



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Využití plazmových technologií ke zlepšení kvality krmiv

Mgr. Zbyněk Havelka

České Budějovice  
2019

**Školitel:** doc. RNDr. Petr Bartoš, Ph.D.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Katedra zemědělské, dopravní a manipulační techniky

**Školitel specialista:** RNDr. Pavel Kříž, Ph.D.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Pedagogická fakulta  
Katedra aplikované fyziky a techniky

**Školitel specialista:** Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta  
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

**Práce vznikla za podpory projektů:**

TAČR TA04021252,  
TAČR TE02000177,  
GAJU 102/2013/S,  
GAJU 020/2013/Z.

Na tomto místě chci poděkovat mému školiteli,

**doc. RNDr. Petru Bartošovi, Ph.D.,**

za nespočet rad a myšlenek bez nichž by tato práce nikdy nevznikla.

Poděkování si zaslouží i školitelé specialisté, pani *Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.*  
a pan *RNDr. Pavel Kříž, Ph.D.*, kteří svými cennými radami přispěli k pochopení  
a novému pohledu na řešenou problematiku. Můj dík také patří firmě SurfaceTreat, a.s.,  
která mi umožnila pracovat v jejích prostorách a využívat její zařízení.

V neposlední řadě patří poděkování také mé rodině za podporu v časech mého studia.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své dizertační 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 .....

.....

Mgr. Zbyněk Havelka

# Abstrakt

*Název práce:*

## **Využití plazmových technologií ke zlepšení kvality krmiv**

*Abstrakt:* Dizertační práce se zabývá problematikou využití plazmových technologií v zemědělství za účelem zlepšení kvality krmiv pro hospodářská zvířata. Pozornost je zaměřena především na využití nízkoteplotního klouzavého plazmového výboje generovaného za atmosférického tlaku (Gliding Arc Plasma Discharge) k eliminaci modelových houbových patogenů (*T. virens*) a k otestování možností využití plazmatu ke snižování mykotoxinové zátěže (DON a D3G).

Odborné zaměření dizertační práce je výrazně mezioborové s přesahem do oblastí fyziky plazmatu, mikrobiologie, zootechniky a návrhu a konstrukce technických zařízení. Tomu odpovídá i členění práce do jednotlivých kapitol. V rešeršní části jsou shrnuty aktuální poznatky z oblasti houbových mikroorganismů a jim produkovaných mykotoxinů se zřetelem na jejich přítomnost v krmivech. Následuje rešerše poznatků o nízkoteplotním plazmatu a jeho aplikacích v potravinářském průmyslu a krmivářství. V kapitole Materiál a metodika jsou popsány použité postupy práce, využití přístroje a biologický materiál.

Výsledková část je pro přehlednost rozčleněna do pěti podkapitol – stanovení vybraných parametrů plazmové aparatury, vliv plazmatu na výživové parametry, vliv plazmatu na modelovou houbu *Trichoderma virens* a možnosti využití plazmového výboje ke snižování koncentrace mykotoxinů v krmivech. Poslední část je věnována popisu systému, který umožňuje ošetření vzorků v kontinuálním režimu.

Ošetření myceliálních disků plazmovým výbojem vedlo ke snížení klíčivosti spor hub, přičemž byl prokázán synergický efekt působení jednotlivých mechanismů, kterými plazma interaguje s povrchem biologického materiálu. Zároveň nebyla pozorována výraznější změna ve složení krmiv, významnější je pouze změna vlhkosti vzorku. V laboratorních podmínkách bylo prokázáno snížení koncentrace mykotoxinů nanesených na laboratorní sklíčko. U vzorků krmiv kontaminovaných přirozenou cestou se nepodařilo spolehlivě prokázat snížení koncentrace mykotoxinů ve vzorku v důsledku působení plazmatu.

*Klíčová slova:* plazma; houbové patogeny; mykotoxiny; výživové parametry, ječmen, slad

# Abstract

*Title:*

## **The Usage of Plasma Technologies to Improve the Quality of Feedstuffs**

*Abstract:* The dissertation thesis deals with the problems of the use of plasma technologies in agriculture for the purpose of improving the quality of feedstuffs for agricultural animals. The attention is focused above all on the use of low-temperature gliding arc plasma discharge generated by the atmospheric pressure for the elimination of model fungal pathogens (*T. virens*) and for the testing of the possibility of the use of plasma for the decreasing of mycotoxin load (DON and D3G).

The professional orientation of the dissertation thesis is strongly interdisciplinary with the overlap to the area of the physics of plasma, microbiology, zootechnics and the proposal and construction of technical facilities. With that corresponds also the division of thesis into individual chapters. In the research part, there is a summary of actual pieces of knowledge from the area of fungal microorganisms and mycotoxins produced by these with the view on their presence in feedstuffs. There follows a research of pieces of knowledge of low-temperature plasma and its applications in the food industry and feeding. In the chapter Material and Methodology, the applied methods of work, employed instruments and biological material are described.

The resulting part is, for its clear arrangement, divided into five subchapters – stating of selected parameters of plasma device, influence of plasma on nutritional parameters, influence of plasma on the model fungus *Trichoderma virens* and possibilities of the use of plasma discharge for the decreasing of concentration of mycotoxins in feedstuffs. The final part is dedicated to the description of system which enables the treatment of samples in continuous regime.

The treatment of mycelial discs by plasma discharge lead to the decrease of germination capacity of spores of fungi, while there was experimentally proven the synergic effect of the influence of individual mechanisms by which the plasma interacts with the surface of biological material. At the same time, there was not observed a more significant change in the composition of feedstuffs, more significant is only the change of humidity of sample. In the laboratory conditions, the decreasing of concentration of mycotoxins spread on laboratory glass was proven. At the samples of feedstuffs contaminated by natural way, it was not successful to reliably provedecreasing of concentration of mycotoxins in a sample as a result of plasma activity.

*Keywords:* plasma; fungal pathogens; mycotoxins; nutritional values; barley; malt

# Obsah

Úvod	9
<b>1 Rešerše literatury</b>	<b>11</b>
1.1 Houbové organismy	11
1.1.1 Houby rodu <i>Aspergillus</i>	14
1.1.2 Houby rodu <i>Penicillium</i>	15
1.1.3 Houby rodu <i>Fusarium</i>	16
1.2 Mykotoxiny	18
1.2.1 Vliv mykotoxinů na užitkovost zvířat	23
1.2.2 Možnosti dekontaminace mykotoxinů v krmivech	26
1.3 Nízkoteplotní plazma a jeho vybrané aplikace	29
1.3.1 Generování plazmatu	29
1.3.2 Interakce plazmatu s povrchem těles	30
1.3.3 Dělení plazmových výbojů	32
1.3.4 Klouzavý výboj	35
1.3.5 Časový vývoj výboje Gliding Arc	36
1.3.6 Možnosti inaktivace hub a rozkladu mykotoxinů pomocí plazmatu	37
<b>2 Cíl a hypotézy práce</b>	<b>41</b>
<b>3 Materiál a metodika</b>	<b>43</b>
3.1 Plazmová aparatura	43
3.2 Použitý biologický materiál	46
3.2.1 Semena	46
3.2.2 Houby	46
3.2.3 Mykotoxiny	46
3.3 Metodiky stanovení vybraných výživových parametrů	47
3.3.1 Stanovení obsahu sušiny (DM) a obsahu vody v krmivu	49
3.3.2 Stanovení obsahu popelovin (Ash) v krmivu	50
3.3.3 Stanovení obsahu dusíkatých látek (CP) v krmivu	51
3.3.4 Stanovení obsahu bílkovin v krmivu	52
3.3.5 Stanovení obsahu hrubé vlákniny (CF) v krmivu	53
3.3.6 Stanovení obsahu tuků (EE) v krmivu	54
3.3.7 Stanovení bezdusíkatých látek výtažkových (BNLV) v krmivu	55
3.3.8 Stanovení Brutto energie krmiva	56
3.4 Stanovení koncentrace DON a DON-3-Glc metodou HPLC-MS/MS	57
3.4.1 Metodika stanovení koncentrace DON a DON-3-Glc	57

<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse realizovaných prací</b>	<b>59</b>
4.1	Stanovení vybraných parametrů plazmové aparatury . . . . .	59
4.1.1	Měření příkonu napájecího zdroje . . . . .	59
4.1.2	Měření výkonu plazmové trysky . . . . .	60
4.1.3	Distribuce teplotního pole . . . . .	63
4.1.4	Pracovní režimy plazmového výboje . . . . .	65
4.1.5	Měření spektrálních charakteristik plazmového výboje typu Gliding Arc . . . . .	67
4.2	Vliv plazmatu na vybrané výživové parametry . . . . .	68
4.3	Vliv plazmatu na modelovou houbu <i>T. virens</i> . . . . .	71
4.3.1	Vliv vzdálenosti plazmové hlavice od myceliálního disku . . . . .	71
4.3.2	Vliv UV záření na klíčivost spor houby <i>T. virens</i> . . . . .	73
4.3.3	Vliv teplého vzduchu na klíčivost spor houby <i>T. virens</i> . . . . .	75
4.3.4	Vliv plazmového výboje na houby přítomné na povrchu laboratorně infikovaných semen . . . . .	76
4.3.5	Diskuse k výsledkům kapitoly 4.3 . . . . .	78
4.4	Vliv plazmatu na mykotoxiny . . . . .	80
4.4.1	Vliv plazmového výboje na koncentraci DON a D3G na laboratorních substrátech . . . . .	80
4.4.2	Tepelná stabilita mykotoxinu DON . . . . .	83
4.4.3	Vliv plazmového výboje na obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici jarní . . . . .	84
4.4.4	Vliv plazmového výboje na obsah mykotoxinů ve sladu . . . . .	86
4.4.5	Diskuse k výsledkům kapitoly 4.4 . . . . .	89
4.5	Systém pro kontinuální ošetření vzorků . . . . .	91
4.5.1	Systém se šnekovým dopravníkem . . . . .	91
4.5.2	Systém s pásovým dopravníkem . . . . .	93
4.5.3	Ekonomické zhodnocení systému s pásovým dopravníkem . . . . .	97
	<b>Závěr</b>	<b>98</b>
	<b>Seznam použitých zdrojů</b>	<b>100</b>
	<b>Seznam zkratk</b>	<b>115</b>
	<b>Seznam tabulek</b>	<b>116</b>
	<b>Seznam obrázků</b>	<b>117</b>
	<b>Seznam vlastních publikovaných prací</b>	<b>119</b>



---

# Úvod

Vysoce kvalitní a bezpečné potraviny jsou důležitým výdobytkem dnešní doby. K překročení hygienických limitů v Evropě dochází jen výjimečně, avšak i přesto je v současné době kvalitě potravin věnována vysoká pozornost. Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) odhaduje, že téměř čtvrtina potravin je kontaminována nežádoucími chemickými látkami, jako jsou pesticidy a mykotoxiny nebo nežádoucími mikroorganismy, jako jsou houby a bakterie (Köppen et al., 2010). Tyto látky se dostávají do potravin a krmiv během vegetačního období nebo při sklizni, čímž ohrožují zdraví člověka a živých tvorů, kteří tyto napadené potraviny zkonzumují. Využitím moderních analytických technik lze stanovit známé chemické kontaminanty při velmi nízkých koncentracích.

Nežádoucí látky a mikroorganismy se mohou objevit v jakémkoli stádiu produkce zemědělských komodit. Při pěstování kulturních plodin vzniká řada složitých vztahů a interakcí mezi rostlinou, mikroskopickými houbami, hmyzem a způsobem ošetřování rostlin. Tyto interakce pak ovlivňují produkci a obsah mykotoxinů v potravinových surovinách. Špatné pěstební postupy, nesprávné sušení a skladování přispívají k růstu houbových patogenů a zvýšení možnosti produkce mykotoxinů. Obsah nežádoucích chemických látek a mikroorganismů v potravinách a krmivech může být snížen dodržováním vhodných opatření v průběhu zemědělské produkce. V případě použití vhodných agrotechnických postupů, lze předpokládat zdravotní nezávadnost suroviny z hlediska obsahu mykotoxinů (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Během růstu houbových patogenů mohou být produkovány toxické sekundární metabolity – mykotoxiny. Vzhledem k rozdílným toxickým účinkům mykotoxinů a jejich teplotní odolnosti představují mykotoxiny neustálé riziko pro zdraví lidí a zvířat. Je prokázáno, že onemocnění jako například ergotismus nebo akutní kardinální beri-beri jsou způsobena mykotoxiny (Eaton et al., 2010), avšak mykotoxiny mohou být také potenciální činitelé nemocí jiných, jako například Reyův syndrom, hyperestrogenismus a další. K nejzávažnějším účinkům patří zejména jejich hepatotoxicita a neurotoxicita (Eaton et al., 2010) a dále pozdější toxické účinky, jako jsou karcinogenita, imunotoxicita a vývojová toxicita. Potraviny mohou být kontaminovány i více než jedním mykotoxinem, což může riziko ještě zvyšovat (Speijers a Speijers, 2004). Mykotoxiny se do organismu dostávají buď konzumací napadených komodit nebo přenosem mykotoxinů do zvířecích tkání, mléka a vajec po zkrmení kontaminované směsi krmiva.

S cílem snížit množství těchto nežádoucích látek v surovinách pro výrobu potravin, respektive krmiv byly vyvinuty speciální postupy, které mohou být v praxi použity — fyzikální separace, biologické detoxikace nebo vhodné chemické postupy. Například využívání chemikálií k dekontaminaci napadených krmiv je velmi rozšířenou a účinnou metodou. Bohužel její největší nevýhodou je, že všechny použité látky mohou mít vliv na složení a strukturu krmných a potravinářských směsí a dále při nevhodném postupu aplikace mo-

hou být chemické látky splavovány do odpadních vod a tím být nebezpečím pro životní prostředí. Z tohoto důvodu jsou i nadále hledány nové postupy, které by umožňovaly snížit množství houbových patogenů a mykotoxinů v krmivu.

**Cílem disertační práce** je rozpracovat tuto problematiku v oblasti využití nízkoteplotního plazmatu k eliminaci houbových patogenů z povrchu krmiv používaných pro hospodářská zvířata a otestovat možnosti využití plazmatu ke snižování mykotoxinové zátěže. Práce ve své podstatě navazuje na výzkum realizovaný pod vedením B. J. Parka (Park et al., 2007), který experimentálně prokázal, že vystavení vzorku mykotoxinů nízkoteplotnímu plazmatu má za následek snížení koncentrace mykotoxinů ve vzorku. K podobným výsledkům dospěl také Bosch et al. (2017).

Realizace těchto výzkumných aktivit byla umožněna mimo jiné projektem TAČR TA04021252 – „Vývoj zařízení pro fyzikální ošetření semen a sladu pomocí nízkoteplotního plazmatu,“ který byl řešen na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v letech 2014 až 2017. Řešitelský tým v rámci projektu vyvinul zařízení pro ošetření vzorků vybraných hospodářských plodin, které bylo také použito k ošetření vzorků, jak je uvedeno dále v části Metodika. Jelikož je plazma velice komplexní substancí, jejíž parametry jsou velmi významně ovlivněny jak použitými technickými prostředky, tak procesními parametry (Bogaerts et al., 2002), není možné jednoduše využít výsledky jiných autorů a je potřeba dostupný systém nejprve detailně charakterizovat a až posléze posoudit jeho vhodnost k využití na rozklad houbových patogenů a mykotoxinů v krmivech. S ohledem na tuto skutečnost je také potřeba mít na paměti, že případný negativní výsledek vyplývající z provedených laboratorních experimentů nemusí nutně znamenat, že na jiném zařízení jiné konstrukce nebude možno dosáhnout vhodných procesních parametrů umožňujících snížení mykotoxinové zátěže.

---

# Kapitola 1

## Rešerše literatury

Realizovaný výzkum je možno charakterizovat jako výrazně mezioborový s přesahem do oblasti fyziky plazmatu, mikrobiologie, zootechniky a návrhu a konstrukce technických zařízení. Z tohoto důvodu je rešerše literatury rozdělena do tří separátních oblastí pokrývajících předmětnou problematiku houbových patogenů, mykotoxinů a plazmatu. Vzhledem ke značnému počtu publikací v uvedených oborech jsou v rešerši zmíněny jen ty nejvýznamnější výsledky úzce související s tématem dizertační práce.

### 1.1 Houbové organismy

Houby představují fylogeneticky diverzní skupinu mikroorganismů. Jedná se o heterotrofní eukaryota, která jsou buď jednobuněčné (kvasinky) nebo hyfální (vláknité houby). Houbové organismy se rozmnožují pohlavně (telemorfa) nebo nepohlavně (anamorfa).

V rámci říše Fungi se houby dělí do několika oddělení: Chytridiomycota, Glomeromycota, Ascomycota a Basidiomycota (Inglis et al., 2001; Tedersoo et al., 2018). Nejčastěji využívaným kritériem při dělení houbových organismů do přirozených skupin (tedy založených na genetických vztazích) jsou útvary vzniklé při pohlavním rozmnožování. Avšak rozsáhlá skupina hub z oddělení Ascomycota zahrnuje též mnoho druhů, které ztratily schopnost se pohlavně rozmnožovat nebo u kterých nebyla doposud pohlavní forma zaznamenána. Zástupci tohoto oddělení jsou charakterizováni myceliární formou nesoucí nepohlavní spory označované jako konidie, které vznikají na specializovaných konidio-genních buňkách (fialidách). Konidogenní buňky se často formují na jednoduchých či větvených hyfách, konidioforech, nebo na agregaci konidioforů popsaných jako synnemata (skupina vzprámených nebo někdy spojených konidioforů nesoucích konidie buď pouze na vrcholu nebo současně na vrcholu a po stranách) nebo sporodochia (masa krátkých konidioforů produkovaných v polštářkovitých plodnicích) (Chalupáčová, 2002; Kalina a Váňa, 2005).

Některé druhy hub lidé dokázali využít ke svému prospěchu (například *Penicillium notatum*, který produkuje antibiotika – penicilin; *Penicillium camemberti* využívající se při výrobě plísňových sýrů aj.). Dále mnoho mikroskopických hub je prospěšných díky svému podílu na rozkladu organických látek v přírodě. Nicméně některé druhy hub v životním prostředí představují pro člověka a zvířata potenciální riziko, jelikož jsou potenciálními původci toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů. Zároveň jsou tyto druhy hub schopny kontaminovat krmiva, potraviny nebo jiné zemědělské komodity

(Fassatiová, 1979). Mezi druhy, které se podílí na zkáze krmiv a potravin, jsou zástupci rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, a to zejména z hlediska bezpečnosti krmiv a potravin tím, že jsou producenty mykotoxinů.

Mykotoxiny jsou produkovány fytopatogenními druhy hub již v polních podmínkách při pěstování zemědělských plodin (Johannessen a Torp, 2005). Mezi významné producenty mykotoxinů patří zástupci tzv. polních hub rodu *Fusarium* spp. a rodu *Alternaria* spp. Druhy zmíněných rodů mohou způsobovat onemocnění u rostlin obilnin, různých druhů zeleniny, ovoce a dalších. Kontaminace komodit může nastat i během skladování při nevhodných podmínkách. Přítomnost potencionálních producentů sekundárních metabolitů (mykotoxinů) však nemusí nutně znamenat to, že jsou kontaminovány mykotoxiny pokaždé všechny produkty. Důležitou roli kontaminace hrají abiotické, ale i biotické faktory během vegetace i během skladování. Vliv těchto faktorů na produkci mykotoxinů je složitá záležitost. V konvenčním zemědělství se používají k ošetření plodin fungicidy, aby se zabránilo ztrátě výnosu způsobené řadou fytopatogenních hub. V Norsku bylo prokázáno, že po ošetření obilnin fungicidy byla zaznamenána vyšší infekce houbami rodu *Fusarium* a tím i vyšší výskyt mykotoxinů v zrnech (Elen et al., 2002; Henriksen a Elen, 2005).

Ke kontaminaci krmiv, potravin a zemědělských komodit houbovými patogeny dochází v průběhu celého výrobního procesu. Od období vegetace, přes sklizeň, transport, zpracování až po uskladnění. Lze je tedy rozdělit do dvou skupin podle místa výskytu (Suchý a Herzig, 2005):

- na *polní houby*, které napadají rostliny během vegetace. Polním fytopatogenním houbám se daří při vlhkostech nad 70 %, což se projevuje například vyšším výskytem infekcí v deštivých letech. Do této kategorie spadá mnoho druhů houbových patogenů, nejznámější z nich jsou například rodu *Fusarium* (v ČR dominantní zástupce hub), *Alternaria*, *Cladosporidium*, *Diplodia* nebo *Gierella* (Flannigan et al., 1982).
- na *skladištní houby*, které napadají špatně uskladněné komodity. Skladištním houbám vyhovuje prostředí s nižší vlhkostí (14–18 %) a patří mezi ně například houby rodu *Aspergillus* a *Penicillium* (Flannigan a Healy, 1983).

Některé druhy houbových patogenů, jako jsou *Fusarium* a *Penicillium*, napadají rostliny během vegetace, ale mohou napadnout již uskladněné obilniny nebo krmiva.

