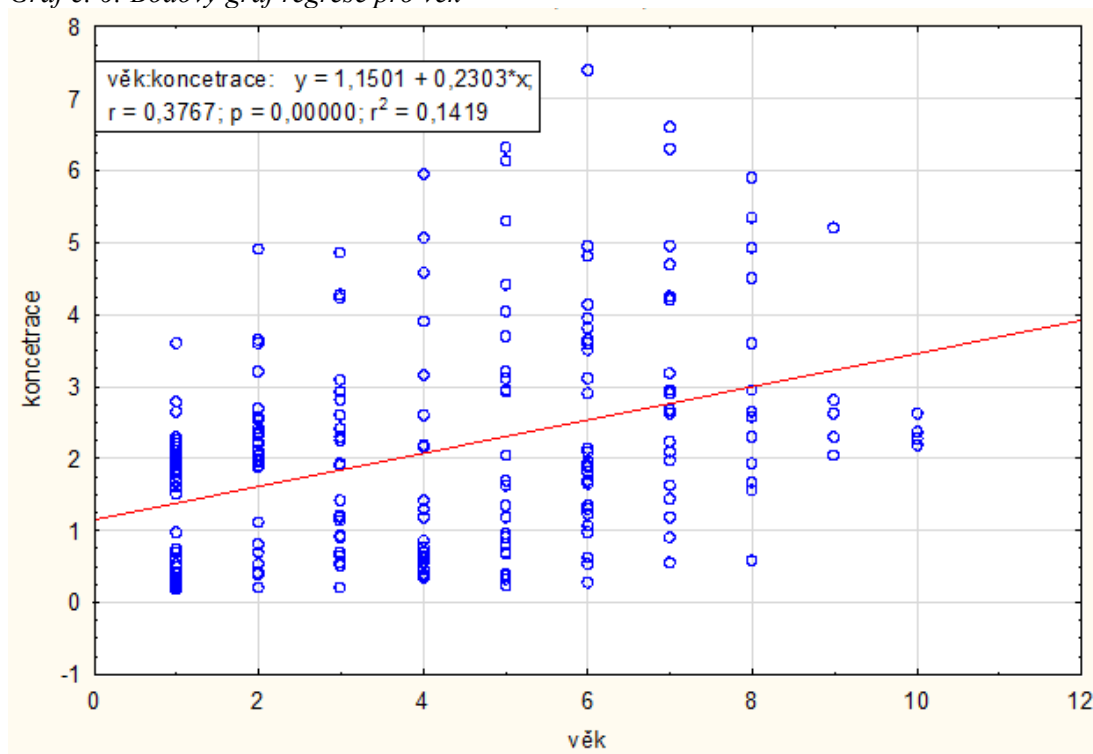
Závisle proměnná: koncentrace, nezávislá: věk

$r = 0,38665768$, $r^2 = 0,14187100$, p-hodnota = 0,000000

Tab. č. 17: Regrese pro věk

N = 221	b*	sm. chyba z b*	b	sm. chyba z b	t (219)	p-hodnota
Absolutní člen			1,150074	0,184059	6,248387	0,000000
věk	0,376658	0,062597	0,230345	0,038281	6,017174	0,000000

Graf č. 6: Bodový graf regrese pro věk



Jako výsledek jednoduché regrese uvádíme p-hodnotu = 0,0000, která nám potvrzuje průkaznost závislosti koncentrace na věku. Dalším výsledkem, který uvádíme, je korelační koeficient $r = 0,3767$, který nám udává těsnost závislosti. V našem případě je těsnost závislosti mírná a typ závislosti je volná závislost. Jedná se o přímou úměru, tedy se stoupajícím věkem stoupá koncentrace AFB1 v játrech.

Koeficient determinace $r^2 = 0,1419$ udává, že regresní rovnice vysvětluje 14 % variability závislé proměnné.