Vodní aktivita ( $A_w$ ) je důležitý ukazatel trvanlivosti rostlinných produktů nebo potravin. Snížení  $A_w$  obecně snižuje mikrobiální růst nejen hub, ale i bakterií a kvasinek. Aktivita vody se vyskytuje v rozmezí 0 (absolutně suchá látka) až 1 (destilovaná voda) (Ingr, 2007). Polní houby obecně nerostou pod  $A_w$  0,90 odpovídající 20–25% vlhkosti (tj. houby rodu *Fusarium* potřebují  $A_w$  0,980 až 0,995), zatímco skladištní houby jsou často xerofilní a schopné růst až do vodní aktivity 0,80 (do 18% vlhkost) nebo dokonce 0,68 (14% vlhkost) (ICMSF, 1998). Některé druhy rodu *Penicillium* však dobře rostou při  $A_w > 0,95$ .

## Polní houby

Fytopatogenní houby, které mohou infikovat obiloviny během vegetace zejména pak před sklizní, se běžně vyskytují volně v půdě nebo na posklizňových zbytcích. Zároveň se během vegetace mohou šířit z jiných napadených porostů větrem nebo vodou v průběhu deštivého počasí. Za určitých podmínek může kontaminace začít hned na začátku pěstitelského cyklu a postupně se infekce může vyskytovat během celého vegetačního období. V případě napadení porostu fytopatogenními druhy hub dochází ke ztrátám produkce a kontaminaci zrna mykotoxiny (Piacentini et al., 2019).

Dominantními druhy infikující zemědělské plodiny jsou například houby rodu *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* a *Helminthosporium* (Flannigan et al., 1982).

Druhy fytopatogenních hub infikující porost jsou v první řadě závislé na klimatických podmínkách, ale zároveň i na odrůdě plodiny. Zároveň důležitou roli v patogenezi mohou hrát i pěstitelské postupy, jako je používání prostředků na ochranu rostlin, zejména fungicidů, na osevním postupu, zpracování posklizňových zbytků a špatné zpracování půdy, popřípadě nadměrné používání dusíkatých hnojiv.

Nejzávažnějším rizikem pro zemědělské plodiny je napadení rostlin houbami rodu *Fusarium*. Tyto druhy hub mohou přežívat v půdě na posklizňových zbytcích a v případě příznivých podmínek jsou schopny napadat již vzcházející rostliny – způsobují choroby pat stébel. Deštěm se mohou dostávat i na vyšší části rostlin. Kritická fáze je metání rostlin, kdy ve vhodných podmínkách infikují klasy. Větší riziko napadení rostlin houbami rodu *Fusarium* je v případě, kdy byla jako předplodina pěstována na stejném pozemku kukuřice.

Fytopatogenní druhy hub pocházejících z půdy, které infikovaly během vegetace plodinu, mají malý význam během skladování, protože nejsou schopny růst při vodní aktivitě (Aw) 0,90. Skladované obilí s nízkou aktivitou vody má navíc velmi nízkou fyziologickou aktivitu a ztrácí se specifická asociace s fytopatogenními houbami (Noots et al., 1999).

## Skladištní houby

Skladištní houby se nemusí během vegetace vůbec vyskytovat nebo se vyskytují jen v malé míře, ale bezprostředně po sklizni mohou infikovat ječmen (Haikara et al., 1977). Mezi tyto patogeny náleží zástupci rodu *Aspergillus* a v menší míře *Penicillium* (Flannigan a Healy, 1983).

Druhy rodu *Aspergillus* jsou spolu s rodem *Penicillium* dominantními mikroorganismy napadající krmiva a potraviny v průběhu procesu skladování. Houby rodu *Aspergillus* rostou obecně ve vyšších teplotách nebo při nižší vodní aktivitě než rod *Penicillium* (Rawat, 2015). Houby rodu *Aspergillus* rostou také obvykle rychleji než houby rodu *Penicillium*, nicméně pomaleji sporulují. Druhy rodu *Aspergillus* dominují v kontaminaci krmiv a potravin i komodit v tropických oblastech, zatímco v mírných pásmech se běžněji vyskytují druhy rodu *Penicillium* (Hocking, 2006).

### 1.1.1 Houby rodu *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* byl poprvé popsán téměř před 300 lety a jedná se o rod, který způsobuje problémy zejména v potravinářském průmyslu a krmivářství. Krmiva a potraviny se vlivem působení hub rodu *Aspergillus* kazí.

*Aspergillus* je rozsáhlým rodem, který zahrnuje velké množství druhů. Některé druhy hub rodu *Aspergillus* produkují mykotoxiny, které se mohou vyskytovat nejen v infikovaných krmivech a potravinách, ale i v různých zemědělských komoditách. Běžně se vyskytují v zrnech obilovin, ořechů i v kořeni, popřípadě dalších produktech. Častější výskyt je pak v tropických a subtropických oblastech než v mírném pásmu (Pitt a Hocking, 1997).

V současnosti je popsáno více než 100 druhů hub rodu *Aspergillus*. Všechny tyto druhy jsou schopny růst na umělých živných půdách. Jedná se tedy o fakultativní saprotrofy (Klich, 2002; Pitt a Samson, 1993).

Jen u malého procenta druhů je zaznamenáno pohlavní rozmnožování (telemorfa), při kterém jsou produkovány askospory. Askospory se vytvářejí v kulovitých plodnicích typu kleistotecium. Pohlavní formy hub rodu *Aspergillus* jsou přinejmenším řazeny taxonomicky do osmi rodů oddělení Ascomycota. Pouze tři z nich, Eurotium, Neosartorya a Emericella, se vyskytují jako kontaminanty v krmivech, potravinách a zemědělských komoditách.

Druhy rodu Eurotium (dříve známé jako skupina „*Aspergillus glaucus*“) jsou nejběžnějšími a nejvýznamnějšími druhy s výskytem anamorfy rodu *Aspergillus*. Tyto zástupci tvoří zářivě žlutá kleistotecia a světle žluté askospory. Všechny druhy jsou xerofilní a způsobují problémy u krmiv a potravin s nízkým obsahem vody (Aw) a u skladovaných komodit.

Rod Neosartorya je druhou nejběžnější telemorfou rodu *Aspergillus* kontaminující krmiva a potraviny. Tento rod produkuje bílá kleistotecia a bezbarvé askospory. Askospory Neosartorya jsou odolné vůči vysokým teplotám, takže se podílí na znehodnocení tepelně zpracovaných potravin (Pitt a Hocking, 1997).

Druhy Emericella se vyskytují méně často v potravinách a zřídka způsobují jejich znehodnocení. Vytvářejí bílá kleistotecia s červenými nebo purpurovými askosporami. Nepohlavně se rozmnožující druhy rodu *Aspergillus* jsou ve starší literatuře řazeny do uměle vytvořeného rodu Hyphomycetes, oddělení Deutromycota. Na konidioforech se vytváří metuly a na nich konidiogenní buňky (fialidy), na kterých se tvoří konidie. Na základě morfologických struktur se dá snadno tento rod *Aspergillus* odlišit od rodu *Penicillium*.

Identifikace druhů rodu *Aspergillus* je založena na morfologických strukturách jednotlivých druhů a na toto téma je publikováno mnoho studií, z nichž některé jsou již zastaralé (Gams et al., 1986; Klich, 2002; Raper a Fennell, 1965; Samson a Pitt, 1986). Nicméně, stále byly na základě morfologických znaků popisovány nové druhy (Pitt a Samson, 1993). Zároveň vedle tradičních morfologických taxonomických technik se používají molekulární metody k identifikaci zástupců rodu *Aspergillus* (Abarca et al., 1994; Esteban et al., 2005; Geiser et al., 1998; Schmidt et al., 2003; Varga et al., 2004). K objasnění vztahu jednotlivých druhů v rámci rodu *Aspergillus* také napomáhá izolace a specifikace sekundárních metabolitů (Frisvad, 1989).

U druhů rodu *Aspergillus*, u kterých nebyla doposud popsána pohlavní forma, slouží k identifikaci i barva kolonie, kterou tvoří na určité umělé živné půdě. Barva kolonie je konzistentně spojena s určitým druhem.

Více než 40 druhů hub rodu *Aspergillus* je uvedeno mezi druhy schopné produkovat toxické metabolity, z nichž jsou nejznámější aflatoxiny. Nejvýznamnější druhy produkující aflatoxiny jsou *A. flavus* a *A. parasiticus*. Jiné druhy rodu *Aspergillus* produkují mykotoxin Ochratoxin A, například *A. ochraceus* a příbuzné druhy *A. carbonarius* a někdy i *A. niger*. Dále sterigmatocystin, který je primárně produkovaný druhem *A. versicolor*. Mykotoxiny druhů rodu *Aspergillus* vykazují širokou škálu toxicity, přičemž nejvýznamnější účinky jsou dlouhodobé. Aflatoxin B1 je nejúčinnější karcinogen jater známý pro širokou škálu živočišných druhů, včetně lidí, Ochratoxin A a citrinin ovlivňují funkci ledvin a kyse-lina cyklopiazonová má širokou škálu nebezpečných účinků (Cole et al., 2003). Správná identifikace druhů *Aspergillus* je nezbytným předpokladem pro posouzení potenciálu kontaminace komodit, potravin nebo krmiv v důsledku kontaminace mykotoxiny.

### 1.1.2 Houby rodu *Penicillium*

Houby rodu *Penicillium* patří mezi nejvíce všudypřítomné organismy na Zemi. Byly nalezeny na všech místech, kde byly doposud hledány. Od Antarktidy přes tropy až po Grónsko. Je těžké najít vzorek půdy nebo rozpadající se vegetace bez přítomnosti spor *Penicillium*. Výzkum za posledních 20 let však prokázal, že některé druhy *Penicillium* jsou často pozoruhodně substrátově specifické. Podrobnější taxonomie ukázala, že některé běžně izolované druhy jsou půdní houby, které jsou v krmivech a potravinách pozorovány pouze jako kontaminanty, zatímco jiné jsou schopné kontaminovat krmiva i potraviny a během příznivých podmínek je značně znehodnocují. Většina druhů *Penicillium* nezpůsobuje tak velké škody jako rod *Aspergillus*, což je dáno tím, že růst hub rodu *Penicillium* je pomalejší. Nicméně, druhy *Penicillium* jsou důležitou příčinou zkázy krmiv a potravin. Schopnost rozpoznat běžné druhy znehodnocující krmiva a potraviny je velmi užitečná, z toho důvodu, aby byla předpovězena jejich schopnost produkovat mykotoxiny. Obecně řečeno, specifikace izolátů *Penicillium* není snadná. Pokud se však vezme v úvahu substrát, na kterém je druh nalezen, lze často získat poměrně mnoho informací (Pitt, 2006).

*Penicillium* opět představuje velmi rozsáhlý rod, ve kterém je doposud identifikováno více než 200 druhů (Pitt et al., 2000), od té doby bylo nalezeno a publikováno minimálně 30 dalších druhů (Samson a Frisvad, 2004). Z celkového souboru druhů se kolem 50 druhů běžně vyskytuje v přírodě (Pitt et al., 2000).

Všechny běžné druhy rostou a sporulují na umělých živných médiích a obvykle je možné tento rod rozpoznat na základě vytvořených kolonií na dané živné půdě. Většina druhů rodu *Penicillium* roste pomalu a vytváří zelené konidie. Klasifikace v rámci rodu *Penicillium* je založena primárně na morfologických strukturách viditelných v mikroskopu. Rod je rozdělen do podrodů na základě počtu a uspořádání konidiogenních buněk (fialid) a struktur konidioforu (nosič fialid). Klasifikace podle Pitt (1979) zahrnuje čtyři subrody: *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* a *Penicillium*. Jejich identifikace se provádí na základě sporulačních struktur. Většina důležitých druhů způsobující kazivost krmiv a potravin nebo kontaminaci komodit se nachází v podrodu *Penicillium*. Komplexní identifikace rodu *Penicillium* je znázorněna v publikaci Pitt (1979). Klíč k určování běžných druhů a jejich popis poskytuje Pitt (2000). Druhy kontaminující krmiva, potraviny nebo komodity jsou popsány ve studiích Pitt a Hocking (1997) a Samson et al. (2010). Popis druhů rodu *Penicillium* je složitý a identifikace druhů se provádí na přesně definovaných

médiích na základě stejné inkubační doby a při stejné teplotě. Mezi morfologické znaky jednotlivých druhů patří průměr kultur, barva konidií, pigment kultur a tvar konidiogenních struktur (Samson et al., 2004).

### 1.1.3 Houby rodu *Fusarium*

Houby rodu *Fusarium* jsou vláknité houby, které přežívají v půdě nebo na posklizňových zbytcích. Půda je zásobárnou zdroje inokula hub rodu *Fusarium*, které je schopné infikovat plodiny ve vegetační sezóně. Houby rodu *Fusarium* náleží taxonomicky do oddělení Ascomycota, řádu Hypocreales. Telemorfni stádia druhů *Fusarium* jsou většinou klasifikovány v rodu *Gibberella* a menší počet druhů je klasifikován v rodech *Hemanectria* a *Albonectria* (Sandoval-Denis et al., 2018; Suga a Hyakumachi, 2004). Kompletní přehled hlavních taxonomických systémů rodu *Fusarium* je publikován v práci Leslie a Summerell (2006). Na umělých médiích houby rodu *Fusarium* vytvářejí vatovité mycelium, pro které je typická narůžovělá barva.

Houby rodu *Fusarium* jsou identifikovány na základě morfologie a primárních znaků nepohlavně vzniklých spor, zejména makrokonidií. Makrokonidie jsou protáhlé zahnuté spory, které jsou vícebuněčné a na základě tvaru makrokonidií, jejich zašpičatění i počtu buněk jsou determinovány jednotlivé druhy. Houby rodu *Fusarium* produkují 3 typy spor: mikrokonidie, makrokonidie a chlamydospory. Septické makrokonidie se vyvíjejí z monofialid nebo polyfialid, které se vyskytují na vzdušném myceliu. Popřípadě se makrokonie vyskytují na krátkých monofialidách ve specializovaném konidiomatu, sporodochiu (Suga a Hyakumachi, 2004). Monofialida je konidiogenní buňka s jediným pórem, z něhož se formuje endokonidie, polyfialida může mít více pórů. Mikrokonidie hub rodu *Fusarium* se mohou lišit tvarem a velikostí a jsou produkovány na vzdušném myceliu ve shlucích nebo v řetízcích, a to jak na monofialidách, tak i polyfialidách. Třetím typem spor jsou chlamydospory, což jsou spory, které vznikají uprostřed hyf mycelia nebo na jejich konci. Chlamydospory jsou odolné struktury se zesílenými stěnami a vysokým obsahem lipidů (Nucci a Anaissie, 2009; Suga a Hyakumachi, 2004). Různý tvar makrokonidií zůstává nejdůležitějším znakem k odlišení druhů. Dalšími znaky k rozlišení druhů *Fusarium* jsou přítomnost/nepřítomnost mikrokonidií a jejich tvar, přítomnost/nepřítomnost chlamydospor a vlastností mikro- a makrokonidiogenních buněk. Aby bylo možné identifikovat druhy rodu *Fusarium*, musí být kmeny pěstovány na speciálních médiích a ve standardních podmínkách prostředí. V současné době je identifikace druhů realizována pomocí molekulárních metod (Kheyroodin a Kheyroodin, 2017).

Rod *Fusarium* zahrnuje vysoký počet druhů, které jsou patogenní k rostlinám, včetně zemědělsky významných plodin, jako jsou obilniny. Houby rodu *Fusarium* mohou být škodlivé pro lidi i zvířata, protože mnohé z nich jsou toxigenní. Mnoho z nich produkuje širokou škálu biologicky aktivních sekundárních metabolitů s mimořádnou chemickou rozmanitostí. Biologická aktivita mykotoxinů rodu *Fusarium* může být škodlivá pro rostliny a jsou s ní spojena mnohá onemocnění u lidí a domácích zvířat (Moretti, 2009). Identifikace mykotoxogenních druhů *Fusarium* zůstává i nadále nejkritičtějším problémem a to z toho důvodu, že se počet druhů a identifikace druhů v posledním století neustále mění v souladu s různými taxonomickými systémy a metodami detekce (Věchet, 2008).

Rod *Fusarium* způsobuje onemocnění rostlin v široké škále komoditních plodin – obilniny, plodovou zeleninu, brambory aj.. Druhy rodu *Fusarium*, jako *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* a *F. poae* infikují ječmen a slad, oves, žito a pšenici.



V rámci druhového komplexu *Fusarium graminearum* (O'Donnell et al., 2000), který v současné době zahrnuje 16 druhů (Aoki et al., 2012), patří *F. culmorum* a *F. cerealis* mezi nejvíce dominantní patogeny způsobující onemocnění klasů na celém světě (Moss a Thrane, 2004; Osborne a Stein, 2007). Dalšími často detekovanými druhy jsou *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides* (Somma et al., 2014; Xu a Nicholson, 2009) a netoxigenní druhy *Microdochium nivale* a *M. majus* (Glyn et al., 2005).

Onemocnění klasů rostlin houbami rodu *Fusarium* se vyskytují ve všech obilnářských oblastech, proto je důležité věnovat velkou pozornost plodinám v průběhu celé vegetace. Fusariózy klasů mohou způsobovat významné hospodářské ztráty. Onemocnění klasů houbami rodu *Fusarium* je jedním z nejdůležitějších onemocnění obilnin na světě, včetně kukuřice. Závažné propuknutí tohoto onemocnění může mít za následek významné ztráty na výnosu až 50 %, v závislosti na druhu obilniny (Munkvold et al., 2019; Parry et al., 1995). McMullen et al. (2012) naznačují, že onemocnění ve Spojených státech vede k ekonomickým ztrátám přesahujícím jednu miliardu USD ročně. U obilovin je onemocnění klasů obvykle způsobeno různými druhy rodu *Fusarium* s různými životními styly a různými typy produkovaných mykotoxinů.

Houby rodu *Fusarium* mohou infikovat všechny části rostlin a jelikož se jedná o patogeny přenosné osivem, tak se mohou nacházet již v zárodku obilky. Dále se vyskytují na kořenech a spolu s dalšími patogeny mohou způsobovat jejich hnilobu. Způsobují choroby pat stébel i růžovění klasů. Na patách stébel, v kolénkách, na stéblech i listech působí nekrózy. Na klasech obilnin vytvářejí oranžová nebo růžová ložiska plná spor, která následně kontaminují jednotlivá zrna. Mycelium prorůstá rostlinou a tím dochází k její systémové infekci (Hýsek et al., 2008). Vadnutí rostlin je způsobeno patogenem *Fusarium oxysporum*, které se i vedle *F. solani* může podílet na padání klíčnicích rostlin. Houby rodu *Fusarium* produkují mykotoxiny a celá řada z nich byla izolována ze široké škály obilnin, včetně kukuřice, ječmene i růží (Kim et al., 1993).

## 1.2 Mykotoxiny

Houby během svého růstu spotřebovávají živiny obsažené v substrátu, přičemž během tohoto procesu dochází ke dvěma jevům – a) jsou tvořeny nové spory, díky kterým se houby rozmnožují, b) jsou produkovány toxické sekundární metabolity – mykotoxiny.

Přítomnost houbových patogenů na potravině tedy ještě nemusí nutně znamenat přítomnost mykotoxinů.

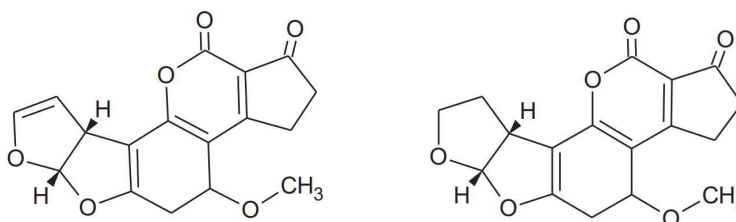
Slovo „mykotoxin“ pochází z řeckých slov „mykes“ – houba a „toxicum“ – jed (McKane a Kandel, 1996). V současnosti je známo více než 500 druhů mykotoxinů. Většinou jsou chemicky a teplotně stabilní a přežívají většinu běžných operací používaných při zpracování obilovin (Köppen et al., 2010). Mykotoxiny lze z pohledu zdravotně-hygienického pokládat za jedny z nejnebezpečnějších látek v krmivech a potravinách.

Tvorba mykotoxinů je ovlivněna celou řadou faktorů, jako je vlhkost, teplota, přítomnost kyslíku, pH, poškození substrátu, přítomnost hmyzu a samozřejmě přítomnost houbových patogenů (Mallman a Dilkin, 2011).

Nejčastějšími a nejnebezpečnějšími druhy mykotoxinů jsou zřejmě Aflatoxiny, Deoxynivalenoly, Zearalenony, Ochratoxiny, T2 toxiny a Fumonisy (Kulovaná et al., 2002). Požití potravy obsahující některý z těchto mykotoxinů může vést k intoxikaci s chronickým (dlouhodobý příjem malého množství) nebo akutním průběhem (příjem vysoké dávky).

### Aflatoxin

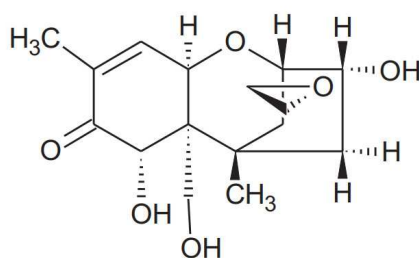
Aflatoxiny patří mezi nejsilnější známé karcinogeny napadající primárně játra a způsobují chronické nemoci (nádory) (Peterson et al., 2001; Velíšek a Hajšlová, 2009). Jsou mutagenní, hepatotoxické, nefrotoxické a imunosupresivní (Cullen a Newberne, 1994). Jsou produkovány houbami rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* a jiné), které jsou běžně a široce rozšířené v přírodě, kde kontaminují půdu a rozkládají se vegetací. Popsáno je více než dvacet druhů aflatoxinů, ale pouze čtyři se vyskytují v potravinách, a to aflatoxiny  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  a  $G_2$ , avšak při metabolické přeměně se mohou vyskytnout i aflatoxiny  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $P_1$  a  $Q_1$  (IARC, 1993). Aflatoxiny se mohou vyskytovat v zrninách, sóje, hrachu, bobech, prose, ořechách, podzemnici, ovoci a po zkonsumování napadeného krmiva se mohou dostat až do masa, vajec, sýru a mléka (López et al., 2003).



Obrázek 1.1: Struktura Aflatoxinu  $B_1$  (vlevo) a Aflatoxinu  $B_2$  (vpravo)

## Deoxynivalenol (DON)

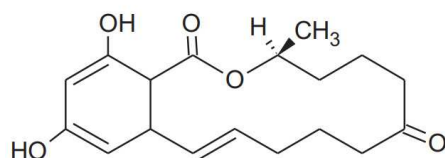
Deoxynivalenol je považován za hlavní kontaminant potravin. Produkován je houbami rodu *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum* a jiné) a *Stachybotrys*, které napadají převážně zrno pšenice, ječmene, kukuřice, ova a žita. Při konzumaci menších dávek způsobuje snížení příjmu krmiva, ve větších dávkách způsobuje snížení imunity, výkonnosti (snížení doживosti, hmotnosti vajec aj.), vyvolává zvracení a průjmy a může způsobit i náhlý úhyn zvířete (Rotter et al., 1996).



Obrázek 1.2: Struktura Deoxynivalenolu

## Zearalenon (ZON)

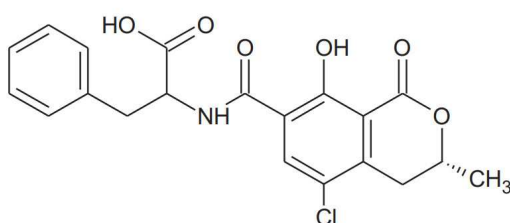
Zearalenon je méně toxický než jiné mykotoxiny. Produkují jej houby rodu *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichoides* a jiné) (Schwarzer, 2009) a v současné době je popsáno 15 derivátů základní struktury ZON. Vyskytuje se nejčastěji v zrninách, kukuřici, silážích a krmivech živočišného původu. ZON je velice stabilní a může se snadno dostávat do cereálních výrobků a rostlinných olejů. ZON u zvířat způsobuje syndrom hyperestrogenismu (snížení věku puberty, porucha plodnosti u samců, zduření rodidel u samic) u zvířat. Nejcitlivější na tento mykotoxin jsou vepři. V případě krmení krav kontaminovanou stravou může dojít k přenosu do mléka (Krměčičk a Kysilka, 2001).



Obrázek 1.3: Struktura Zearalenonu

## Ochratoxin

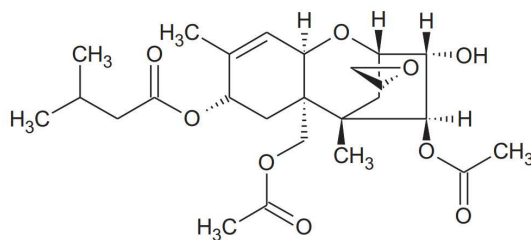
Ochratoxin je produkován houbami rodu *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. cyclopium*) a *Aspergillus* (zejména *A. ochraceus*) (Benford et al., 2001; Velíšek a Hajšlová, 2009) a běžně dochází k jeho detekci v oblasti Balkánu a Skandinávie. Nejčastěji se objevuje v obilninách (kukuřici, ječmeni, pšenici, ovsu, rýži), výrobcích z nich (Kabak, 2009) a ve vepřovém mase (Weidenborner, 2001). Nejrozšířenější je Ochratoxin A (OTA), který je nefrotoxický, imunotoxický, mutagenní, karcinogenní a neurotoxický (Mateo et al., 2007). Primárně napadá vyvíjející se nervovou soustavu, způsobuje nemoci jater a ledvin u monogastrických zvířat (Krměčık a Kysilka, 2001).



Obrázek 1.4: Struktura Ochratoxinu A

## T-2 toxin

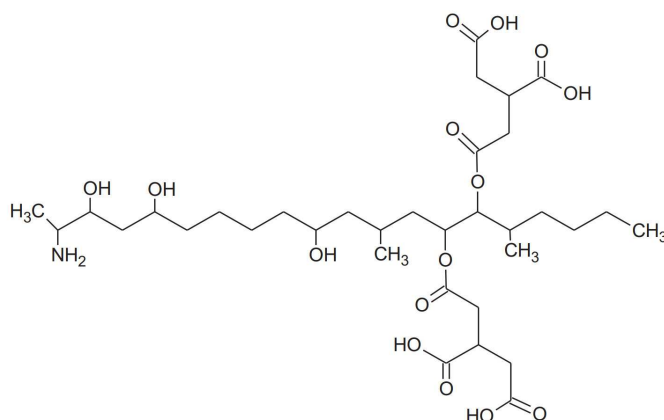
T-2 toxin je přirozeným produktem hub rodu *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum*) (CAST, 2003) a nejčastěji se vyskytuje v obilovinách, kukuřici a rýži. Způsobuje gastroenteritidy, krvácení v oblasti hlavy, střev a dutiny břišní, průjemy a poruchy tvorby krve (Hajšlová, 2008). Jako jediný z mykotoxinů byl použit jako biologická zbraň ve válce.



Obrázek 1.5: Struktura T-2 toxinu

## Fumonisin

Producentem fumonisinů jsou houby rodu *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*). Pro člověka jsou Fumonisy možným karcinogenem (Velíšek a Hajšlová, 2009), u zvířat způsobují vážné nemoci (leukoencephalomalacii u koní, plicní edém u prasat atd.) (Yoshizawa et al., 1994). Popsány jsou Fumonisy  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  a  $C_1$ . Nejčastěji se v přírodě vyskytují Fumonisy  $B_1$ ,  $B_2$  a  $B_3$ . Nejvýznamějším zdrojem Fumonisinů je kukuřice a potraviny na jejím základě (Nelson et al., 1993), naopak v pšenici a ječmenu se běžně neobjevují (Schrödter, 2004).



Obrázek 1.6: Struktura Fumonisinu B1

Nejzkoumanějším mykotoxinem je deoxinivalenol (DON), jehož významným producentem je houba rodu *Fusarium graminearum*. Výskyt v cereáliích je meziročně velice variabilní, přičemž klíčovým faktorem jsou klimatické podmínky, předplodiny a odolnost dané půdy. V některých letech lze prokázat přítomnost tohoto mykotoxinu prakticky ve 100 % vyšetřovaných vzorků (Běláková et al., 2014; Velíšek a Hajšlová, 2009). Mykotoxiny mohou být částečně metabolizovány za vzniku konjugovaných forem mykotoxinů. Nejznámější a dosud nejprobádanější je deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosid (D3G), který se v pšenici vyskytuje v množství ojedinele až 30 % molární koncentrace volného deoxinivalenolu.

Výše vyjmenované mykotoxiny, vyjma T2 toxinu, jsou u potravin monitorovány a jejich maximální povolený obsah v  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  je stanoven komisí Evropské unie v Úředním věstníku (Úř. věst. L 364, 19. 12. 2006, s. 15–21). Nejdůležitější limity jsou shrnuty v následující tabulce č. 1.1.

Tabulka 1.1: Maximální limity mykotoxinů v obilovinách dle Úř. věšt. L 364

Mykotoxin	Max. obsah [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	Potraviny
Aflatoxin $B_1$	2	Všechny druhy obilovin a výrobků z nich.
	5	Kukuřice tříděná nebo fyzikálně ošetřená před použitím k lidské stravě.
Aflatoxin	4	Všechny druhy obilovin a výrobků z nich.
$B_1+B_2+G_1+G_2$	10	Kukuřice tříděná nebo fyzikálně ošetřená před použitím k lidské stravě.
Ochratoxin A	5	Nezpracované obiloviny.
Deoxynivalenol	1 250	Nezpracované obiloviny vyjma kukuřice, ovesa a pšenice.
	1 750	Nezpracovaná kukuřice, oves a pšenice.
	750	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě.
Zearalenon	100	Nezpracované obiloviny vyjma kukuřice.
	200	Nezpracovaná kukuřice.
	75	Obiloviny určené k přímé lidské spotřebě.
Fumonisin	2 000	Nezpracovaná kukuřice.
T-2 toxin	nestanoven	

### 1.2.1 Vliv mykotoxinů na užitkovost zvířat

Obsah mykotoxinů v krmivech a potravinách způsobuje mnoho akutních a chronických vlivů, které mohou vést k snížení užitkovosti a přírůstku hospodářských zvířat. Dále způsobují vážné nemoci a v případě příjmu vysokých dávek mohou vést až ke smrti zvířete nebo člověka. Všechny tyto následky mají ekonomický dopad, ať už z důvodu zvýšené mortality zvířat, snížení živočišné produkce nebo ve zvýšených nákladech na zdravotní péči (Zain, 2011).

Zdravotní obtíže hospodářských zvířat vyvolané mykotoxiny jsou dány v prvé řadě druhem pozřeného mykotoxinu, jeho množstvím a případnou kombinací s jiným mykotoxinem a jejich konjugáty. Každý mykotoxin ovlivňuje tělo zvířete jiným způsobem. Jednorázové zkrmení napadeného krmiva způsobuje primární mykotoxikózy. Při dlouhodobějším příjmu krmiva obsahující menší množství toxických mykotoxinů dochází k chronickým účinkům (Suchý a Herzig, 2005). Limitní hodnoty mykotoxinů v krmivech jsou uvedeny v tabulce 1.2 (Zeman et al., 2015).

**Tabulka 1.2:** Limitní hodnoty koncentrace mykotoxinů v krmivech

Mykotoxin	Typ krmiva	Limitní koncentrace
		$[\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}]$
Aflatoxin <i>B</i> 1	Kompletní krmiva pro dojnice a mladá zvířata	5
	Krmiva	20
Deoxynivalenol	Kompletní doplňková krmiva pro prasata	900
	Obiloviny a krmiva z obilovin	8 000
	Kukuřice a vedlejší krmiva	12 000
Zearalenon	Kompletní a doplňková krmiva pro selata a prasničky	100
	Kompletní a doplňková krmiva pro telata, dojnice, ovce a kozy	500
	Kukuřice a vedlejší krmiva	3 000
Fumonisin <i>B</i> 1 a <i>B</i> 2	Kompletní a doplňková krmiva pro prasata, koně a králíky	5 000
	Kukuřice a kukuřičná vedlejší krmiva	60 000
Ochratoxin	Kompletní doplňková krmiva pro prasata	50
	Obiloviny a krmiva z obilovin	250

Obtíže způsobené napadeným krmivem ale nezávisí pouze na obsažených mykotoxinech. Velkou roli hraje také druh, pohlaví a vývojové stádium zvířete. Každý druh zvířete má rozdílnou citlivost na přijaté toxické látky a neméně důležitá je aktuální kondice a zdravotní stav zvířete. Nejvíce náchylná na přítomnost mykotoxinů v krmivu jsou monogastrická zvířata (Suchý a Herzig, 2005). Například prasata jsou velice náchylná na T-2 toxin, DON a ZEN, drůbež je náchylná také na T-2 toxin a DON, ale je velmi odolná proti ZEN (Cheeke, 1998).

Všeobecně se dá říci, že většina mykotoxinů způsobuje snížení příjmu potravy zvířaty, což vede k podvýživě, anorexii a později k úhynu zvířete, napadají trávicí ústrojí, ledviny a játra. Při reprodukci způsobují rození malých a slabých jedinců a pseudograviditu. Příklady vlivu jednotlivých mykotoxinů na zdraví prasat dle Mallman a Dilkin (2011) jsou uvedeny v tabulce 1.3.

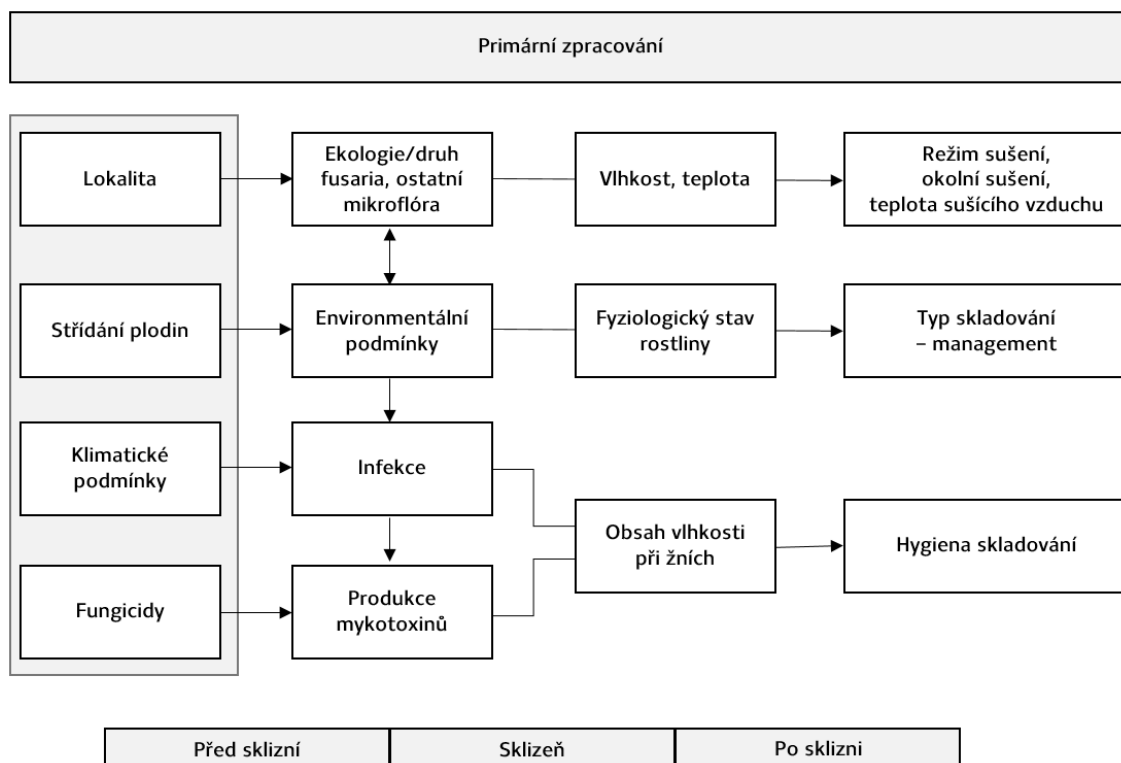


Tabulka 1.3: Vliv příjmu mykotoxinů na zdravotní stav prasat

Mykotoxin	Stádium vývoje	Limit. koncentrace [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	Hlavní klinické příznaky při překročení dávky
Aflatoxin	Rostoucí prasata	10–100	Snížená produktivita bez viditelných klinických příznaků
		200–400	Špatný růst a omezení příjmu potravy
		400–800	Hepatopatie; Imunosuprese
		800–1 200	Výrazné snížení příjmu potravy a růstu
	Prasnice/Selata	1 200–2 000	Anorexie; Smrt
Deoxynivalenol	Rostoucí prasata	500–750	Poruchy reprodukce; slabost selat nakažených skrz mléko
		2 000	Snížení příjmu potravy a růstu
		5 000–10 000	Snížení příjmu potravy, úbytek na váze
		12 000	Odmítání potravy
Fumonisin	Všechna prasata	20 000	Zvracení
		1 000–20 000	Hepatopatie, nádory, snížení produktivity, zvětšení srdce
		> 20 000	Plicní edémy, hepatopatie, snížení příjmu potravy
Ochratoxin A	Rostoucí prasata	200	Ledvinové léze
		1 000	Polyurie, Urémie
		4 000	Selhávání ledvin
T-2 toxin	Rostoucí prasata	< 2 000	Krvácení, zánět střev
		8 000	Snížení příjmu potravy
		16 000	Odmítání potravy
Zearalenon	Prasničky	1 000–3 000	Oteklá vulva a výhřez rekta
		3 000–10 000	Oteklá vulva
	Kojící prasnice	25 000	Opakované teploty
		25 000–50 000	Rození malých a slabých mláďat
		> 25 000	Pseudogravidita, nymfomanie

## 1.2.2 Možnosti dekontaminace mykotoxinů v krmivech

Výskyt mykotoxinů v zemědělských plodinách lze ve velké míře ovlivnit již v průběhu primárního zpracování. Správně zvolené postupy polního managementu a postupy po sklizni mohou snížit riziko napadení plodin houbovými patogeny, respektive mykotoxiny (Velíšek a Hajšlová, 2009). Faktory ovlivňující napadení zemědělských plodin houbovými patogeny jsou uvedeny na obrázku 1.7 (Hajšlová, 2008).



**Obrázek 1.7:** Faktory ovlivňující napadení zemědělských plodin houbovými patogeny

Napadení plodin houbami a s tím spojené tvorbě mykotoxinů nelze v zemědělské produkci stoprocentně zabránit. Náznaky kontaminace krmiva mykotoxiny lze pozorovat díky klinickým příznakům zvířat. Hlavním příznakem shodným pro všechny druhy hospodářských zvířat je nechutenství, snížený příjem krmiva a s tím související snížená produkce. Při zpracování surovin jsou proto upřednostňovány takové technologické postupy, které vedou ke snížení obsahu mykotoxinů v krmivu (Magan a Olsen, 2004).

K dekontaminaci se během technologického zpracování využívá chemických, fyzikálních a biologických metod (Suchý a Herzig, 2005). Každá z těchto metod má při využití své výhody a nevýhody.

### Chemické metody

Využívání chemikálií k dekontaminaci napadených krmiv je velmi rozšířenou a účinnou metodou. Do chemických metod spadá využití organických rozpouštědel, oxidačních činidel a organických kyselin (Suchý a Herzig, 2005).

— **Organická rozpouštědla**

Do chemických metod spadá využívání organických rozpouštědel, vodných roztoků chloridu vápenatého ( $CaCl_2$ ), horké vody se solí, atd. Pro ošetření kukuřice se využívá zejména tzv. čpavkování, neboli využívání bezvodného amoniaku. Tato metoda je ale vhodná na degradaci pouze některých toxinů. Nejúčinnější je při ničení aflatoxinů, méně účinná pak u ostatních toxinů.

— **Oxidační činidla**

Další velmi účinná metoda je zaměřena na využívání ozonu ( $O_3$ ) nebo peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ). Využití oxidačních činidel je účinné na degradaci aflatoxinů a fumonisinů.

— **Organické kyseliny**

Látky s obsahem organických kyselin, jako například kyseliny propionové, octové nebo mravenčí, mají protiplísňové účinky a za jistých podmínek dokáží degradovat mykotoxiny. Zmíněné kyseliny se využívají jako aditiva při zakládání siláží (Rada, 2009).

**Biologické metody**

Biologické metody dekontaminace zahrnují využití mikroorganismů, enzymů a antioxidantů (Doležal, 2012; Rada a Havlík, 2012). První pozorování biologické dekontaminace byla provedena v pivovarském průmyslu, kdy během fermentačních procesů docházelo ke snižování koncentrací mykotoxinů ve sladu, hlavně aflatoxinu (Doležal, 2012; Rada a Havlík, 2012).

— **Využití mikroorganismů**

Do biologických metod patří využití mikroorganismů a jejich produkty (kvasinkové kultury) k dekontaminaci mykotoxiny. Nejvíce se využívají bakterie mléčného kvašení, některé druhy vinných kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie rodu *Flavobacterium aurantiacum*. Tyto bakterie dokáží odstranit aflatoxiny bez produkce jiných nežádoucích metabolitů.

— **Využití enzymů**

Novější metodu, v současné době více používanou, je používání enzymů k dekontaminaci mykotoxinů. Princip využití enzymů je založen na štěpení molekul toxinů, čímž dojde k vytvoření neškodných metabolitů mykotoxinů.

— **Využití antioxidantů**

Poslední metodou je podpora detoxikačních funkcí organismu aplikací antioxidantů (vitamín A, vitamín E, aj.).