Regresní rovnice : koncentrace aflatoxinu B1 = $1,1501 + 0,2303 * \text{věk}$

4.3 Souhrnné výsledky

Celkem bylo odebráno, vyšetřeno a vyhodnoceno 221 vzorků jaterní tkáně daňka skvrnitého na obsah aflatoxinu B1 v játrech. Vyšetřované kusy byly různého typu (95 uhynulých kusů, 126 odlovených kusů), pohlaví (54 samců, 167 samic), věku (1 až 10 let). Nejvyšší koncentrace aflatoxinu B1 v játrech byla naměřena u uhynulé 6ti leté samice ($7,39 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Výsledky pro typ: uhynulé kusy mají vyšší obsah aflatoxinu B1 v játrech než kusy odlovené v průměru o $2,12 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Výsledky pro pohlaví: samice mají celkově vyšší obsah aflatoxinů B1 v játrech, kdy u samice je maximální koncentrace obsahu aflatoxinu B1 v játrech vyšší o $2,97 \mu\text{g.kg}^{-1}$ než u samce. V průměru je obsah aflatoxinů B1 v játrech u samic vyšší o $0,63 \mu\text{g.kg}^{-1}$ než u samců.

Výsledky pro věk: čím starší zvířata jsou, tím stoupá koncentrace aflatoxinu B1 v játrech. Závislost lze popsat regresní rovnicí koncentrace aflatoxinu B1 = $1,1501 + 0,2303 * \text{věk}$, která vysvětluje 14 % variability koncentrace aflatoxinu B1.

5. Diskuze

Lawson *et al.* (2006) uvádí, že citlivost na účinky aflatoxinů se liší podle věku, pohlaví a stavu výživy. Dhanasekaran *et al.* (2011) zařazuje mezi tyto faktory ještě druh zvířat a plemeno. Toxické účinky mykotoxinů jsou velmi variabilní a závisí na úrovni příjmu, délce trvání působení, fyziologickém stavu a eventuálně na synergickém účinku mezi mykotoxiny (Galvano *et al.*, 2001).

Jedním z faktorů je pohlaví. V mé práci jsem prokázala, že samice jsou vnímavější na aflatoxiny než samci. Toto mé tvrzení však vylučuje výrok, který uvádí Piskač *et al.* (1985), že samci jsou vnímavější na působení aflatoxinů než samice. Slamečka *et al.* (2017) ve své práci uvádí, že pokud jde o pohlaví, tak žádné významné rozdíly ($p > 0,05$) nebyly nalezeny. Tato práce však byla zaměřena na obsah aflatoxinů B1 v játrech a ledvinách u zajíce polního (*Lepus europaeus* Pall). Citlivost k aflatoxinům se může mezi pohlavími výrazně lišit podle koncentrace testosteronu (Leong *et al.*, 2012).

Dalším faktorem je věk. Z více literárních zdrojů je patrné, že mladá zvířata jsou citlivější na účinky aflatoxinů než zvířata starší, dospělá (Piskač *et al.*, 1985; Kalač a Míka, 1997; Slamečka *et al.*, 2017). Podle Lawsona *et al.* (2006) by tato zvířata měla být nejvíce postižena. Výsledky mé práce se shodují s výsledkem práce autora Obremski *et al.* (2006), který uvádí, že nejnižší koncentrace mykotoxinů je pozorována u mladých zvířat, zatím co nejvyšší koncentrace je u zvířat starších.

Hlavními toxickými účinky aflatoxinu B1 jsou karcinogenita, teratogenita, mutagenita, hepatogenita, imunotoxicita (Malíř *et al.*, 2003). Zatím co Brown *et al.* (1967), Elis a Di Paolo (1967) a Di Paolo *et al.* (1969) však uvádějí, že u aflatoxinu B1 může být i fetotoxický účinek. Liu *et al.* (2015) uvádí, že aflatoxin B1 může narušit dozrávání oocytů u prasat změnou epigenetických modifikací, vyvolat oxidativní stres a nadměrnou autofágii a apoptózu.

6. Závěr

Mykotoxiny jsou celosvětovým problémem, jak v chovech hospodářských zvířat, tak u zvířete i u lidí. Mykotoxinům je věnována velmi vysoká pozornost, kdy se stále zkoumá účinnost mykotoxinů a zjišťují se popřípadně další nové symptomy onemocnění, používají se různé metody analýzy a eliminační látky, které slouží pro boj proti mykotoxinům. Nejpoužívanějším způsobem dekontaminace mykotoxinů je v dnešní době používání sorbentů.