**Fyzikální metody**

Využití fyzikálních postupů patří mezi nejběžnější a nejjednodušší metody dekontaminace krmiva od mykotoxinové zátěže. Do této kategorie spadá metoda mechanického odstranění nečistot, využití degradace mykotoxinů za zvýšené teploty, působení UV a ionizujícího záření, adsorbentů anebo nově i využití nízkoteplotního plazmatu (Suchý a Herzig, 2005).

— **Mechanické odstranění nečistot**

Mechanické odstranění nečistot je nejběžnější a nejjednodušší metodou vedoucí ke snížení celkového obsahu toxinů v zrnech. Odstraněním veškerých nečistot z technologických linek, skladovacích prostor a čištěním zrnin lze snížit obsah toxinů například u kukuřice až o 32 % (Suchý a Herzig, 2005).

— **Mísení zrn**

Nejedná se o přímou dekontaminaci, ale případná kontaminace krmiv se rozředí mísením ve zdravém krmivu.

— **Teplota**

Správným nastavením teploty a času ošetření lze dosáhnout u některých druhů mykotoxinů jejich rozkladu. Účinnost metody závisí zejména na typu mykotoxinu a obsahu vody v krmivu. Bohužel u tohoto typu ošetření může docházet k ničení živin obsažených v krmivech (Voet a Voet, 1995).

— **UV a ionizující záření**

Ultrafialové a ionizující záření je již dlouho známo pro jeho sterilizační efekt (Ohkawa et al., 2006; Talpa, 2010). Ultrafialové záření je elektromagnetické vlnění s vlnovými délkami kratšími, než mají fotony ve viditelné části spektra. Vlnové délky se pohybují v rozmezí od 10 do 400 nm. Ošetření za pomoci UV záření může být velice efektivní, ale zároveň s ním mohou být ničeny i živiny obsažené v krmivu.

— **Adsorbenty**

Další z metod je využití sorbentů (minerálních látek) k absorpci molekul mykotoxinů. Těto metody se využívá v případě, kdy dojde k přenosu mykotoxinů do organismu. Navázáním molekul mykotoxinů na adsorbent se zabrání jejich vstřebávání ve střevě a následnému trávení. Sorbenty musí mít nejen adsorpční vlastnosti, ale také musejí být nestravitelné. Používané adsorbenty jsou na bázi:

- a) živočišného uhlí,
- b) hlinitokřemičitanů,
  - součásti jílu,
- c) biopolymerů,
  - látky s obsahem dlouhých sacharidových nebo uhlovodíkových řetězců (přípravky s kvasinkami),
- d) syntetických polymerů,
  - Cholestyramin – v současné době jsou nejméně používané.

— **Nízkoteplotní plazma**

V současné době probíhá intenzivní výzkum využití nízkoteplotního plazmatu. Použití nízkoteplotního elektrického výboje za atmosférického nebo sníženého tlaku se uplatňuje při sterilizaci (Montie et al., 2000), úpravě povrchů materiálů (Chu, 2007) nebo k čištění vody (Laroussi et al., 2002; Zhang et al., 2014). Nízkoteplotní plazma generované při atmosférickém tlaku kombinuje působení UV záření, tepla a interakci s reaktivními částicemi, jako jsou například hydroxylové radikály ( $OH\bullet$ ) nebo ozón ( $O_3$ ). Všechny mechanismy působení plazmatu na materiál vykazují synergický efekt, který zvyšuje účinnost ošetření (Laroussi a Leipold, 2004).

### 1.3 Nízkoteplotní plazma a jeho vybrané aplikace

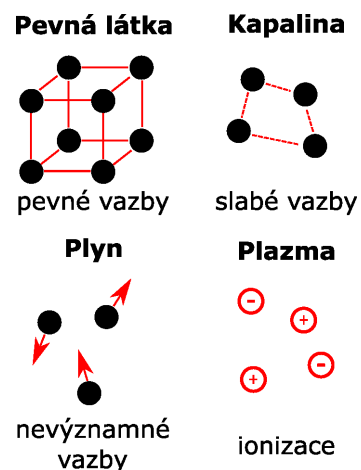
Plazmové technologie mají díky široké variabilitě procesních parametrů značný aplikační potenciál. Prakticky rutinně a s úspěchem je plazmatu využíváno k modifikaci povrchových vlastností anorganických materiálů (Bartoš et al., 2009; Yoshida et al., 2013). První aplikace nízkoteplotního plazmatu pak lze zaznamenat v biomedicíně (Scholtz et al., 2015; Yang et al., 2011), potravinářství (Konvalina et al., 2016; Ramos et al., 2013), či balicím průmyslu (Leipold et al., 2011; Pankaj et al., 2014; Wang et al., 2016; Yun et al., 2010). Novým fenoménem, kterému je v současnosti věnována intenzivní pozornost, je využití plazmatu k ošetření semen zemědělských plodin (Amini a Ghoranneviss, 2016; Chen et al., 2016; Kříž et al., 2014; Kříž et al., 2015; Šerá et al., 2013, 2010).

Plazma je jedním ze čtyř skupenství hmoty (viz obrázek 1.8). Pojem plazma pro ionizovaný plyn poprvé použil v roce 1928 americký nositel Nobelovy ceny Irwing Langmuir (1881–1957). Plazma je tvořeno především elektricky nabitými částicemi, (elektrony a ionty), neutrálními částicemi, částicemi v excitovaných stavech a volnými radikály. Plazma musí obsahovat dostatečné množství volných nosičů elektrického náboje, vykazovat kolektivní chování (reaguje na elektrická a magnetická pole jako celek) a být kvazineutrální, tzn. v makroskopickém objemu je stejný počet kladných a záporných nábojů (Kulhánek, 2011). Ne každý ionizovaný plyn můžeme tedy rovnou nazývat plazmatem.

Stejně tak, jako je krevní plazma součástí našeho života, je „fyzikální“ plazma nedílnou součástí vesmíru. Odhaduje se, že až 99 % hmoty ve vesmíru je ve formě plazmatu. Plazmatem je tvořen sluneční vítr, obálky a nitra hvězd, mlhoviny – i naše Slunce je jedna velká plazmatická koule (Schmiedt, 2006). Je tedy trochu paradoxní, že se na Zemi s plazmatem setkáváme jen velmi zřídka (kanál blesku, polární záře atd.). Člověk ale dokáže vytvořit plazma v laboratoři (laserem generované plazma, pulzní plazma, vysokoteplotní plazma v TOKAMAKU atp.).

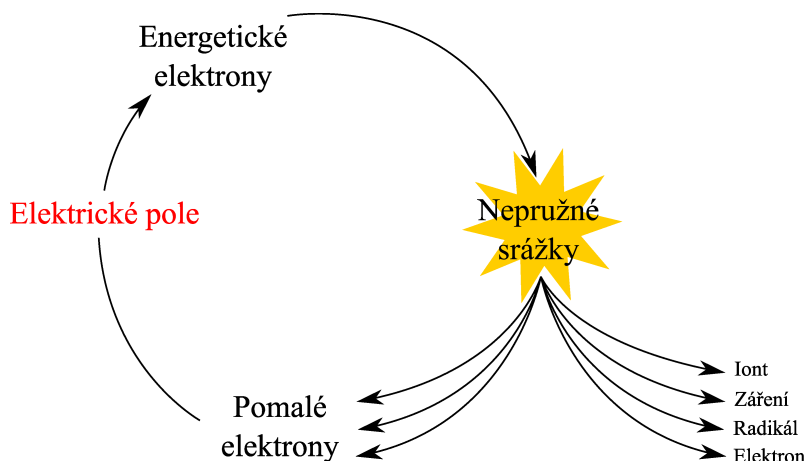
#### 1.3.1 Generování plazmatu

Obrázek 1.9 schématicky znázorňuje generování plazmatu v plynu. V každém plynu se nacházejí volné, pomalu se pohybující, elektrony. Pokud je elektronům dodána vnější energie, například prostřednictvím elektrického pole, jsou elektrony urychlovány a zvyšuje se jejich kinetická energie. Takto urychlené elektrony podstupují nepružné srážky s ostatními částicemi plynu, čímž vznikají nové ionty a částice v excitovaných stavech. V nepružných srážkách vznikají také další elektrony. Elektrony jsou elektrickým polem znovu urychlovány, dochází k dalším nepružným srážkám s částicemi plynu a celý proces se opakuje. Počet elektricky nabitých částic v plynu tak vzrůstá. O plazmatu pak mluvíme v okamžiku, kdy jsou splněny podmínky uvedené v úvodu této kapitoly.



Obrázek 1.8: Skupenství hmoty

Ionty, excitované částice a radikály přítomné v plazmatu mohou samozřejmě také zanikat. Děje se tak z pravidla v rekombinačních procesech. Výstupem těchto procesů je často záření v UV části optického spektra. Ke snižování počtu reaktivních částic vede také jejich interakce s povrchem pevných těles.



Obrázek 1.9: Princip generování plazmatu

### 1.3.2 Interakce plazmatu s povrchem těles

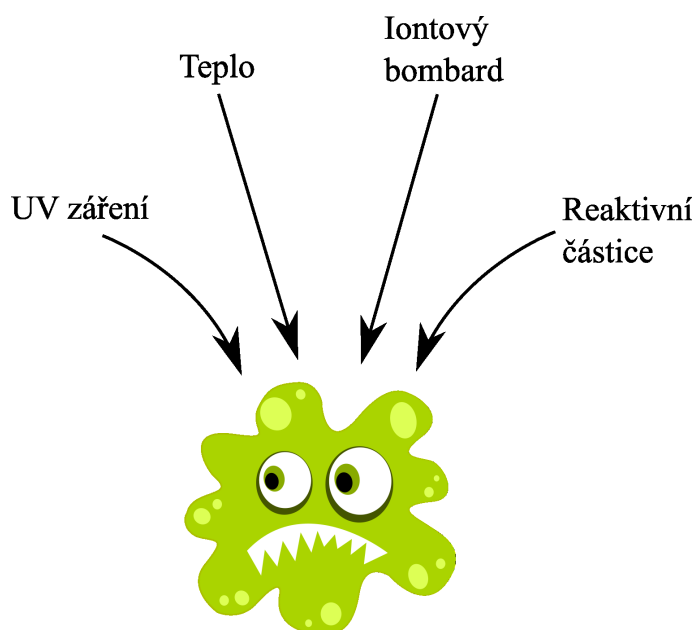
Interakci plazmatu s povrchem pevných těles můžeme popsat několika separátními procesy, kterými jsou:

- dopad reaktivních částic na povrch,
- působení UV záření,
- působení tepla,
- iontový bombard.

**Reaktivní částice** Pro potřeby této dizertační práce je nejvýznamnější plazmový výboj generovaný elektrickým polem ve vzduchu za atmosférického tlaku. Velmi rychlé elektrony vznikající v plazmatu způsobují kolize s neutrálními částicemi vzduchu. Při těchto srážkách vznikají reaktivní částice – volné radikály a disociované molekuly, reaktivní kyslík, atomární kyslík ( $O$ ), ozón ( $O_3$ ), hydroxylové radikály ( $OH\bullet$ ), různé sloučeniny dusíku ( $N_2$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ), dále samozřejmě také ionty kyslíku, dusíku a dalších složek plynu a v neposlední řadě také vznikají elektrony. Koncentrace těchto reaktivních částic v pracovním plynu závisí na jeho složení, změnou ve složení pracovního plynu (použitím příměsí) lze velmi dobře upravit parametry plazmového výboje pro následné využití v mnoha technických aplikacích, jako jsou například modifikace povrchových vlastností materiálů (Penkov et al., 2015), leptání plazmatem nebo chemické úpravy materiálů (Špatenka et al., 1999).

**UV záření** Přítomnost vysoce reaktivních částic v plazmovém výboji není jediný mechanismus využívaný v technických a biologických aplikacích. Plazma je taktéž zdrojem UV záření v UVA a UVB části spektra (Scholtz et al., 2015), které je velmi dobře známo pro své sterilizační účinky (Fridman et al., 2008; Moisan et al., 2009; Stapelmann et al., 2008).

**Teplo a iontový bombard** Poslední neméně významnou vlastností plazmového výboje je, že může být zdrojem tepla nebo intenzivního toku elektricky nabitých částic (Bermúdez-Aguirre et al., 2013).



**Obrázek 1.10:** Možnosti interakce plazmatu s bakteriemi na povrchu těles

Intenzita působení těchto faktorů závisí na řadě proměnných, například na zařízení, které bylo pro generování plazmatu použito, druhu generovaného výboje, složení, tlaku a průtoku pracovního plynu atp. Chemické reakce probíhající v nerovnovážném stavu plazmatu jsou totiž často rozdílné oproti klasickým chemickým reakcím se kterými se setkáváme v kapalinách a plynech. Synergie těchto vlastností může hrát klíčovou roli v efektivitě a účinnosti procesů zacílených na dekontaminaci bakterií, plísní a dalších nežádoucích mikroorganismů z povrchu potravin a krmiv. V průběhu takového ošetření ale nesmí dojít k nežádoucímu vlivu na kvalitu potravin a krmiv (změna barvy, chutě, výživových parametrů aj.).

Rozmach využití plazmových výbojů v technické praxi měl za následek vznik mnoha systémů určených k jejich generování. Rozmanitost těchto přístrojů a komplexita samotného plazmatu nicméně znemožňuje jejich vzájemné porovnání (Moreau et al., 2008), což také částečně komplikuje další vývoj v této oblasti.

Široká škála možností chemických podmínek je dána snadnou úpravou parametrů (Bogaerts et al., 2002) jako jsou:

— **vstupní chemické podmínky**

složení pracovního plynu,

— **tlak**

od 0,1 Pa až po atmosférický tlak – výboje za vyššího tlaku jsou charakteristické vyšším počtem srážek mezi jednotlivými částicemi,

— **struktura elektromagnetického pole**

většinou vystavení externímu elektromagnetickému poli – využití k urychlování částic,

— **parametry systému a výboje**

počet, tvar a rozmístění elektrod, průtok pracovního plynu.

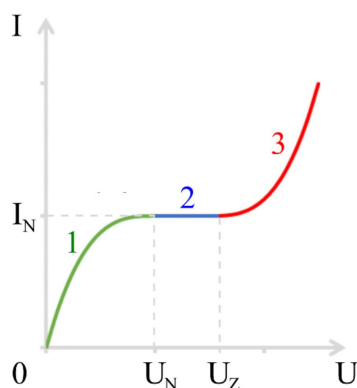
Velká variabilita plazmových výbojů, která je funkcí celé řady výše uvedených parametrů, nabízí pro využití v technických aplikacích značný potenciál. Lze předpokládat, že v budoucnu význam plazmových technologií ještě poroste.

### 1.3.3 Dělení plazmových výbojů

Vznik elektrického výboje je podmíněn průchodem elektrického proudu plynem s volnými nosiči náboje. Pro udržení zapáleného elektrického výboje je nutné stále dodávat energii.

Základní dělení výbojů je podle působení ionizátoru (rentgenové záření, proud alfa částic, plamen svíčky, . . . ), který způsobuje ionizaci částic, na **samostatné** (elektrický proud v plynu se udržuje vlastní ionizací částic i po odebrání ionizátoru) a **nesamostatné** (elektrický proud v plynu se udržuje pouze po dobu působení ionizátoru) (Reichl a Všeticka, 2016).

Obrázek 1.11 znázorňuje průběh elektrického napětí a proudu plazmového výboje. Na voltampérové charakteristice jsou vyznačeny tři významné oblasti. Podle toho v jaké oblasti se pohybuje dodávané napětí lze určit zda pro zapálení plazmového výboje bude nutné externího ionizátoru nebo ne.



**Obrázek 1.11:** Voltampérová charakteristika ideálního plazmového výboje (zelená – nesamostatný výboj; červená – samostatný výboj)



V úvodní fázi, v tzv. nesamostatném plazmovém výboji, je na elektrody přivedeno elektrické napětí, čímž je zajištěno dodávání energie elektronům přítomným v plynu. Se zvyšujícím se elektrickým napětím roste energie a počet generovaných elektricky nabitých částic v plynu. S rostoucím napětím roste také celkový přenesený elektrický náboj a potažmo elektrický proud (oblast 1). Ten je možné počítat podle rovnice

$$I = \frac{dQ}{dt}, \quad (1.1)$$

kde

$I$  – elektrický proud [A],

$Q$  – elektrický náboj [C],

$t$  – čas [s].

Elektrický proud protékající obvodem se zvyšuje až do okamžiku, kdy je dosaženo tzv. nasyceného proudu  $I_N$ . V tuto chvíli jsou urychleny všechny elektricky nabitě částice v prostoru mezi elektrodami. Takto urychlené částice však nemají dostatečnou energii ke způsobení ionizace, tzn. dalším zvyšování dodávaného elektrického napětí nedochází ke zvyšování protékajícího elektrického proudu (oblast 2). K udržení elektrického výboje je stále nutné působení externího ionizátoru.

Po překročení tzv. zápalného napětí  $U_Z$ , dochází k dalšímu zvyšování protékajícího elektrického proudu. V tuto chvíli dodávané napětí dostatečně urychluje volné elektrony, které již mají dostatečnou energii k tomu, aby ionizovali neutrální částice. Vzniká tedy nový iont a nový elektron. Tímto způsobem dochází k nárůstu protékajícího elektrického proudu se zvyšujícím se elektrickým napětím. Po překročení zápalného napětí již není k udržení zapáleného výboje zapotřebí externího ionizátoru (oblast 3).

Plazmové výboje lze dělit z mnoha úhlů pohledu a není možné je dělit jen podle jednoho hlediska. Plazmové výboje dle Kulhánek (2011) lze dělit na plazma:

- částečně ionizované × úplně ionizované,
- bez tvorby elektron pozitronových párů × s tvorbou párů,
- nerelativistické × relativistické,
- klasické × kvantové,
- se zamrzlým magnetickým polem × s difundujícím polem,
- rovnovážné × nerovnovážné,
- nízkoteplotní × vysokoteplotní,
- bezsrážkové × srážkové,
- při sníženém × zvýšeném až atmosférickém tlaku.

Popis všech typů výbojů by byl velice zdlouhavý a prakticky nerealizovatelný. Proto se v následující části zaměříme na prezentaci pouze několika konkrétních příkladů, se kterými se často setkáváme v technických aplikacích. Jedná se o:

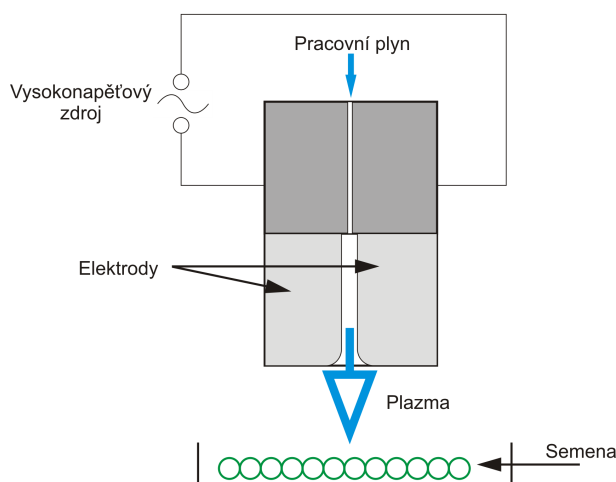
- doutnavý výboj (převážně generovaný za sníženého tlaku) (Kogelschatz, 2003; Revel et al., 1999),
  - stejnosměrný doutnavý výboj (buzený stejnosměrným napětím) (Bishop, 2011),
  - radiofrekvenční doutnavý výboj (buzený napětím o frekvenci 13,56 MHz) (Boeuf, 1987),
  - pulzní doutnavý výboj (buzený pulzním napětím) (Broks et al., 2005),
- mikrovlnný výboj (buzený mikrovlnami o frekvenci 2,45 GHz generovaný za sníženého tlaku) (Jin et al., 1991),
- dielektrický bariérový výboj (nizkoteplotní plazma generované za atmosférického tlaku) (Eliasson et al., 1994; Kogelschatz a Salge, 2001),
- klouzavý výboj (nizkoteplotní silně nerovnovážné plazma generované za atmosférického tlaku) (Burlica et al., 2014; Fridman et al., 1999).

### 1.3.4 Klouzavý výboj

Všechny experimenty realizované v této práci byly provedeny s využitím klouzavého výboje. Plazmová tryska pracuje s netermálním atmosférickým výbojem typu Gliding Arc (Klouzavý výboj, GA), někdy také nazývaný GlidArc. Gliding Arc je jednoduchý a nenákladný typ výboje. Jeho energetická účinnost je velmi vysoká, a proto se ve velké míře využívá v průmyslových oblastech (Grossmannová, 2008).

Systém určený ke generování plazmatu je tvořen třemi hlavními částmi (viz Obrázek 1.12):

1. vysokonapěťový zdroj,
2. tryska s přívodem pracovního plynu,
3. divergentní elektrody.