Zvěř mykotoxiny přijímá v krmivu, které je zvířeti předkládáno v zimním období. Je to zapříčiněno špatnou kvalitou krmiv nebo nesprávným předkládáním krmiv. Jadrná krmiva by se měla zakládat do koryt, zásobníků nebo krmítek. Nikdy by se neměla zakládat na zem, protože od země nasává vlhkost, která způsobuje vhodné podmínky pro růst plísní. Pokud najdeme zaplísňené krmivo, měli bychom ho okamžitě odstranit. Mnoho uživatelů honiteb spolupracuje se zemědělskými firmami, od kterých často odebírají objemová krmiva, odpady siláže, obilí a jadrná krmiva. Tato jadrná krmiva ale nemusí být v takové kvalitě, kterou bychom očekávali a která je pro zvěř vyhovující.

Mykotoxiny u zvířete způsobují změny na vnitřních orgánech, kdy jsou nejčastěji postižena játra, ledviny, mozek, žlučovody či pohlavních orgánech. Dále způsobují změny v krevním séru, kde vzestupují jaterní enzymy a bilirubin, naopak ale klesá celková bílkovina. Mezi toxické účinky mykotoxinů patří karcinogenní, hepatogenní, teratogenní, metagenní, nefrogenní, estrogenní, strumigenní a imunosupresivní.

Cílem této diplomové práce, bylo vyhodnocení plísní a mykotoxinů u oborně chované daňčí zvěře. Vyšetření probíhalo u uhynulých a odlovených kusů daňčí zvěře na obsah aflatoxinu B1 v játrech. Vyhodnoceno bylo dohromady 221 vzorků, z toho 95 uhynulých a 126 odlovených kusů, 54 samců a 167 samic, ve věku 1 až 10 let. Jednotlivé výsledky poté byly vyhodnoceny zvlášť pro typ, pohlaví i věk. Typ: uhynulé kusy mají vyšší obsah aflatoxinu B1 v játrech než kusy odlovené. Pohlaví: samice mají celkově vyšší obsah aflatoxinu B1 v játrech než samci. Věk: čím starší zvířata jsou, tím stoupá koncentrace aflatoxinu B1 v játrech.

7. Seznam použité literatury

ABBOTT P. (2002) Mycotoxins and Indoor Molds Sean, *Originally published in Indoor Environment CONNECTIONS*, Vol. 3, Issue 4

ADAMS R.S., KEPHART K.B., ISHLER V.A., HUTCHINSON L.J., ROTH G.W. (1993) Mold and mycotoxin problems in livestock feeding, *Department of Dairy and Animal Science*

BECROFT D.M., WEBSTER D.R. (1972): Aflatoxins and Reye's disease, *British medical journal*, 4, 117

BELAJOVÁ E. (2005): Mykotoxíny v potravinovom reťazci. *In Trendy v potravinárstve*, roč. 12., č. 4, s. 2-5.

BETINA V. (1990) : Mykotoxíny: chémia - biológia – ekológia, *Edícia potravinárskej literatúry, Alfa*, Bratislava, 284

BROWN M.H., SZCZECH G.M., PURMALIS B.P. (1967): Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol* 37, 331 - 338

BUKOVJAN K., PROŠEK J., BUKOVJANOVÁ E. (1990): Preliminary Results of the Aflatoxin B1 Content in Liver Tissue in the Hare (*Lepus europaeus* Pall), *Československá hygiena* 35, 1, str. 13 - 18

BUKOVJAN K., BUKOVJANOVÁ E., FOJTÍK P., DVOŘÁK M., MATOUŠKOVÁ E. (1991): Biochemické parametry krevní plazmy zaječí zvěře (*Lepus europaeus* Pall.) I. Jatení transferázy (AST, ALT,GGT), *Biopharm I.*, 5, 175 – 182

BUKOVJAN K., HALLMANNOVÁ A., KARPENKO A. (1992): Konzentration von Aflatoxin B1 in den Organen des freilebenden Wildes, *Fleischwirtschaft* 72, 5, str. 794 – 796