Obrázek 1.12: Schéma plazmové trysky typu Gliding Arc

#### ad 1) Vysokonapěťový zdroj

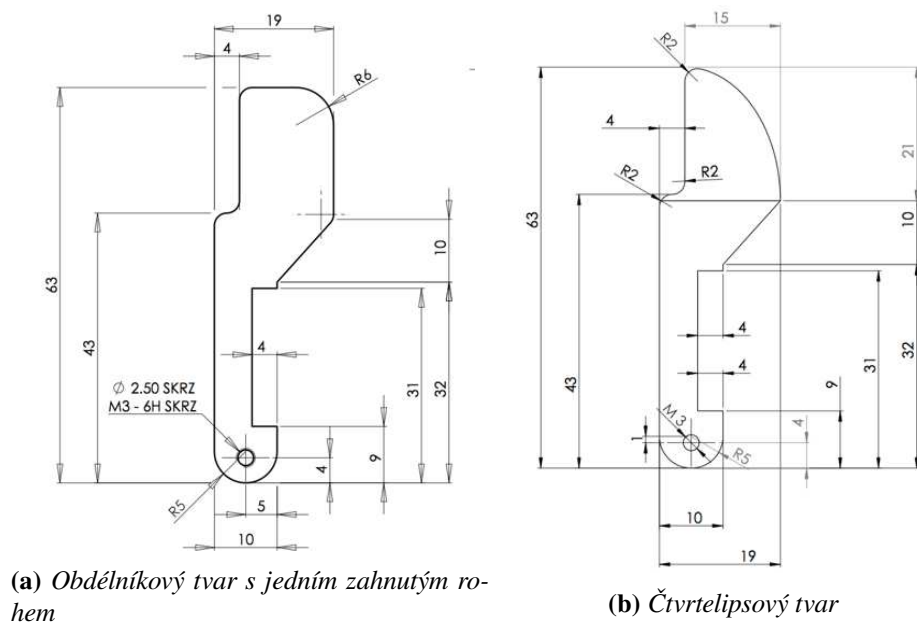
Vysokonapěťový zdroj obsahuje vysokonapěťový transformátor, který musí zajistit dostatečně vysoké napětí, aby v nejužším místě mezi elektrodami došlo k průrazu vzduchu a tím vytvoření plazmového výboje. Součástí zdroje je také řídicí jednotka, která udržuje zapálený plazmový výboj.

#### ad 2) Tryska s přívodem pracovního plynu

Neméně důležitou částí zařízení je tryska s přívodem pracovního plynu, která zajišťuje vhnání pracovního plynu do systému. Pracovní plyn ovlivňuje vlastnosti výboje a zajišťuje jeho posun po hranách elektrod. Jako pracovní plyn může být využit vzduch, vodní pára, argon, dusík, kyslík a další plyny. Typ plynu je volen podle chemických reakcí, kterých je nutno dosáhnout. Plyn je do trysky přiváděn natlakovaný s přetlakem od 5 do 6 atm.

#### ad 3) Divergentní elektrody

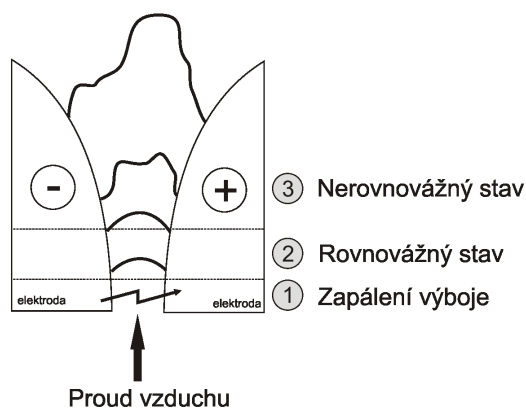
Nejdůležitější součástí experimentálního zařízení jsou divergentní elektrody. Tyto elektrody jsou umístěné v určité vzdálenosti od sebe a je na ně přiváděno vysoké napětí ze zdroje. Po dosažení potřebného napětí dochází k zapálení plazmového výboje mezi elektrodami. Tvar a materiál elektrod (viz obrázek 1.13) výrazně ovlivňuje rozložení elektrického pole v oblasti výboje a složení reaktivních částic (Bartoš et al., 2016).



Obrázek 1.13: Příklad tvarů divergentních elektrod

### 1.3.5 Časový vývoj výboje Gliding Arc

Během svého vývoje prochází plazmatický oblouk GA mnoha stavy, viz Obrázek 1.14 (Fridman et al., 1999). Během jednoho cyklu vývoje dochází k mnoha fyzikálním jevům, jako jsou například změny v elektrickém poli, změny proudu a napětí, procesy tepelného přenosu atd.



Obrázek 1.14: Fáze vývoje GA výboje

Cyklus vývoje GA začíná *zapálením výboje*. K zapálení výboje dochází po dosažení průrazného napětí mezi elektrodami. K průrazu vzduchové mezery o velikosti 1 mm při atmosférickém tlaku je potřeba dosáhnout elektrické napětí o velikosti přibližně 3 kV (Fridman et al., 1999). Přesná hodnota potřebného elektrického napětí závisí na řadě fyzikálních parametrů a lze ji vypočítat podle vzorce 1.2 (Kunhardt, 1980)

$$V_b = \frac{B(a \cdot b)}{\ln[A(p \cdot d)] - \ln[\ln(1 + 1/\gamma_{se})]}, \quad (1.2)$$

kde

$A, B$  – experimentálně zjištěné konstanty,

$p$  – tlak plynu,

$d$  – vzdálenost mezi elektrodami,

$\gamma_{se}$  – sekundární emise elektronů.

Po ustálení plazmového kanálu nastává *rovnovážný stav*. Během tohoto stavu dochází k pohybu výboje po hranách elektrod ve směru proudění pracovního plynu. Výbojový kanál se prodlužuje. Jakmile délka výbojového kanálu překročí kritickou hodnotu  $l_{crit}$  začínají být tepelné ztráty výboje větší než energie dodávaná ze zdroje a výboj nelze udržet ve stavu termodynamické stability. Výsledkem je tedy náhlý přechod do *nerovnovážného stavu*. Vyvržené plazma se rapidně ochlazuje, zatímco jeho elektrická vodivost je udržována vysokou teplotou elektronů a dochází k postupné ionizaci pracovního plynu. Veškerá energie dodávaná při tomto stavu je využita ke generování vysoce reaktivního prostředí podporujícího chemické reakce. Takovýchto reakcí se využívá například při dekompozici těkavých organických látek (Fridman et al., 1999). Na konci nerovnovážného stavu výboj zaniká.

### 1.3.6 Možnosti inaktivace hub a rozkladu mykotoxinů pomocí plazmatu

Největšího pokroku ve využití plazmatu je dosahováno v potravinářském a krmivářském průmyslu, kde je plazmatu využíváno k rozkladu nežádoucích mikroorganismů jako jsou například bakterie a houbové patogeny. Stejně tak intenzita výzkumu v této oblasti v posledních letech stále roste.

Hlavní roli při sterilizaci a dekontaminaci za pomoci plazmatu hraje UV záření a vysoce reaktivní částice jako jsou ionty, radikály a částice v excitovaných stavech (Moisan et al., 2001). Koncentrace všech těchto reaktivních částic vznikajících v pracovním plynu výrazně závisí na složení použitého plynu. Experimenty naznačují, že významnou roli v eliminaci patogenů hrají molekuly kyslíku a dusíku. Vzhledem k tomu, že tyto dva plyny tvoří převážnou část zemské atmosféry, jeví se tato kombinace jako velice výhodná a šťastná. Cui et al. (2016) poukázal na nízkou antimikrobiální účinnost ryze studeného dusíkového plazmatu proti *Salmonella Enteritis* a také *Salmonella Typhimurium* naočkovaných na vaječných skořápkách. Naproti tomu Ragni et al. (2010) prokázal výrazné snížení počtu těchto bakterií při použití výboje, kde byl jako pracovní plyn použit vzduch.

Kim et al. (2011) prováděl pokusy k prokázání důležitosti přítomnosti kyslíku v pracovním plynu. Experimenty byly prováděny s bakteriemi *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Salmonella Typhimurium*, které byly naočkovány na slanině. Na těchto bakteriích byl porovnáván vliv dvou rozdílných pracovních plynů – čistého hélia a směsi hélia s malým obsahem kyslíku. V případě přítomnosti kyslíku bylo prokázáno výrazné zvýšení efektivity celého procesu.

Taktéž proběhlo několik laboratorních pokusů se zapálením výboje v dalších plynech než pouze ve směsi kyslíku a dusíku, ale jejich využití v praxi je nejisté. Výsledky jsou velmi závislé na použitém typu vzorku (Song et al., 2009).

Dalším parametrem, který ovlivňuje oxidační sílu plazmového výboje, je vlhkost pracovního plynu (Naítali et al., 2012). Při vysoké vlhkosti dochází ke vzniku mnohem více peroxidu vodíku a kyseliny peroxynitrové/peroxynitridu – částice pracující na obdobném principu jako reaktivní části kyslíku.

### Vliv plazmatu na kvalitu potravin a krmiv

Pozitivního efektu ošetření plazmatem bylo dosaženo u mnoha bakterií (*Bacillus atrophaeus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas marginalis* a *Staphylococcus aureus*) (Ehlbeck et al., 2015). Z výsledků laboratorních testů lze usuzovat, že ošetření za pomoci plazmatu může vést k značnému snížení počtu bakterií na povrchu potravin a krmiv. Aby bylo možné smysluplně využít plazma v potravinářství a krmivářství nesmí dojít k ovlivnění kvality potravin a krmiv (chut', vůně, barva, nebo nežádoucí vliv na složení nebo nutriční hodnotu).

Nejčastěji se k dezinfekci povrchu čerstvých potravin využívá chemické metody – chlóru, ale potenciál využití plazmatu je v tomto směru veliký (Ramos et al., 2013). K prokázání využitelnosti plazmatu byly provedeny experimenty zaměřující se na výživovou hodnotu potravin a krmiv. Při ošetřování pomocí nízkoteplotního atmosférického výboje byly zjištěny minimální změny ve sledovaných nutričních hodnotách jahod (Misra et al., 2014a), cherry rajčat (Misra et al., 2014b), pšenice (Kříž et al., 2015) a tritikale (Kříž et al., 2014).

Jak již bylo uvedeno výše, parametry ošetření plazmatem musí být zvoleny tak, aby nedocházelo k negativnímu ovlivnění kvality potravin a krmiva, ale aby také došlo k požadované degradaci mikroorganismů. Řešením těchto dvou témat je věnována celá řada studií s různými výsledky.

Ve všech pracích byl prokázán opět pozitivní efekt na degradaci bakterií a v mnoha studiích nebyl prokázán negativní efekt na kvalitu ošetřovaných potravin a krmiv. Například práce Ragni et al. (2010) se zaměřila na kvalitu vajčiček, která ani po 90 min nebyla ovlivněna, a Wang et al. (2016) se se svým týmem zaměřil na vzhled čerstvých kuřecích prsou, který taktéž po ošetření a dalším skladování nebyl ovlivněn.

Naproti tomu Pasquali et al. (2016) prokázal pozitivní vliv plazmatu na dekontaminaci bakterií *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* na listech čekanky, ale došlo k výrazným změnám kvality. Bezprostředně po ošetření nebyly pozorovány žádné změny v kvalitě, ale již po prvním dni skladování došlo k viditelným změnám v porovnání s kontrolním vzorkem. Také Baier et al. (2014), který se zaměřil na kvalitu čerstvého ovoce a zeleniny, došel k závěru, že použití DBD výboje nezaručuje dostatečnou kvalitu produktu.

Ošetření plazmatem může někdy také způsobit změny barevnosti potravin. Změny barvy byly pozorovány například u pomerančů (Kovačević et al., 2016) a kiwi (Ramazzina et al., 2015). Zároveň mohou být ovlivněny také fyzikální vlastnosti potravin a krmiv jako je tvrdost (Lee et al., 2016), pevnost a změna povrchového napětí (Oh et al., 2016).

Dalším často zkoumaným problémem je antioxidační aktivita krmiv. Vyšší aktivita byla naměřena například u hnědé rýže ošetřené plazmatem (Chen et al., 2016; Lee et al., 2016), což může vést i k lepší stravitelnosti. Na druhou stranu žádné změny antioxidační aktivity nebyly pozorovány u kiwi (Ramazzina et al., 2015) a jablek (Tappi et al., 2014).

## Vliv plazmatu na houbové patogeny a mykotoxiny

Z předchozí kapitoly je zřejmé, že plazma lze účinně využít ke sterilizaci povrchu infikovaných potravin a krmiv. V současnosti se výzkumné týmy intenzivně zaměřují také na eliminaci houbových patogenů. Tyto plísně obvykle produkují nežádoucí chemické sloučeniny, sekundární metabolity – mykotoxiny, které představují možné riziko pro zdraví lidí a živočichů (Bryden, 2012; Devreese et al., 2014; Iheshiolor et al., 2011; Malíř et al., 2013; Nagl a Schatzmayr, 2015).

Nejnámější mykotoxiny, které se často objevují v potravinách a krmivech a jsou velmi dobře známé pro jejich toxické účinky, jsou aflatoxin, deoxynivalenol, vomitoxin, ochratoxin, zearaleon a T-2 toxiny. Detailní přehled mykotoxinů objevujících se v potravinách a krmivech zpracoval Bhat et al. (2010) nebo Kostelanská et al. (2009).

Mykotoxiny se objevují téměř ve všech sklizených obilovinách, přičemž jejich koncentrace může být ovlivněna agrotechnickými postupy (Konvalina et al., 2016). Práce Habischied et al. (2011) se zabývala vlivem laboratorních podmínek (doba inkubace, vlhkost aj.) na obsah zearalenonu ve sladovnickém ječmeni. Výsledky naznačují nezanebatelný vliv skladovacích podmínek na koncentraci zearalenonu v důležitých frakcích sladovnického ječmene.

Mykotoxiny jsou většinou chemicky a teplotně stabilní a ošetření za pomoci fungicidů neovlivní jejich obsah v ječmeni (Malachová et al., 2010). Stejně tak Kottapalli a Wolf-Hall (2008) zkoušeli neúspěšně ošetření nakaženého ječmene horkou vodou. He et al. (2010) ve své práci využívá chemických a biologických metod (alkalizace, oxidace, redukce, hydrolýza aj.) ke snížení mykotoxinů. Tyto metody mohou vést ke snížení obsahu mykotoxinů, ale toxicita výsledných produktů zůstává zachována.

Kapitolou samo o sobě jsou mykotoxiny nacházející se v pивě. Nežádoucí chemické sloučeniny totiž mohou být do piva velice snadno smyty. Navíc koncentrace mykotoxinu je ovlivněna procesy uvnitř semen a mění se v čase (Maul et al., 2012; Pazderů et al., 2016; Wolf-Hall, 2007). Detailní analýzou přenosu pěti Fusariových toxinů (deoxynivalenol, HT-2 toxin, zearalenon a 15- a 3-acetyl-deoxynivalenol) z ječmene v průběhu skladování se zabýval tým K. Lancové (Lancová et al., 2008). Obsah sledovaných mykotoxinů byl po zeskladování ječmene větší než před skladování a koncentrace měla tendenci se během skladování zvětšovat.

V letech 2008 až 2010 byla provedena detailní studie o výskytu mykotoxinů ve sladovnickém ječmeni jejíž výsledky byly detailně popsány v publikacích Běláková et al. (2014) a Bolechová et al. (2015). Stanovení koncentrace mykotoxinů bylo provedeno metodou vysoko-výkonové kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektroskopií. Deoxynivalenol byl pozorován ve většině vzorků, ale pouze v jednom případě překročil dovolený limit. Autoři na základě výsledků doporučují sledování kvality surových potravin, aby byla zajištěna ochrana zdraví konzumentů. Koncentraci deoxynivalenolu a fumosinů v sladovnickém ječmeni sledoval také tým K. C. Piacentiniho (Piacentini et al., 2015).

Práce zabývající se rozkladem houbových patogenů za pomoci plazmatového výboje se zaměřují na houby, které produkují mykotoxiny ve velké koncentraci. První významnou práci zabývající se degradací houbových patogenů za pomoci plazmatu publikoval tým pod vedením B. J. Parka (Park et al., 2007). V jeho případě bylo použito mikrovlnného zdroje plazmatu v atmosférickém tlaku. Bohužel tato práce byla nadlouho jedinou v tomto směru. Amini a Ghoranneviss (2016) zkoušeli vliv plazmatu na houbu *Aspergillus flavus*, která je zodpovědná za produkci aflatoxinu v průběhu skladování. V experimentech využili

plazmové trysky, pomocí které ošetřovali vlašské ořechy. Již po 10 min došlo k eliminaci veškerých spor houby na povrchu ořechů. Z těchto výsledků je zřejmé, že využití ošetření za pomoci plazmatu může být účinným způsobem, jak snížit produkci mykotoxinů během skladování.

Účinnost dalšího plazmového systému byla potvrzena týmem pod vedením B. G. Dasana (Dasan et al., 2016). V experimentech bylo využito plazmového systému fluidního lože v atmosférickém tlaku (APFBP) pro dekontaminaci semen kukuřice, která byla napadena spory houby *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Po ošetření došlo ke snížení koncentrace spor o více než 3 log po třech minutách a nebyly pozorovány žádné přeživší buňky. Následně ošetřená kukuřice byla skladována při 25 °C po dobu 30 dní a po uplynutí této doby nebyl pozorován žádný nárůst koncentrace houbových patogenů.

Také tým A. Zahoranové (Zahoranová et al., 2016) ve svých experimentech prokázal značné snížení toxicity hub *Fusarium nivale*, *Fusarium culmorum*, *Trichothecium roseum*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus clavatus* po ošetření bariérovým plazmovým výbojem.



---

## Kapitola 2

### Cíl a hypotézy práce

Cílem dizertační práce je rozpracovat problematiku využití nízkoteplotního plazmatu k eliminaci houbových patogenů z povrchu krmiv používaných pro hospodářská zvířata a otestovat možnosti využití plazmatu ke snižování jejich mykotoxinové zátěže. Za účelem dosažení tohoto cíle byly pracovní aktivity rozděleny do pěti dílčích tematických celků, které na sebe vzájemně navazovaly:

1. Stanovení parametrů plazmového výboje a jejich závislost na fyzikálně technických parametrech systému.
2. Vývoj technického řešení pro ošetření krmiv nízkoteplotním plazmatem typu Gliding Arc s možností volby vstupních parametrů.
3. Vliv plazmatu na vybrané nutriční parametry ošetřených krmiv.
4. Vliv plazmatu na houbové patogeny a mykotoxiny nanesené na modelových laboratorních substrátech (Petriho miska).
5. Vliv plazmatu na houbové patogeny a mykotoxiny na reálných substrátech (krmivo).

Každá z výše uvedených oblastí umožnila nalézt odpověď na otázky, které jsou klíčové pro úspěšné dosažení cíle dizertační práce.

Dílčím cílem prvního tematického celku bylo charakterizovat plazmový výboj a stanovit parametry nezbytné pro vývoj technického řešení. Zároveň se podařilo získat cenné informace pro následnou analýzu naměřených dat.

V druhé etapě byla navržena a zkonstruována zařízení pro rovnoměrné ošetření přesně stanovené dávky zrnin pomocí plazmatu. Automatizace tohoto systému a možnost nastavit jednotné parametry pro ošetření zrnin je nezbytná s ohledem na možnost vzájemného porovnání dat z různých dávek.

Dílčím cílem třetí etapy bylo posoudit vliv plazmatu na vybrané nutriční parametry ošetřovaných krmiv (vláknina, tuk, popeloviny, bílkoviny, dusíkaté látky nebílkovinné a bezdusíkaté látky výtažkové). Pokud by se podařilo prokázat, že dochází k výraznému ovlivnění výživové hodnoty krmiva, jednalo by se o významnou překážku pro následné využití této technologie v praxi – a to i v případě, že by se podařilo degradaci mykotoxinů plazmatem prokázat.

Experimenty realizované v rámci čtvrtého tematického celku měly za cíl prokázat vliv plazmatu na houbové patogeny a mykotoxiny v podmínkách, které jsou minimálně ovlivněny jinými vnějšími faktory. Proto byl tento biologický materiál nanesen na povrch Petriho misky, ošetřen plazmatem a následně analyzován v laboratoři.

V závěrečné etapě byl testován vliv plazmatu na houbové patogeny a mykotoxiny, které jsou přítomné na reálných zrnech a kde je možno očekávat vliv dalších faktorů, které budou pro následný transfer technologie do praxe klíčové.

## Výzkumné hypotézy

Na základě cíle a metodiky práce byly stanoveny následující výzkumné hypotézy:

**Hypotéza H1:** Ošetření spor houby *Trichoderma virens* plazmovým výbojem typu Gliding Arc snižuje jejich klíčivost v laboratorních podmínkách.

**Hypotéza H2:** Snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* je způsobeno synergii několika mechanismů působení plazmového výboje – zejména teplotou, UV zářením a interakcí spor s reaktivními částicemi generovanými v plazmatu.

**Hypotéza H3:** Ošetření plazmovým výbojem vede ke snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* na obilkách semen modelových hospodářských plodin.

**Hypotéza H4:** Ošetření vzorku mykotoxinů DON a DON-3-Glc umístěného na Petriho misce plazmovým výbojem typu Gliding Arc způsobuje jejich rozklad, tj. snižuje koncentraci mykotoxinů ve vzorku.

**Hypotéza H5:** Ošetření vzorku mykotoxinů DON a DON-3-Glc přítomných v obilkách pšenice a ječmene plazmovým výbojem typu Gliding Arc způsobuje jejich rozklad, tj. snižuje koncentraci mykotoxinů ve vzorku.

---

## Kapitola 3

### Materiál a metodika

#### 3.1 Plazmová aparatura

System pro generování plazmového výboje za atmosférického tlaku je tvořen čtyřmi hlavními částmi (viz obrázek 3.1): vysokonapěťový zdroj, plazmová tryska, kompresor a míchací zařízení.

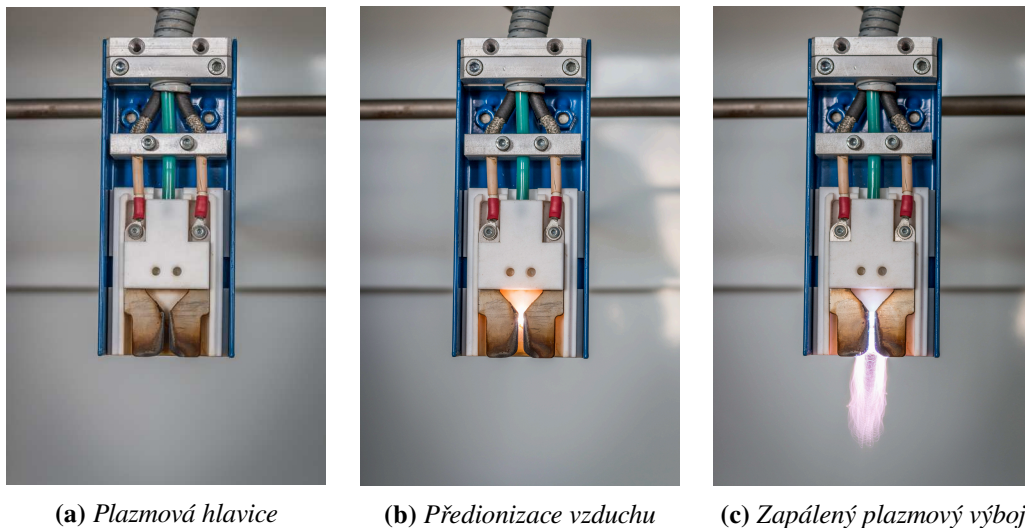


Obrázek 3.1: System pro generování plazmového výboje typu Gliding Arc

**Vysokonapěťový zdroj** Vysokonapěťový zdroj GVN1k-2011 firmy RADAN, s.r.o. obsahuje vysokonapěťový transformátor (10 kV) pracující s frekvencí 50 Hz. Přímou v napájecím zdroji je integrován rotametr Omega FL-2008, kterým se nastavuje požadovaný průtok pracovního plynu v plazmové trysce. Tento rotametr je schopen regulace průtoku v rozsahu 10–100 SCFH (Standard Cubic Feet per Hour). Průtok 35,3 SCFH odpovídá hodnotě 1 Nm<sup>3</sup>/h.

**Kompresor** Přetlak pracovního plynu přiváděného do plazmové trysky byl udržován pomocí kompresoru Orlick IKD 11/40. Přetlak pracovního plynu byl nastaven na hodnotu cca 600 kPa. Systém dokáže tuto hodnotu udržet téměř konstantní po celou dobu ošetření.

**Plazmová hlavice** Plazmový výboj je generován v plazmové hlavici (obrázek 3.2) mezi dvojicí nerezových divergentních elektrod. Tyto elektrody mohou být různého tvaru. V našem případě byly obdélníkového tvaru s jedním zakulaceným rohem o poloměru 6 mm (viz obrázek 1.13a). Minimální mezera mezi nimi byla 2 mm. Elektrody jsou zakryty z důvodu bezpečnosti obsluhy a z důvodu vysokých pracovních teplot obalem z polytetrafluorethylenu (PTFE) a nakonec ještě překryty elektricky uzemněným nerezovým krytem. Celá plazmová hlavice byla umístěna na kovových ramenech s nastavitelnou výškou a úhlem naklonění. Zařízení umožňuje pracovat ve filamentárním nebo doutnavém módu.



(a) Plazmová hlavice

(b) Předionizace vzduchu

(c) Zapálený plazmový výboj

Obrázek 3.2: Fotografie plazmové hlavice

**Míchací zařízení** Míchací zařízení (3.3) je využíváno k míchání ošetřovaných semen a v systému zajišťuje rovnoměrné ošetření všech semen. Míchací zařízení je tvořeno nádobou válcového tvaru a stejnosměrným motorem o napětí 24 V a jmenovitém příkonu 60 W, který je přes převodovku a hřídel spojený s míchací vrtulí uvnitř nádoby. Míchací nádoba je vyrobena z polypropylenu (PP), má průměr 110 mm, výšku 200 mm a tloušťkou stěny 2,7 mm. Otáčky vrtule jsou regulovány napětím z rozvaděče, přičemž nastavená hodnota napětí 20 V odpovídala frekvenci 50-ti otáček za minutu. Z důvodu lepšího proudění vzduchu skrze vrstvy semen je stěna nádoby opatřena malými otvory. Tento drobný detail má za následek také lepší ochlazování semen vystavených plazmovému výboji.



Obrázek 3.3: Míchací zařízení

Tabulka 3.1: Vybrané parametry experimentálního zařízení

Parametr	Hodnota	Parametr	Hodnota
<b>Vysokonapěťový zdroj</b>		<b>Plazmová hlavice</b>	
El. napětí zdroje	230 V	Šířka hlavice	63 mm
Frekvence	50 Hz	Výška hlavice	15 mm
Maximální příkon	1,3 kW	Hloubka hlavice	30 mm
Bezpečnostní krytí	IP20	Průtok prac. plynu	10–100 SCFH
<b>Míchací zařízení</b>			
Výška nádoby	200 mm		
Tloušťka stěny nádoby	2,7 mm		
Průměr nádoby	110 mm		
Frekvence otáčení			
míchací vrtule	0–60 s <sup>-1</sup>		
Napájecí napětí motoru	24 V		

## 3.2 Použitý biologický materiál

### 3.2.1 Semena

K experimentům byly vybrány plodiny: ječmen jarní, odrůda Francin, pšenice jarní, odrůda Tercie, slad ječný z ječmene jarního, odrůda Francin a slad pšeničný z pšenice ozimé, odrůda Golem.

Ječmen a pšenice jarní byly zakoupeny u šlechtitelské společnosti SELGEN a.s. Ječný a pšeničný slad byl dodán Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským.

Odrůda ječmene jarního FRANCIN není zpravidla používána pro výživu člověka a zvířat, ale své uplatnění nalézá pro sladovnické účely. Pro potřeby této dizertační práce byl použit především z finančních důvodů, protože na projektu, v jehož rámci byly rozborů koncentrace mykotoxinů realizovány, spolupracoval společně s Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích také Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. Rozbor jednoho vzorku dle katalogu VÚPS představuje náklad ve výši 1 591 Kč a použití této odrůdy snížilo náklady na provedené experimenty.

### 3.2.2 Houby

Vliv plazmatu na spory hub byl testován na modelovém organismu *Trichoderma virens* kmen Tri T001. Mykoparazitické houby rodu *Trichoderma* jsou rychle rostoucí druhy vláknitých hub a jsou rozšířeny po celém světě. V současnosti je popsáno přibližně 75 druhů hub rodu *Trichoderma* a mnohé z nich lze použít k ochraně rostlin. Druh *T. virens* byl zvolen jako modelový organismus s ohledem na možnost kvalitní produkce uniformní biomasy, která je na spolupracujícím pracovišti na vysoké úrovni.

K ošetření byla použita plně vysporulovaná sedmidenní kultura. Za pomoci korkovrtu byly z kultury vyříznuty terčíky o průměru 10 mm, které byly následně umístěny na sterilní podložní sklíčko a vloženy do Petriho misky. Pro kvalitnější kontrolu byly založeny 2 kontrolní varianty.

### 3.2.3 Mykotoxiny

V současnosti je známo více než 500 druhů mykotoxinů. Pro naše experimenty byl jako modelový mykotoxin vybrán nejrozšířenější z mykotoxinů, a to deoxynivalenol spolu s jeho konjugátem deoxynivalenol 3- $\beta$ -D-glukopyranosidem. Tato dvojice byla zvolena jednak s ohledem na jejich rozšíření a probádanost, ale také s ohledem na souběžně probíhající experimenty Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s..

Deoxynivalenol je produktem houby rodu *Fusarium* a *Stachybotrys*. Nejčastěji se vyskytuje v pšenici, ječmenu a kukuřici. U zvířat způsobuje snížení imunity, výkonnosti a může způsobit i úhyn zvířete. U lidí se otrava mykotoxinem projevuje průjmami, zvracením a bolestí hlavy (Rotter et al., 1996).

### 3.3 Metodiky stanovení vybraných výživových parametrů

Analýza krmiv je extrémně užitečným prostředkem nejen pro producenty, ale i pro chovatele hospodářských zvířat jako konečné spotřebitele krmiv. Producenti analýzy využijí k posouzení použitých zemědělských postupů a jejich vliv na nutriční hodnoty. Chovatelům poskytují informace podstatné pro stanovení optimálních poměrů krmiv tak, aby byly co nejefektivněji využity. Informace získané analýzou výživových parametrů krmiv jsou tedy velmi podstatné z hlediska ekonomiky provozu podniku (Mertens, 2000).

V produkci masa a mléka krmivo obvykle představuje více jak 50 % všech nákladů. Proto je velice důležité znát přesné složení krmiva a jeho potenciál při výživě zvířat. Cena analýzy krmiva je zanedbatelná v porovnání s cenou krmiv (Mertens, 2000).

**Tabulka 3.2:** Orientační spotřeba krmiv u vybraných druhů zvířat

Druh zvířete	Denní	Roční
	[kg]	[t]
Dojnice	30–50	15–20
Kůň	25–30	10
Ovce	5–10	2–4
Prasnice	2,5–5	1,1
Slepice (velkochov)	0,125	0,045

Krmiva jako taková jsou komplexní materiál složený z mnoha chemických látek. Každá složka krmiva má svou důležitou a nezastupitelnou roli ve výživě živočichů a lidí. Na následujících řádcích bude uvedena základní charakteristika základních složek krmiva, která vychází z chemické analýzy od Štercová et al. (2012).

**Sušina** Sušina je základní hodnota charakterizující jakékoliv krmivo. Hodnota sušiny respektive vlhkosti krmiva ovlivňuje skladovatelnost a příjem zvířaty. Taktéž podle této hodnoty lze určit vegetační zralost porostu. Ačkoli sušina vyvolává pocit sytosti, je zodpovědná pouze za mechanické nasycení nikoliv fyziologického nasycení. Fyziologické nasycení je dáno obsahem živin v krmivu.

**Minerální látky** Minerální látky jsou pro organismus naprosto nezbytné, protože si je nedokáže sám syntetizovat. Tělo zvířat obsahuje přibližně 4–5 % minerálních látek. Minerální látky udržují acidobazickou rovnováhu a stálost vnitřního prostředí, jsou součástí tělních tekutin a podílí se na výstavbě tkání. Minerální látky se mohou v krmivech vyskytovat jako makroprvky a mikroprvky, dle jejich obsahu v krmivech.

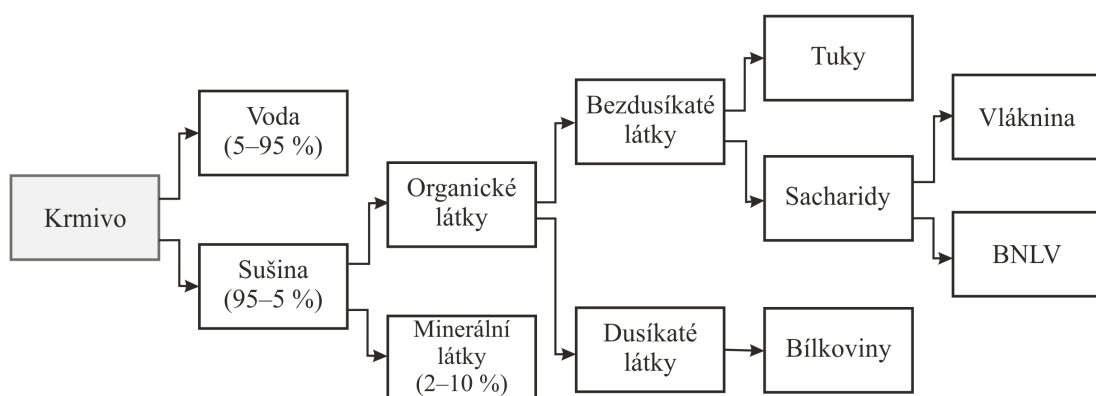
**Dusíkaté látky** Všechny látky obsahující ve své molekule dusík (N) jsou nazývány jako dusíkaté látky. Množství v krmivu se stanovuje podle Kjeldahla (Kjeldahl, 1883) jako obsah dusíku vynásobený koeficientem 6,25 (vychází z průměrného obsahu dusíku ve většině bílkovin 16 %;  $100/16 = 6,25$ ). Dusíkaté látky jsou nezbytné pro funkci živočišného těla

a nedají se nahradit jinými látkami. Jsou zdrojem energie při nedostatku tuků a sacharidů. Při využití dusíkatých látek jako zdroje energie vzniká amoniak, který musí být detoxikován v játrech a dále vyloučen z těla pryč. Při přebytku dusíkatých látek dochází k přetěžování jater s poruchou funkce vylučování žluče. Nedostatek dusíku v organismu naopak vede ke zpomalení růstu zvířete.

**Tuky** Tuky jsou estery vyšší mastných kyselin. Společný znak všech tuků je jejich nerozpustitelnost ve vodě, ale rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Slouží jako zdroj energie. Obsah energie v tucích je 2,2× větší než v sacharidech nebo dusíkatých látkách. Tělo dále využívá tuky ke stavbě nervových tkání a buněčných membrán, s jejich pomocí také může přijímat a využívat vitamíny rozpustné pouze v tucích (A, D, E a K). Tuky v rostlinách jsou ve většině případů v tekuté formě. Tekutá forma je dána vysokým obsahem nenasyčených mastných kyselin, které jsou zdraví prospěšné pro živočichy.

**Sacharidy** Sacharidy jsou základním a nejvýznamnějším zdrojem energie býložravců. Pocházejí především z krmiv rostlinného původu (60–85 % obsahu sušiny) a vznikají fotosyntézou. Stanovují se v krmivech jako bezdusíkaté látky výtažkové (škrob a cukry) a vláknina.

**Vláknina** Vláknina je dalším významným zdrojem energie, ale pouze pro býložravá monogastrická zvířata a přežvýkavce, kteří dokáží štěpit složky vlákniny. Oproti tomu všežravá zvířata a masožravci nedokáží vlákninu štěpit na stravitelné části a slouží u nich pouze jako podpora trávicího traktu. Vláknina zajišťuje mechanické nasycení zvířat.



Obrázek 3.4: Vizualizace jednotlivých složek krmiv



### 3.3.1 Stanovení obsahu sušiny (DM) a obsahu vody v krmivu

Vlhkost krmiva můžeme určit podle vztahu

$$w_{(vlhkost)} = 100 - w_{(DM)}, \quad (3.1)$$

kde:

$w_{(vlhkost)}$  – vlhkost vzorku krmiva [%],

$w_{(DM)}$  – obsah sušiny [%].

Sušení vzorku probíhá v sušárně za specifických podmínek, jež závisí na povaze krmiva. Obsah vlhkosti je později stanoven jako úbytek hmotnosti vzorku.

#### Metodika

Stanovení vlhkosti/sušiny krmiv je v současné době prováděno podle Úředního věstníku evropské unie – Nařízení komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv [online].

*Sušina krmiva* je definována jako zbytek vzorku po vysušení při teplotě  $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$  za předepsaných podmínek.

Vzorek suchého nebo předsušeného krmiva se nejdříve rozemele v mlýnku, který neabsorbuje vlhkost. Poté je navážen vzorek o hmotnosti 5–10 g (s přesností na 0,001 g), který je následně vložen do předem vysušené a zvážené hliníkové vysoušečky. Otevřená vysoušečka se vloží do vyhřáté sušárny a po dobu 4–6 hodin (podle povahy krmiva) se vzorek suší při teplotě  $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Čas se začíná počítat až od dosažení předepsané teploty. Po vysušení se vysoušečka uzavře víčkem a nechá se vychladnout v exikátoru. Po vychladnutí se vysoušečka s krmivem znovu zváží. Výpočet obsahu sušiny se poté provádí dle vzorce

$$w_{(DM)} = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100, \quad (3.2)$$

kde:

$w_{(DM)}$  – obsah sušiny [%],

$m_1$  – hmotnost navážky vzorku krmiva [g],

$m_2$  – hmotnost vysušeného krmiva [g].

*Poznámka:* Od hmotnosti navážky a vysušeného krmiva je nutno odečíst hmotnost vysoušečky.

### 3.3.2 Stanovení obsahu popelovin (Ash) v krmivu

Popelovinami jsou označovány všechny pevné látky, které zůstanou po spálení krmiva. Takovéto látky jsou nazývány jako minerální látky a jsou představovány anorganickými sloučeninami.

Minerální látky se dělí dle významu pro organismus na:

- makroprvky (Ca, Mg, K, Na, P, Cl, S),
- mikroprvky (Fe, Mo, Se, F, Mn, Cu, Co, I, Zn).

Jejich účelem je zajišťovat kostitvornou činnost, aktivace některých enzymů, pomáhají při prostupu živin skrz buněčnou stěnu aj.

Pro stanovení obsahu minerálních látek je nutný rozklad organické hmoty. Nejčastější způsob je zpopelnění, kterým se ale získá pouze hrubý přehled o celkovém množství minerálních látek v daném krmivu.

#### Metodika

Porcelánový kelímek, ve kterém bude vzorek spalován, je před zahájením měření potřeba nejprve vyžít při teplotě 550 °C a po vychladnutí se zváží s přesností na 0,0001 g. Poté se do misky naváží 5 g vzorku. Postupně se za pomoci kahanu spaluje obsah kelímku až do doby, kdy se přestane vyvíjet dým. Následně se kelímek vloží do muflové pece, kde se při teplotě 550 °C a za dostatečného přívodu vzduchu spaluje vzorek až do dokonalého spálení.

V případě, že se nevyužívá předchozí zuhelnatění za pomoci kahanu, spalování v muflové peci začíná při teplotě 200–250 °C. Po vzplanutí vzorku a jeho kompletním zuhelnatění se zvýší teplota na 550 °C.

Po vychladnutí kelímku s dokonale spáleným vzorkem se celý kelímek zváží a následně se vypočítá obsah popelovin dle vzorce

$$w_{(Ash)} = \frac{(m_2 - m_k)}{m_1} \cdot 100, \quad (3.3)$$

kde:

$w_{(Ash)}$  – obsah popelovin/minerálních látek [%],

$m_k$  – hmotnost prázdného vyžítaného kelímku [g],

$m_1$  – hmotnost navážky vzorku krmiva [g],

$m_2$  – hmotnost kelímku se spáleným vzorkem krmiva [g].

### 3.3.3 Stanovení obsahu dusíkatých látek (CP) v krmivu

Pro stanovení obsahu dusíkatých látek v krmivech se nejčastěji používá metoda dle Kjeldahla (Kjeldahl, 1883). Ve většině případů se stanovuje celkový obsah dusíku.

Analyzovaný vzorek se nejdříve mineralizuje kyselinou sírovou za varu a za přítomnosti katalyzátoru. Dusík obsažený ve vzorku zmineralizuje na síran amonný, ze kterého se v zásaditém prostředí uvolní amoniak. Amoniak se poté předestiluje s vodní parou do předlohy a titračně se stanoví.

#### Metodika

V první fázi se do mineralizační tuby naváží 1 g vzorku s přesností na 0,0001 g a následně se přidá 5–10 g katalyzátoru (bezzvodý síran draselný, krystalický síran měďnatý a práškový selen) a 30 ml koncentrované kyseliny sírové. Takto připravený vzorek se vloží do mineralizační jednotky, nasadí se pohlcovač par a vzorek mineralizujeme při teplotě 400 °C. Mineralizace probíhá přibližně 20 minut po změně barvy obsahu baňky na čirou a nazelenalou až namodralou. Vzorek se vychladí a zalije 100 ml destilované vody.