BULLERMAN L.B., BIANCHINI A. (2007) Stability of mycotoxins during food processing, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 119, Issues 1–2, Pages 140–146

BURCHARD F. (1984) Mycotoxins from Mold Fungi - Weapons of Uninvited Fellow-Boarders of Man and Animal: Structures, Biological Activity, Biosynthesis, and Precautions, *Angewandte Chemical International Edition*, 493-505

CREPPY E. E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicology Letters*, Volume 127, Issues 1–3, Pages 19–28

ČERVENÝ J., KAMLER J., KHOLOVÁ H., KOUBEK P., MARTÍNKOVÁ N. (2003): Choroby zvěře, *Encyklopedie myslovosti*, Praha, 402

DHANASEKARAN D., SHANMUGAPRIYA S., THAJUDDIN N., PANNEERSELVAM A. (2011): Aflatoxins and aflatoxikosis in Human and Animals, *Aflatoxins – Biochemistry and molecular Biology*

DI PAOLO J.A., ELIS J., ERWIN H. (1969): Teratogenic response by kamsters, rats and mice to aflatoxin B1, *Nature* 215, 638 - 639

D'MELLO J.P.F. (2000): Anti-nutritional factors and mycotoxins, *In: D'MELLO (ed.): Farm animal metabolism and nutrition*, CABI, New York: 383 – 404

DVOŘÁČKOVÁ I., BRODSKÝ F., CERMAN J. (1974): Aflatoxin – možný faktor jaterních poškození u dětí, *Československá hygiena*, 19: 211 – 216

DVOŘÁČKOVÁ I., PROKOŠ C. (1979): Reye's syndrome in the newborns Reye's Syndrome II., edit. J. F. S. Crocker, Grune and Stratton, 319 – 338

ELIS J., DI PAOLO A. (1967): Aflatoxin B1: Induction of malformations, *Arch. Path.* 83, 53 - 57

FINK-GREMMELS J. (1999) Mycotoxins: Their implications for human and animal health, *Veterinary Quarterly*, 21:4, 115-120

GALVANO F., PIVA A., RITIENI A., GALVANO G. (2001): Dietary strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins, *A review Journal of Food Protection*, 120 - 131

HAIŠLOVÁ J., MALACHOVÁ A., ZACHARIÁŠOVÁ M., KOSTELÁNSKÁ M., KOCOUREK V. (2010): Kontaminace vybraných surovin mykotoxiny, *Výzkumný ústav rostlinné výroby*, Praha, 56

HAVLÍČEK Z. a kolektiv (2014): Zdravotní bezpečnost krmiv, stájové prostředí a výskyt mastitid, *Mendelova univerzita v Brně*, Brno, 264 [online], [cit. 28.8.2017]. dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/21/21-zdravotni_bezpecnost_krmiv_stajove_prostredi_a_vyskyt_mastitid.pdf

HOF H. (2016): Von Nahrungsmitteln ausgehende mikrobiologische Risiken in der Gravidität, *Der Gynäkologe*, Volume 49, Issue 2, 135 - 141

HUSSEIN H.S., BRASEL J.M. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, Volume 167, Issue 2, Pages 101–134

CHAYTOR A.C., HANSEN J.A., VAN HEUGTEN E., SEEL M.T., KIM S.W. (2011): Occurrence and Decontamination of Mycotoxins in Swine Feed, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 5, 723 - 728

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993): Aflatoxins, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, *Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins* 56: 245 - 395

KALACH P., MÍKA V. (1997): Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech, *Ústav zemědělských a potravinářských informací*, Praha, 322

LAWSON B., MACDONALD S., HOWARD T., MACGREGOR S.K., CUNNINGHAM A.A. (2006) Exposure of garden birds to aflatoxins in Britain, *Science of The Total Environment*, Volume 361, Issues 1–3, Pages 124–131

LEONG Y., LATIFF A.A., AHMAD N.L. (2012): Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids, *A short review, Mycotoxin Res.* 28, 79 - 87

LIU J., WANG Q., HAN J., XIONG B., SUN S. (2015) Aflatoxin B1 is toxic to porcine oocyte maturation, *Mutagenesis*, 30 (4): 527-535.

MALÍŘ F., OSTRÝ V. a kolektiv (2003): Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka, *Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů*, Brno, 349

MARASAS W. F.O., GELDERBLOM W.C.A, SHEPHARD G.S., VISMER H.F. (2008) Mycotoxins: detection methods, management, *Public health and agricultural trade*, ISBN – 9781845930820

MILANI J.M. (2013): Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review, *Veterinární Medicína*, 58 (8): 405 – 411

MODRÁ H., SVOBODOVÁ Z. a kol. (2009): Speciální veterinární toxikologie, *Veterinární a farmaceutická univerzita*, Brno, 165

MODRÁ H., SVOBODOVÁ Z., ŠIROKÁ Z., BLÁHOVÁ J. (2014): Toxikologie potravin – vybrané kapitoly, *Fakulta veterinární hygieny a ekologie*, Brno, 87

MOHELSKÝ M. (2012) a: Krmné směsi ve výživě lesní zvěře, *Myslivost*, č. 12, str. 22

MOHELSKÝ M. (2012) b: Obiloviny ve výživě zvěře, *Myslivost*, č. 11, str. 12

MOHELSKÝ M. (2013) a: Odchov bažantů – výživa a prostředí, *Myslivost*, č. 11, str. 17

MOHELSKÝ M. (2013) b: Výživa v období březosti a kojení, příkrm mláďat, *Myslivost*, č. 7, str. 18

MURPHY P.A., HENDRICH S., LANDGREN C., BRYANT C.M. (2006) Food Mycotoxins: An Update, *Journal of food science*, Volume 71, Issue 5, 51 – 65

NEDĚLNÍK J. a kol., (2004): Aktuální stav mykotoxinové kontaminace potravin a produktů rostlinného původu v Evropě v letech 2003 – 2004 a komparace hygienických limitů, *Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí*, Praha, 4 - 5

- NEDĚLNÍK J., MORAVCOVÁ H. (2005): Problematika výskytu mykotoxinů v krmivech dojnice, Výzkumný ústav pícninářský, spol. s.r.o. Troubsko, *Veterinářství* 55, 214-219
- NYENJEL M. E., NDIP N. R., (2013): The challenges of foodborne pathogens and antimicrobial chemotherapy: A global perspective, *African Journal of Microbiology Research*, 2, 1158 – 1172
- OBREMSKI K., ZALEWSKI K., GAJECKA M., GIZEJEWSKI Z., ZIELONKA L., NITKIEWICZ B., GAJECKI M. (2006): Zearalenon intoxication of game animals, *Polish Journal of Natural Sciences*, 1131 – 1138
- OSTRÝ V. (1998): Vlákňité mikroskopické houby (plísně) mykotoxiny a zdraví člověka, *Státní zdravotní ústav*, Praha, 20
- OSTRÝ V., RUPRICH J., ÜBERHUBEROVÁ M., (1997): Metodický návod pro dekontaminaci a rozklad vybraných mykotoxinů v laboratořích, Státní zdravotní ústav, *Centrum hygieny potravinových řetězců*, Brno, 88
- PAVELKOVÁ D., BOŘUTOVÁ R. (2012): Mykotoxiny a ochrana proti cizorodým látkám, *Krmivářství* 3, 26
- PERAIC M., RADIĆ B., LUCIĆ A., PAVLOVIĆ M. (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans, *Bulletin of the World Health Organization*, 754 – 766
- PISKAČ A., KAČMÁR P. (1985): Veterinární toxikologie, *Státní zemědělské nakladatelství*, Praha, 254
- PITT J. I. (2000) Toxigenic fungi and mycotoxins, *British Medical Bulletin* 56 (1): 184-192
- POHANKA M. (2008): Aflatoxiny [online]. [cit. 3.9.2017]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=177>
- RADA V. (2004): Mikrobiální rizika krmiv, *Vědecký výbor výživy zvířat*, Praha, 27 - 30

RADOVÁ-SYPECKÁ Z., HAJŠLOVÁ J. (2003): Incidence mykotoxinů v cereáliích produkovaných v ČR, vazba na agrotechnická opatření, *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*, Praha, 10