V druhé fázi dochází k destilaci amoniaku. Tuba s mineralizovaným vzorkem se vloží do destilační jednotky, kam se také vloží titrační baňka s 20 ml předlohy. Poté se přivede voda do chladiče, vyvíječe páry, páčkou se nadávkuje 300 ml 33% NaOH a spustí se vyvíječ páry. Destilace probíhá po dobu 5 min od začátku varu roztoku se vzorkem. Amoniak se předestiluje spolu s vodní parou do předlohy, která změní barvu na zelenou. Po skončení destilace se titrační baňka vyjme a obsah baňky se titruje 0,1 % roztokem HCl do šedé barvy. Zaznamenáme spotřebu HCl v ml, na jejíž základě se spočte procento dusíkatých látek v krmivu podle vzorce

$$w_{(CP)} = \frac{14,01 \cdot (a - b) \cdot 0,1}{m \cdot 10} \cdot f \cdot 100, \quad (3.4)$$

kde:

$w_{(CP)}$  – obsah dusíku ve vzorku [%],

$a$  – spotřeba 0,1 % HCl při titraci předlohy analyzovaného vzorku [ml],

$b$  – spotřeba 0,1 % HCl při titraci slepého vzorku [ml],

0,1 – molarita kyseliny chlorovodíkové pro titraci,

$m$  – hmotnost navážky vzorku krmiva [g],

$f$  – faktor dusíku – daný druhem potraviny,

- obilniny a mlýnská krmiva = 5,75,
- živočišné moučky = 6,00,
- mléko a mléčné výrobky = 6,38,
- všechna ostatní krmiva a krmné směsi = 6,25.

### **3.3.4 Stanovení obsahu bílkovin v krmivu**

V alkalickém prostředí se za pomoci měďnaté soli vysráží bílkoviny a ve sraženině se stanoví obsah dusíku podle Kjeldahla (Kjeldahl, 1883).

#### **Metodika**

Do kádinky o objemu 400 ml navážíme 1–2 g vzorku s přesností na 0,0001 g a přelijeme 100 ml destilované vody. Po přivedení k varu se vzorek vaří 2 min, poté se přilije 25 ml roztoku  $\text{CuSO}_4$  a za stálého míchání se pozvolně přilije stejné množství roztoku NaOH. Kádinka se dolije horkou destilovanou vodou až po okraj a sraženina se dekantuje. Zbýlý obsah kádinky se přefiltruje přes řídký bezdusíkový filtrační papír a sraženina se 3krát promyje horkou destilovanou vodou. Následně je sraženina na filtračním papíru vložena do mineralizační tuby a analýza probíhá dále metodou dle Kjeldahla (viz výše).

### 3.3.5 Stanovení obsahu hrubé vlákniny (CF) v krmivu

Běžné analytické metody pro stanovení vlákniny nejsou příliš přesné, jelikož jsou zatíženy systematickou chybou vlivem látek inkrustujících celulózu. Touto chybou je zatížena i použitá metoda podle Henneberg-Stohmanna (Henneberg a Stohman, 1860).

#### Metodika

Obsah hrubé vlákniny je stanovován s využitím přístroje Ankom 200 Fiber Analyzer. Přístrojem lze stanovit všechny typy vlákniny v krmivech a píci. Vzorky určené k analýze jsou navažovány v rozsahu 0,5 g až 1,0 g do speciálních filtračních sáčků F58. V jedné dávce lze zpracovat až 24 vzorků simultánně.

Vzorek krmiva o hmotnosti 1 g (s přesností na 3 desetinná místa) je vpraven do předem zváženého sáčku. Následně je až 24 ks sáčků vloženo do přístroje. Ke vzorkům je přidána přehřátá 1,25% kyselina sírová o objemu cca 2 l. Následně je kyselina přivedena k varu a od tohoto okamžiku je vzorek vařen 30 min. Po uplynutí doby potřebné k varu je vypnuto vyhřívání kapaliny, vypuštěna kyselina a vzorky zality 2 l horké destilované vody. Vzorky jsou máčeny po dobu pěti minut. Celý postup se opakuje třikrát.

K nerozpuštěnému zbytku se přidají na 24 vzorků 2 l přehřátého 1,25% hydroxidu sodného. Vše se přivede k varu a vaří po dobu 30 min. Následně jsou topná tělesa přístrojů vypnuta, hydroxid odsán a vzorky 3× propláchnuty horkou destilovanou vodou.

Zbytek po dvou hydrolýzách je 3× promyt acetonem a následně vysoušen po dobu 3 hodin při teplotě 103 °C. Po vysušení a zchladnutí se zbytek zváží.

Po zvážení jsou vzorky vloženy do muflovací pece, kde jsou spalovány při teplotě 550 °C do úplného spálení. Po spálení a vychladnutí je zbytek zvážen a zjistí se obsah popela vázaného na vlákninu. Obsah vlákniny se vypočte podle vztahu

$$w_{(CF)} = \frac{(a - b)}{m} \cdot 100, \quad (3.5)$$

kde:

$w_{(CF)}$  – obsah vlákniny ve vzorku [%],

$m$  – hmotnost navážky vzorku [g],

$a$  – hmotnost vysušeného nehydrolyzovaného zbytku (hmotnost sáčku se zbytkem - hmotnost prázdného sáčku) [g],

$b$  – hmotnost popela [g].

### 3.3.6 Stanovení obsahu tuků (EE) v krmivu

Netěkavé látky vyextrahované za podmínek metod ze vzorku relativně nepolárním rozpouštědlem se nazývají tuky.

Metoda používaná pro stanovení všech lipidů se nazývá Soxhletova (Soxhlet, 1879) a je vhodná pro vzorky s převažujícími tryacylglyceroly v lipidech. Krmiva obsahující více bílkovin nebo škrobů mají část lipidů vázaných ve formě nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Pro analýzu těchto krmiv se doporučuje využít běžných hydrolytických metod (např. za pomoci kyseliny chlorovodíkové).

#### Metodika

Ke stanovení obsahu tuku v krmivu je využit analyzátor tuků Tecator Soxtec System HT2 s extrakční jednotkou 1045, která zajišťuje samotnou extrakci, a servisní jednotkou 1046, která dodává do systému horkou vodu. V systému lze extrahovat 2 vzorky najednou, přičemž rychlost extrakce je 30–60 min.

Do extrakční tuby je navážen vzorek krmiva o hmotnosti 5 g s přesností 0,0001 g, tuba je uzavřena tukoprostou vatou a následně vložena do přístroje Soxtec. Do přístroje je také vložen extrakční kelímek se 75 ml extrakčního činidla (petrolether). Přístroj se zapne a dochází k extrakci tuků. Po dobu přibližně prvních 40 min dochází k extrakci přímo v petroletheru (extrakční tuba je ponořena). Dochází ke kondenzaci odpařeného petroletheru, který protéká tubou a tím extrahuje tuk ze vzorku. Následně je z petroletheru tuba vyjmuta a dalších 40 min je prokapávána petroletherem. Po dokončení tohoto procesu je zásobník petroletheru uzavřen, jelikož petrolether po kondenzaci již nemá kam protékat a hromadí se v zásobníku. Tím dochází k oddělování od extrahovaného tuku. Po oddělení je kelímek vyjmut a při teplotě 103 °C je po dobu 3 hod vysoušen. Po vychladnutí je kelímek zvážen a obsah tuku je vypočten podle rovnice

$$w_{(EE)} = \frac{m_2 - m_k}{m_1} \cdot 100, \quad (3.6)$$

kde:

$w_{(EE)}$  – obsah tuku ve vzorku [%],

$m_k$  – hmotnost prázdného extrakčního kelímku [g],

$m_1$  – hmotnost navážky vzorku krmiva [g],

$m_2$  – hmotnost extrakčního kelímku s vysušeným vyextrahovaným tukem [g].

### 3.3.7 Stanovení bezdusíkatých látek výtažkových (BNLV) v krmivu

Sacharidy v krmivu se stanoví jako bezdusíkaté látky výtažkové a vláknina. Bezdusíkaté látky výtažkové v sobě zahrnují především nestrukturální sacharidy. Mezi nestrukturální sacharidy patří škrob a cukry. Obsah BNLV se stanovuje nepřímou – výpočtem.

#### Metodika

Pro výpočet se využívá hodnot ostatních základních složek krmiva získaných chemickými analýzami, tj. dusíkatých látek, tuku, vlákniny, popela a z obsahu vlhkosti. Výpočet se provede podle rovnice

$$w_{(BNLV)} = 100 - (w_{(vlhkost)} + w_{(CP)} + w_{(EE)} + w_{(Ash)} + w_{(CF)}), \quad (3.7)$$

nebo

$$w_{(BNLV)} = w_{(DM)} - (w_{(CP)} + w_{(EE)} + w_{(Ash)} + w_{(CF)}), \quad (3.8)$$

kde:

$w_{(BNLV)}$  – obsah bezdusíkatých látek výtažkových v krmivu [%],

$w_{(vlhkost)}$  – vlhkost krmiva [%],

$w_{(DM)}$  – obsah sušiny v krmivu [%],

$w_{(CP)}$  – obsah dusíkatých látek v krmivu [%],

$w_{(EE)}$  – obsah tuku v krmivu [%],

$w_{(Ash)}$  – obsah popelovin v krmivu [%],

$w_{(CF)}$  – obsah vlákniny v krmivu [%].

### 3.3.8 Stanovení Brutto energie krmiva

Živočich pro fungování svého organismu potřebuje energii. Energie se do těla dostává krmivem a dále se využívá na vykonání práce prováděnou svaly, produkty látkové výměny a nebo se spotřebovává na syntézu. Veškerá dostupná energie v krmivu se nazývá Brutto energie. Její hodnota je vždy vyšší než množství energie, které krmivo zvířatům skutečně poskytne.

#### Metodika

Hodnotu energie lze zjistit dvěma způsoby: a) úplným spálením krmiva v kalorimetru v kyslíkové atmosféře, nebo b) výpočtem ze základních živin. Vzhledem k různému živinovému složení není možné pro výpočet energetické hodnoty objemných krmiv použít jednu společnou rovnici. Pro **objemná krmiva** se využívá následující rovnice

$$E_{Brutto} = 0,0588 \cdot w_{(CP)} + 0,1918 \cdot w_{(OH)}, \quad (3.9)$$

pro **kukuřici**

$$E_{Brutto} = (0,0588 \cdot w_{(CP)} + 0,1918 \cdot w_{(OH)}) - 0,15, \quad (3.10)$$

a pro **jadrná krmiva**

$$E_{Brutto} = 0,239 \cdot w_{(CP)} + 0,398 \cdot w_{(EE)} + 0,201 \cdot w_{(CF)} + 0,175 \cdot w_{(BNLV)}, \quad (3.11)$$

kde:

$E_{Brutto}$  – brutto energie krmiva [ $\text{MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ ],

$w_{(CP)}$  – obsah dusíkatých látek v krmivu [%],

$w_{(OH)}$  – obsah organické hmoty v krmivu [%],

$w_{(EE)}$  – obsah tuku v krmivu [%],

$w_{(CF)}$  – obsah hrubé vlákniny v krmivu [%],

$w_{(BNLV)}$  – obsah bezdusíkatých látek výtažkových v krmivu [%].

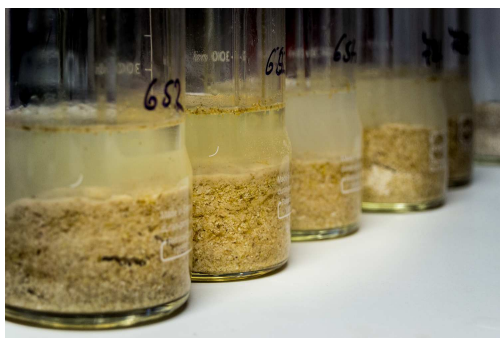


### 3.4 Stanovení koncentrace DON a DON-3-Glc metodou HPLC-MS/MS

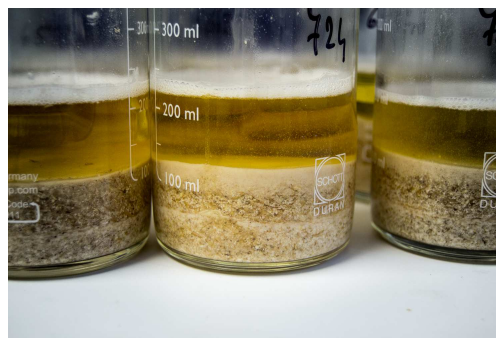
#### 3.4.1 Metodika stanovení koncentrace DON a DON-3-Glc

Níže popsaná metoda je vhodná pro stanovení koncentrace DON a DON-3-Glc v obilovinách, zrninách, sladu, chmelu a všech výrobcích z nich. Metoda vychází z normy ČSN EN 12 955.

**Příprava vzorku** Vzorek, který není v práškovém stavu, se nejdříve musí za pomoci speciálních mlýnků rozmělnit, aby mohl být homogenizován. Po homogenizaci vzorku dochází k přesnému odměření ( $25 \pm 0,1$ ) g do lyofilizační lahve a zalití deionizovanou vodou o objemu 200 ml. Následně se vzorek dezintegruje pomocí laboratorní třepačky po dobu 50 min a poté je vložen do centrifugy, kde se oddělují pevné části od kapaliny při 4000 ot/min. Vzorek je v centrifuze umístěn po dobu 10 min. V případě, že je supernatant zakalen se zfiltruje přes skleněný filtr.



(a) Rozpuštění vzorku v deionizované vodě



(b) Vzorky po dezintegraci laboratorní třepačkou

**Obrázek 3.5:** Příprava vzorku na extrakci mykotoxinů

Vzorek se poté musí přechistit, čímž dojde k odstranění interferujících látek. Přechištění bylo provedeno metodou Imunoafinitní chromatografie. Připravený extrakt se aplikuje na imunoafinitní kolonku o přesném objemu 2 ml a nechá se prokapávat rychlostí 1 až 2 kapky za sekundu. K promytí kolonky se použije 5 ml deionizované vody. Následná eluce kolonky je prováděna 1,5 ml methanolu o průtoku 1 kapky za sekundu.

Takto připravený vzorek se již může použít k analýze. V případě potřeby (například odložené analýzy) může být vzorek odpařen do sucha ve vakuové odparce a před samotnou analýzou znovu rozpuštěn v 1 ml směsi methanol/voda v poměru 1:1.

**Vyhodnocování** Ze zásobníku standardizovaného roztoku se naředí sada kalibračních roztoků do směsi methanol/voda (poměr 1:1). Koncentrace mykotoxinů v kalibračních roztocích byly 5, 10, 50, 100, 200, 500 a 1000 ng · ml<sup>-1</sup>. Všechny připravené vzorky a roztoky jsou následně analyzovány metodou HPLC-MS/MS. Obsah mykotoxinů DON a DON-3-Glc ve vzorcích se vypočítá dle vzorce

$$x = \frac{c \cdot V_1 \cdot V_2}{m \cdot V_3}, \quad (3.12)$$

kde:

$x$  – obsah DON a DON-3-Glc [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ],

$c$  – koncentrace DONu (DON-3-Glc) vypočítaná z kalibrační křivky [ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ],

$V_1$  – objem rozpouštědla použitý na extrakci [ml],

$V_2$  – konečný objem roztoku [ml],

$V_3$  – objem extraktu použitý na přečištění [ml],

$m$  – navážka vzorku [g].

**Poznámky** Stanovení obsahu mykotoxinů metodou HPLC-MS/MS se provádí za běžného tlaku, teploty a vlhkosti laboratoře.

Po provedení analýz a přípravách vzorků je nutné veškeré sklo, které přišlo do styku s mykotoxiny, desinfikovat. Desinfekce se provádí Savem, které se nechává působit po dobu minimálně dvou hodin.

---

## Kapitola 4

# Výsledky a diskuse realizovaných prací

### 4.1 Stanovení vybraných parametrů plazmové aparatury

#### 4.1.1 Měření příkonu napájecího zdroje

Elektrické napětí na elektrodách plazmové trysky je generováno pomocí vysokonapětového zdroje GVN1k-2011 vyrobeného firmou RADAN, s.r.o, který obsahuje transformátor (10 kV) pracující s frekvencí 50 Hz. Měření skutečného příkonu bylo provedeno na vstupní straně napájecího zdroje v různých pracovních režimech. K měření byl využit přístroj Metex 3836M s adaptérem na vstupní napájecí okruh.

Po zapnutí napájecího zdroje dochází ihned k odběru elektrické energie díky zabudovanému chladicímu ventilátoru. Hodnota odběru naprázdno kolísá mezi hodnotami 43 W a 46 W.

Příkon napájecího zdroje byl stanoven pro různé hodnoty průtoku pracovního plynu, konkrétně byl volen v rozsahu 30–60 SCFH v krocích po 10 SCFH. Regulace průtoku pracovního plynu byla prováděna rotametrem OMEGA FL-2008, který byl přímo zabudovaný v napájecím zdroji. Měřený příkon v průběhu celého měření neustále periodicky kolísá a bylo tedy nutné stanovit maximální hodnotu příkonu, která by určovala mezní hodnotu příkonu za daných podmínek. Naměřené hodnoty jsou uvedené v tabulce 4.1. Při zapalování výboje je hodnota příkonu o cca 50 W vyšší, následně výkon kolísá pod hodnotu uvedenou v tabulce.

Měřením stanovené hodnoty příkonu jsou prakticky nezávislé na průtoku pracovního plynu. S rostoucím průtokem pracovního plynu příkon lehce klesá. Tento pokles byl několikrát experimentálně ověřen a lze jej tak považovat za odůvodněný.

Stanovení příkonu napájecího zdroje bylo provedeno pro pozdější zhodnocení energetické náročnosti ošetření na základě spotřeby elektrické energie jednotlivých navržených systémů v kapitole 4.5. Se vzrůstajícím příkonem (výkonem), efektivnějším ošetřením, vzrůstají i náklady na elektřinu.

**Tabulka 4.1:** Příkon napájecího zdroje v závislosti na průtoku pracovního plynu

<b>Průtok pracovního plynu</b>	<b>Mezní příkon</b>
[SCFH]	[W]
30	400
40	400
50	350
60	350

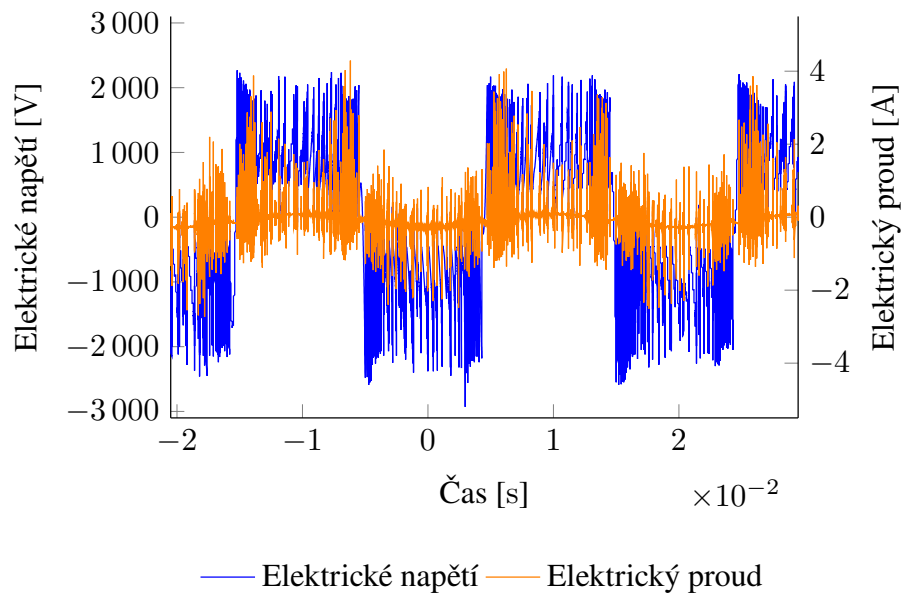
### 4.1.2 Měření výkonu plazmové trysky

Výkon plazmové trysky výrazně ovlivňuje koncentraci reaktivních částic negenerovaných v plazmatu. Vyšší výkon na elektrodách plazmové hlavice souvisí s intenzivnější tvorbou reaktivních částic v prostoru mezi nimi. Vyšší počet reaktivních částic snižuje dobu potřebnou k ošetření vzorku.

Stanovení výkonu plazmové trysky bylo provedeno nepřímo výpočtem z naměřených průběhů elektrického napětí a proudu na elektrodách plazmové hlavice. K měření průběhů elektrického napětí a proudu bylo využito osciloskopu AGILENT Technologies DSO-X 3034A a proudové sondy AGILENT 1146B. Rozsah proudové sondy byl nastaven na 10 mV na jeden dílek, stejný rozsah byl nastaven i na osciloskopu.

Výkon plazmové trysky byl stanoven pro různé hodnoty průtoku pracovního plynu – průtok byl volen v rozsahu 30–60 SCFH v krocích po 10 SCFH. Regulace průtoku pracovního plynu byla prováděna rotametrem OMEGA FL-2008, který byl přímo zabudovaný v napájecím zdroji. Pro každý průtok byla provedena dvě měření, první s vyšší vzorkovací frekvencí a s délkou záznamu 20 ms odpovídající přesně jedné periodě vstupního harmonického signálu, druhé s nižší vzorkovací frekvencí s délkou záznamu 50 ms odpovídající dvěma a půl periodám vstupního harmonického signálu.