RAJSKÝ M., VODŇANSKÝ M., BODO J. (2012): Krmivá a zver: Dužinaté krmivá, *Myslivost*, č. 2, str. 52

RICHARD J.L. (2007) Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview (Article), *International Journal of Food Microbiology*, Volume 119, Issue 1-2, Pages 3-10

SHUAIB F.M.B., JOLLY P.E., EHIRI J.E., YATICH N., JIANG Y., FUNKHOUSER E., PERSON S.D., WILSON C., ELLIS O., WANG J.S., WILLIAMS J.H. (2010): Association between birth outcomes and aflatoxin B1 biomarker blood levels in pregnant women in Kumasi, Ghana, Volume 15, Issue 2, 160 - 167

SLAMEČKA J., CAPCAROVÁ M., JURČÍK R., SLÁDEČEK T. ARGENTE CARRASCOSA M.J., GREŇ A., MASSANYI P. (2017): Seasonal, age and sex fluctuations in aflatoxin B1 content in the liver and kidney of brown hares (*Lepus europaeus* Pall), *Journal of environmental science and health*, Volume 52, 466 - 470

SPEIJERS G.J.A., SPEIJERS M.H.H (2004) Combined toxic effects of mycotoxins, *Toxicology Letters*, Volume 153, Issue 1, Pages 91–98

SUCHÝ P., HERZIG I. (2005): Plísně a mykotoxiny, prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech, *Vědecký výbor zvířat*, Praha, 25

SVOBODOVÁ Z., a kolektiv (2008): Veterinární toxikologie v klinické praxi, *Profi Press*, Praha, 253

SÝKOROVÁ S., NEDĚLNÍK J. (2004): Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě, *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*, Praha, 22 - 23

ŠILHA J. (2005): Nepodceňujme nebezpečí vzniku mykotoxinů v předkládaných krmivech, *Myslivost*, č. 12, str. 38

ŠIMŮNEK J. (2004): Plísňe a mykotoxiny, [online]. [cit. 25.8.2017]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/plisne_a_mykotoxiny.pdf

ŠMERÁK M. (2003): Plísňe a příkrmování zvěře, *Myslivosť*, 8, [online]. [cit. 8.9.2017]. Dostupné z: <http://www.myslivosť.cz/Casopis-Myslivosť/Myslivosť/2003/Srpen---2003/Plisne-a-prikrmovani-zvere>

ŠNAJDR M. (2012): Reyův syndrom – příznaky, projevy, symptomy, [online]. [cit. 16.9.2017]. Dostupné z: <http://www.priznaky-projevy.cz/pediatric/reyuv-syndrompriznaky-projevy-symptomy>

TAMAMES F., ZAVIEZO D. (2003): Dva přístupy v kontrole mykotoxinů adsorpce verusu biotransformace, *Krmivářství*, 2: 28 - 29

TŮMOVÁ E. (2006): Přírodní toxické látky ve výživě hospodářských zvířat, *Vědecký výbor zvířat*, Praha, 33

TURNER N. W., SUBRAHMANYAMB S., PITELSKY S. A. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta*, Volume 632, Issue 2, Pages 168–180

VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. (2009): Chemie potravin, OSSIS, ISBN 978-80-86659-16-9

WASSERBAUEROVÁ K. (2011): Mykotoxiny v silážích, Bakalářská práce, MENDELU Brno, 53, [online]. [cit. 2.9.2017]. Dostupné z: http://is.mendelu.cz/zp/portal_zp.pl?prehled=vyhledavani;podrobnosti=36978;zp=25792;download_prace=1.

WHITLOW L.W., HAGLER W.M., DIAZ D.E. (2010) Mycotoxins in feeds, *Feedstuffs*, 84

ZEMAN L. (2006): Výživa a krmění hospodářských zvířat, *Profi Press*, Praha, 360, 50 - 53

8. Seznam použitých zkratek

AFB₁ – aflatoxin B₁

ALT - alaninaminotransferáza

AST – aspartátaminotransferáza

a_w – aktivita vody

CE – kapilární elektroforéza

ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay

GC – plynnová chromatografie

GGT - gama-glutamyltransferáza

HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografie

IARC – mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

OTA – ochratoxin A

RNA - ribonukleová kyselina

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

UV záření – ultrafialové záření

ZEA - zearalenon

9. Seznam použitých tabulek

- Tab. č. 1: Přehled druhů plísní, produkované toxiny a kontaminované komodity
- Tab. č. 2: 3 nejvýznamnější rody produkující mykotoxiny
- Tab. č. 3: Faktory ovlivňující růst plísní a produkci mykotoxinů
- Tab. č. 4: Obecné charakteristiky pro růst mikromycetů a produkci mykotoxinů v potravinách
- Tab. č. 5: Maximální přípustné koncentrace aflatoxinu B1 v krmivech
- Tab. č. 6: Mykotoxiny a komodity, ve kterých se mohou vyskytnout
- Tab. č. 7: Druhy hlavních mykotoxinů a jejich fyziologické účinky
- Tab. č. 8: Vybrané mykotoxiny a jejich karcinogenita
- Tab. č. 9: Rozdělení odebraných vzorků podle počtu kusů daňčí zvěře
- Tab. č. 10: Popisné statistiky pro typ
- Tab. č. 11: Mann-Whitneyův test pro typ
- Tab. č. 12: Popisné statistiky pro pohlaví
- Tab. č. 13: Mann-Whitneyův test pro pohlaví
- Tab. č. 14: Popisné statistiky pro věk
- Tab. č. 15: Kruskal-Walisova ANOVA pro věk
- Tab. č. 16: Vícenásobné porovnání p- hodnot
- Tab. č. 17: Regrese pro věk
- Tab. č. 18: Koncentrace aflatoxinů B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech uhynulých kusů daňčí zvěře
- Tab. č. 19a: Koncentrace aflatoxinů B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech odlovených kusů daňčí zvěře
- Tab. č. 19b: Koncentrace aflatoxinů B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech odlovených kusů daňčí zvěře

10. Seznam grafů

Graf č. 1: Rozdělení odebraných vzorků podle počtu kusů daňčí zvěře

Graf č. 2: Maximální koncentrace AFB1 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Graf č. 3: Mann-Whitneyův test – krabicový graf pro typ

Graf č. 4: Mann-Whitneyův test - krabicový graf pro pohlaví

Graf č. 5: Vícenásobné porovnání - krabicový graf dle věkových skupin

Graf č. 6: Bodový graf regrese pro věk

11. Přílohy

Tab. č. 18: Koncentrace aflatoxinů B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech uhynulých kusů daňčí zvěře

	Věk	Pohlaví	Koncentrace	Věk	Pohlaví	Koncentrace	Věk	Pohlaví	Koncentrace
1	5	samice	2,960	3	samec	4,270	7	samice	2,960
2	7	samice	4,220	4	samice	5,960	5	samice	3,120
3	2	samice	3,660	6	samice	4,810	3	samice	2,940
4	5	samec	4,420	7	samec	2,910	4	samice	2,610
5	2	samec	3,610	2	samice	2,590	4	samice	2,190
6	1	samice	2,020	4	samice	3,170	6	samice	3,130
7	1	samec	2,310	5	samice	2,960	1	samice	1,810
8	1	samice	3,610	2	samice	3,220	1	samice	2,200
9	1	samec	2,270	3	samice	2,810	6	samice	4,960
10	1	samec	2,110	6	samice	3,650	2	samice	1,880
11	5	samice	5,310	8	samice	4,510	7	samice	6,610
12	4	samice	5,060	7	samice	3,190	8	samice	5,900
13	5	samice	6,150	3	samice	2,610	2	samice	1,970
14	8	samice	4,930	1	samice	2,060	3	samice	2,250
15	9	samice	5,220	1	samice	2,170	2	samic	2,330
16	6	samice	3,810	1	samec	1,940	1	samec	1,69
17	8	samice	5,360	2	samice	2,360	2	samec	2,410
18	7	samice	4,960	2	samice	2,710	2	samice	2,050
19	6	samice	4,150	7	samice	4,250	3	samice	2,310
20	5	samice	3,210	4	samice	3,910	6	samice	3,610
21	1	samice	1,610	2	samice	2,550	2	samice	2,110
22	5	samec	3,690	2	samice	2,240	3	samice	3,100
23	1	samice	2,800	7	samice	6,310	2	samice	1,950
24	2	samice	4,910	9	samice	5,210	2	samice	2,110
25	3	samice	4,240	2	samice	1,900	2	samice	2,530
26	3	samice	3,090	3	samice	2,410	1	samice	1,680
27	7	samice	2,630	1	samice	1,960	1	samice	1,860
28	5	samice	4,050	1	samice	0,980	1	samec	1,760
29	1	samice	2,660	1	samice	1,690	1	samec	1,980
30	4	samice	4,590	1	samice	1,510	2	samice	2,210
31	6	samice	3,960	5	samice	6,330	7	samice	4,690
32	6	samice	7,390	3	samice	4,860			

Tab. č. 19a: Koncentrace aflatoxinů B1 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) v játrech odlovených kusů daňčí zvěře

	Věk	Pohlaví	Koncentrace	Věk	Pohlaví	Koncentrace	Věk	Pohlaví	Koncentrace
1	6	samec	1,960	6	samice	1,960	1	samice	0,630
2	4	samice	0,360	7	samice	2,090	1	samice	0,740
3	3	samec	0,930	2	samice	1,120	5	samec	0,960
4	2	samec	0,400	5	samice	0,910	9	samec	2,310
5	1	samice	0,530	4	samice	0,660	8	samec	2,660
6	3	samice	0,910	7	samice	2,240	10	samec	2,190
7	3	samice	0,660	5	samice	1,190	4	samice	0,650
8	6	samice	1,230	6	samec	1,070	7	samice	0,910
9	4	samice	0,770	2	samec	2,380	8	samice	2,310
10	1	samec	0,360	3	samice	0,520	3	samice	1,900
11	1	samice	0,270	6	samice	0,640	1	samec	0,310
12	1	samice	0,530	8	samice	0,590	1	samec	0,400
13	6	samice	1,810	1	samice	0,740	1	samice	0,270
14	3	samice	1,200	4	samec	0,560	1	samice	0,310
15	4	samec	1,430	8	samice	1,930	1	samec	0,240
16	5	samec	0,700	5	samice	2,940	6	samice	1,360
17	5	samice	0,330	3	samice	0,690	6	samice	2,090
18	7	samice	1,630	2	samec	0,210	6	samec	1,880
19	5	samice	1,710	4	samec	0,860	9	samec	2,640
20	10	samice	2,280	2	samec	0,410	7	samec	1,970
21	5	samice	2,050	4	samec	3,900	6	samice	0,500
22	3	samice	1,130	3	samec	0,710	8	samice	1,670
23	5	samec	1,630	5	samice	0,680	1	samice	0,260
24	4	samec	2,170	4	samec	1,310	5	samice	0,380
25	7	samec	1,980	4	samice	1,200	8	samice	1,550
26	6	samice	2,910	1	samice	0,390	9	samice	2,060
27	8	samec	3,610	1	samec	0,700	6	samice	3,510
28	9	samice	2,820	7	samec	2,670	7	samice	1,180
29	1	samec	0,360	5	samice	1,340	6	samice	2,140
30	2	samice	0,220	6	samice	0,970	3	samec	1,410
31	1	samice	0,620	8	samice	2,960	3	samec	0,550
32	1	samice	0,330	4	samice	2,170	4	samice	0,600
33	1	samec	0,410	1	samice	0,190	4	samice	0,690
34	1	samec	0,500	3	samice	1,220	1	samice	0,200
35	1	samice	0,360	2	samice	0,220	5	samice	0,230

Tab. č. 19b: Koncentrace aflatoxinů B1 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) v játrech odlovených kusů daňčí zvěře

36	2	samice	0,530	10	samice	2,380	3	samice	0,220
37	2	samec	0,710	4	samice	0,630	4	samice	0,380
38	2	samice	0,690	7	samice	0,550	6	samec	0,290
39	6	samec	1,710	5	samice	0,810	6	samice	1,310
40	3	samec	1,940	7	samice	1,440	10	samice	2,640
41	5	samice	0,390	2	samice	0,810	8	samice	2,590
42	4	samice	0,470	6	samice	1,650	6	samice	1,900