Na obrázku 4.1 je ukázka průběhu elektrického napětí a proudu na elektrodách plazmové trysky pro průtok pracovního plynu 30 SCFH a délku záznamu 50 ms. Průběhy nejsou ideálně harmonické (obdobně je tomu i pro ostatní parametry měření) a jednotlivé peaky s velkou pravděpodobností odpovídají jednotlivým „mikrovýbojům“ zapáleným v prostoru minimální mezery mezi divergentními elektrodami. Pro ověření této hypotézy by bylo potřeba snímat daný výbojový prostor vhodnou kamerou s velmi vysokou frekvencí snímání, která ovšem nebyla k dispozici.



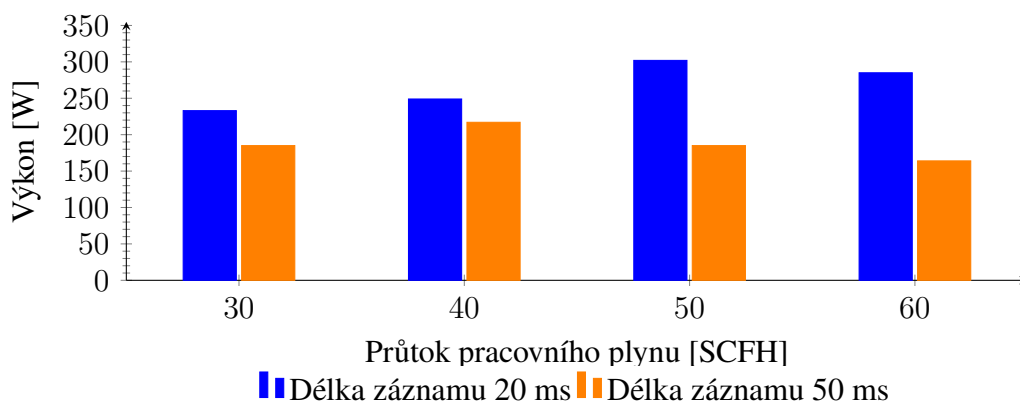
**Obrázek 4.1:** Průběh elektrického napětí a proudu na elektrodách plazmové trysky (50 ms; 30 SCFH)

Stanovené průběhy elektrického napětí a proudu velmi znesnadňují výpočet výkonu podle standardních numerických postupů, navíc získaná data jsou zakryta výrazným šumem. Aby bylo možné provést přesný výpočet výkonu, bylo potřeba aplikovat vhodné numerické filtry tak, aby nedošlo ke ztrátě důležité informace a zároveň došlo k odstranění nežádoucího šumu. Aplikován byl jednoduchý filtr za pomoci klouzavého průměru z okolních pěti, respektive patnácti hodnot. Takto zpracovaná data byla rozdělena na dílčí podsoubory odpovídající jedné periodě vstupního signálu (20 ms). Následně byl vypočítán výkon plazmové hlavice za pomoci numerické integrace lichoběžníkovou metodou.

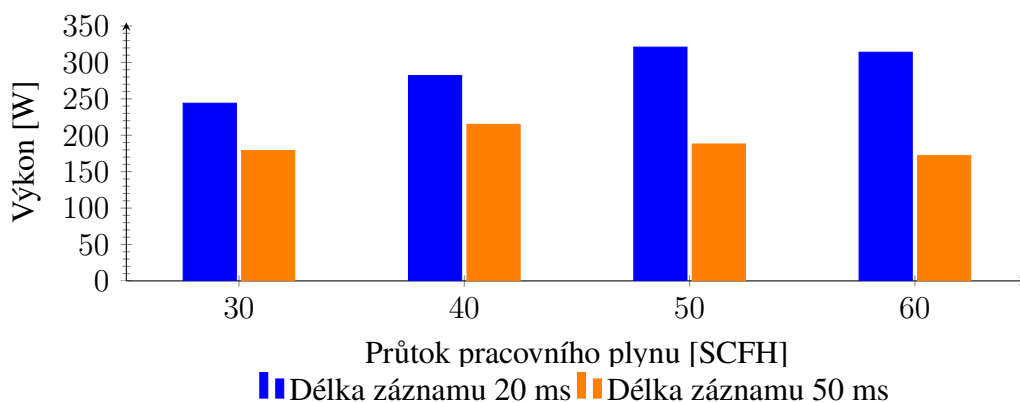
Získané hodnoty jsou souhrnně uvedeny v tabulce 4.2 a na obrázcích 4.2 a 4.3. Hodnoty výkonu plazmové trysky vypočtené z dat při délce záznamu 20 ms jsou nepatrně vyšší než hodnoty vypočtené z dat při délce záznamu 50 ms. Rozdíl může být způsoben vyšší vzorkovací frekvencí a tedy větším zatížením šumem při sběru dat. Při filtrování s vyšším počtem bodů je vypočtený výkon mírně nižší oproti výpočtům s nižším počtem bodů. Pro další úvahy se na základě analýzy energetické bilance vycházelo z dat získaných z 15 bodové interpolace. Porovnáme-li hodnoty výkonu pro jednotlivé průtoky, tak rozdíly mezi nimi nejsou příliš velké a na první pohled z nich není patrná funkční závislost. Výkon plazmové trysky je prakticky nezávislý na průtoku pracovního plynu a dosahuje hodnoty kolem 200 W. Účinnost plazmového zdroje se tedy pohybuje v rozmezí 50 % až 60 %.

Tabulka 4.2: Vypočtené výkony plazmové trysky při různých parametrech výboje

Délka záznamu [ms]	Průtok prac. plynu [SCFH]	Výkon (filtr 15 bodů) [W]	Výkon (filtr 5 bodů) [W]
20	30	233	244
	40	249	282
	50	302	321
	60	285	314
50	30	185	179
	40	218	215
	50	185	188
	60	164	172



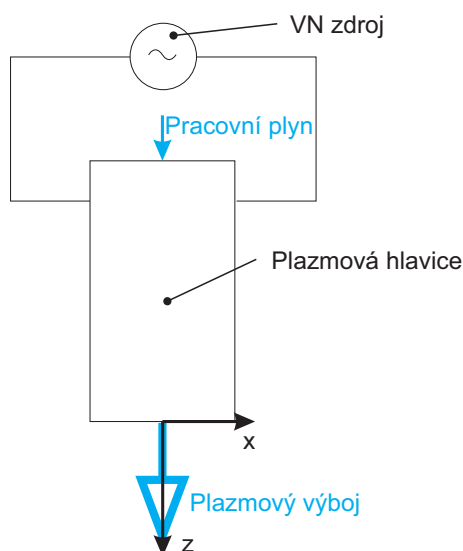
Obrázek 4.2: Výkon počítaný z dat zpracovaný 15 bodovým filtrem



Obrázek 4.3: Výkon počítaný z dat zpracovaný 5 bodovým filtrem

### 4.1.3 Distribuce teplotního pole

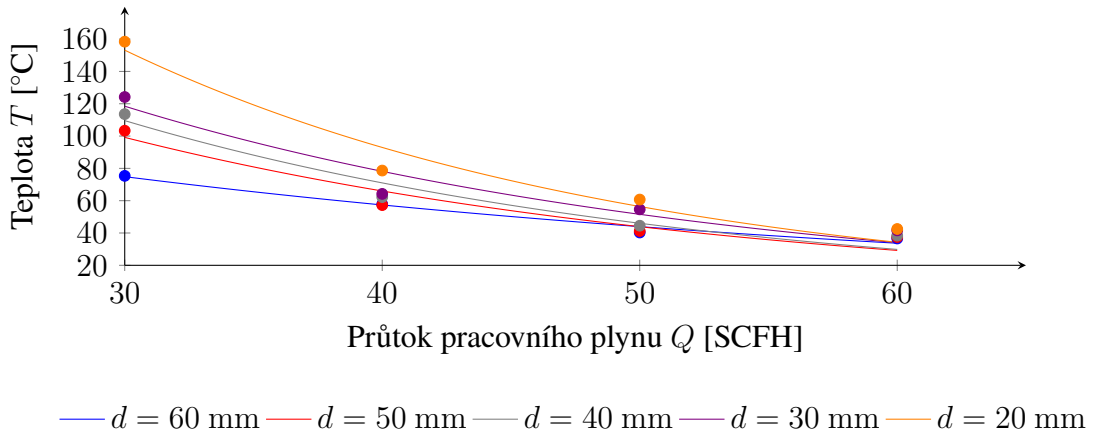
Teplota pracovního plynu hraje v procesu ošetřování biologických materiálů velice důležitou roli a zejména při vyšších teplotách může docházet k nežádoucím změnám ve složení biologického materiálu. Distribuce teplotního pole pracovního plynu byla měřena dataloggerem OM-EL-USB-TC-LCD se sondou Greisinger GTF 300. Sonda byla umístěna v podélné ose proudění pracovního plynu (osa z; viz obrázek 4.4) ve vzdálenosti 20–60 mm od spodní hrany plazmové hlavice (tj. souřadnice  $z = 0$  odpovídá okraji krytu plazmové hlavice). Teplota byla stanovena v různých vzdálenostech s krokem 10 mm. Průtok pracovního plynu byl volen v rozmezí od 30 do 60 SCFH v krocích po 10 SCFH. Každou sekundu byla zaznamenána aktuální teplota s přesností 0,5 °C. Vývoj teploty v čase byl pro každou variantu sledován po dobu 5 minut. Z naměřených dat byla stanovena teplotní závislost na průtoku pracovního plynu a na vzdálenosti od spodní hrany plazmové hlavice.



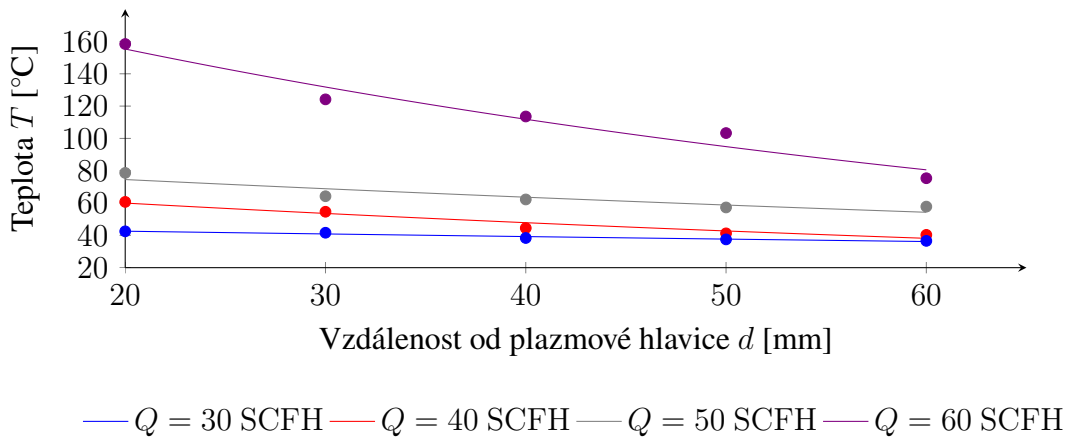
Obrázek 4.4: Umístění teplotní sondy

Typické rozložení teplot je zobrazeno na obrázku 4.5 respektive 4.6. Obrázek 4.5 znázorňuje závislost teploty vzduchu (pracovního plynu) na jeho průtoku a obrázek 4.6 ukazuje závislost teploty pracovního plynu na vzdálenosti teplotní sondy od hrany plazmové hlavice. Dle očekávání se teplota snižuje se vzrůstajícím průtokem pracovního plynu a se vzrůstající vzdáleností. Tento pokles je výrazný hlavně u nižších průtoků plynu, u vyšších průtoků je mnohem menší. Gradient teploty je větší v menší vzdálenosti od krytu trysky než ve větší vzdálenosti – teplota se vzrůstající vzdáleností od plazmové hlavice intenzivně klesá.

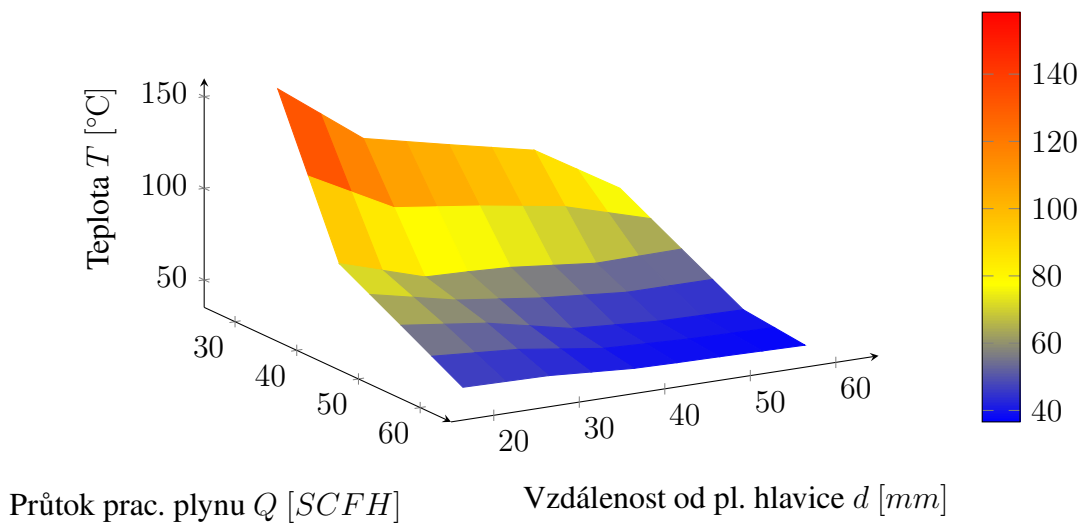
Nejvyšší teplota pracovního plynu, přibližně 160 °C, byla naměřena ve vzdálenosti 20 mm od krytu hlavice a při průtoku pracovního plynu 30 SCFH. Se zvyšující se vzdáleností i průtokem se rapidně snižovala. Pro průtoky plynu nad 60 SCFH a vzdálenosti 60 mm jsou změny v teplotním poli zanedbatelné.



**Obrázek 4.5:** Závislost teploty pracovního plynu na jeho průtoku pro různé vzdálenosti od plazmové trysky



**Obrázek 4.6:** Závislost teploty pracovního plynu na vzdálenosti od plazmové hlavice pro různé průtoky



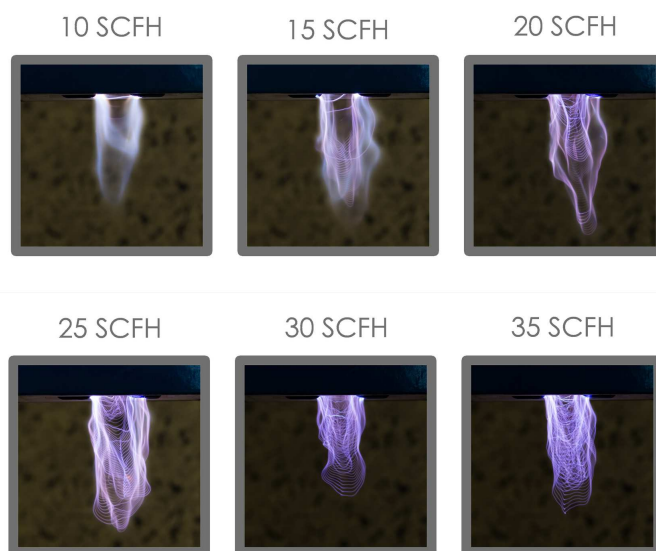
**Obrázek 4.7:** Závislost teploty výboje na vzdálenosti od plazmové hlavice d a průtoku pracovního plynu Q



#### 4.1.4 Pracovní režimy plazmového výboje

Plazmový výboj typu Gliding Arc může pracovat v různých režimech, které se od sebe odlišují vzhledem. U plazmového výboje byly zjištěny dva pracovní režimy. *Závojevý (plamínkový) režim* při nižších průtocích pracovního plynu a *filamentární režim* při vyšších průtocích pracovního plynu (viz obrázek 4.8). Přechod mezi těmito režimy není náhlý, ale postupný. Začíná při průtoku pracovního plynu 15 SCFH, kdy se ve výboji objevuje několik vláken. Se zvyšujícím se průtokem plynu, se zvyšuje také množství vláken, zatímco plamen je postupně potlačován. Plně filamentární mód se objevuje při průtoku 30 SCFH. Je třeba poznamenat, že se zvyšováním průtoku pracovního plynu se výboj zkracuje ve směru osy z, což je dáno rychlejším vývojem a zánikem výboje v důsledku vysokého průtoku pracovního plynu. Toto tvrzení je potvrzeno měřením teploty, kdy výsledky jasně odpovídají teplotním závislostem na ose z proudu pracovního plynu (viz výše).

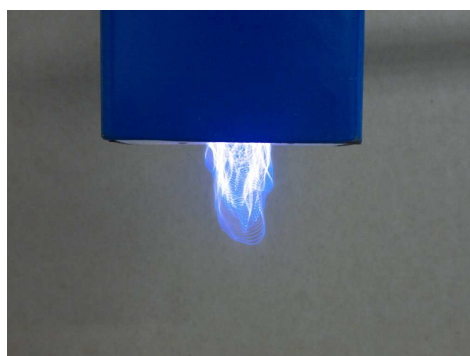
Fotografie pracovních režimů byly získány za pomoci poloprofesionálního fotoaparátu CANON EOS 70D s objektivem CANON EF-S 18–55 mm f/3,5-5,6 IS 2. Fotoaparát byl umístěn na stativu ve vzdálenosti 30 cm od výboje.



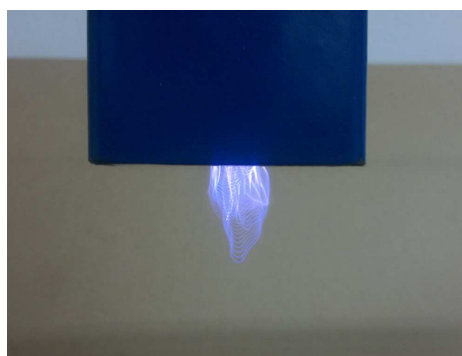
**Obrázek 4.8:** Vzhled plazmového výboje v různých pracovních režimech  
( $f/8$ ;  $1/80$  sec.; ISO-800; -1EV)

Mód výboje je také závislý na materiálu ze kterého jsou elektrody vyrobeny a na jejich tvaru. Na obrázku 4.9 jsou různé vzhledy výboje v závislosti na použitých elektrodách. Elektrody s čtvrtelipsovým tvarem generují kratší výboj, jelikož zapálení výboje probíhá hluboko v krytu plazmové hlavice. Na druhou stranu šířka výboje je v tomto případě o něco větší díky větší rozbíhavosti elektrod. Intenzita výboje je téměř nezávislá na typu použitých elektrod.

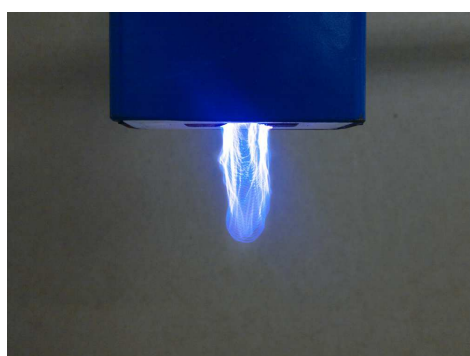
Výsledky týmů Kolev a Bogaerts (2015) a Korolev et al. (2014) ukazují, že oba pracovní režimy plazmového výboje vytvářejí do určité míry velmi podobný plazmový kanál. Podstatné rozdíly jsou pozorovány pouze v blízkosti katody. Rozdíly jsou způsobeny různými mechanismy emise elektronů. V případě závojevého režimu má výboj tendenci sledovat hranu anody. V případě filamentárního módu je výboj po dlouhou dobu spojen s místem jeho vzniku, délka plazmového kanálu se podstatně prodlužuje. Větší délka



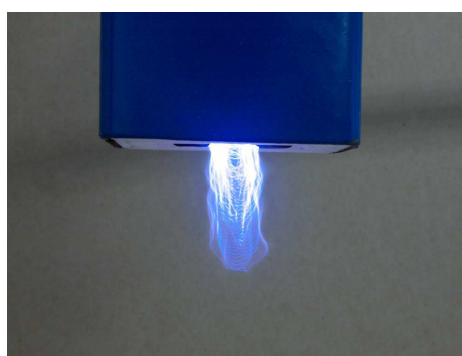
(a) Nerezové elektrody čtvrtelipsového tvaru, tloušťka 3 mm



(b) Nerezové elektrody čtvrtelipsového tvaru, tloušťka 1,5 mm



(c) Měděné elektrody obdélníkového tvaru s jedním zahnutým rohem o poloměru 4 mm, tloušťka 3 mm



(d) Nerezové elektrody obdélníkového tvaru s jedním zahnutým rohem o poloměru 4 mm, tloušťka 3 mm

**Obrázek 4.9:** Porovnání vzhledu plazmového výboje při použití elektrod různých tvarů a vyrobených z různých materiálů (f/2.8; 1/35 sec; ISO 124)

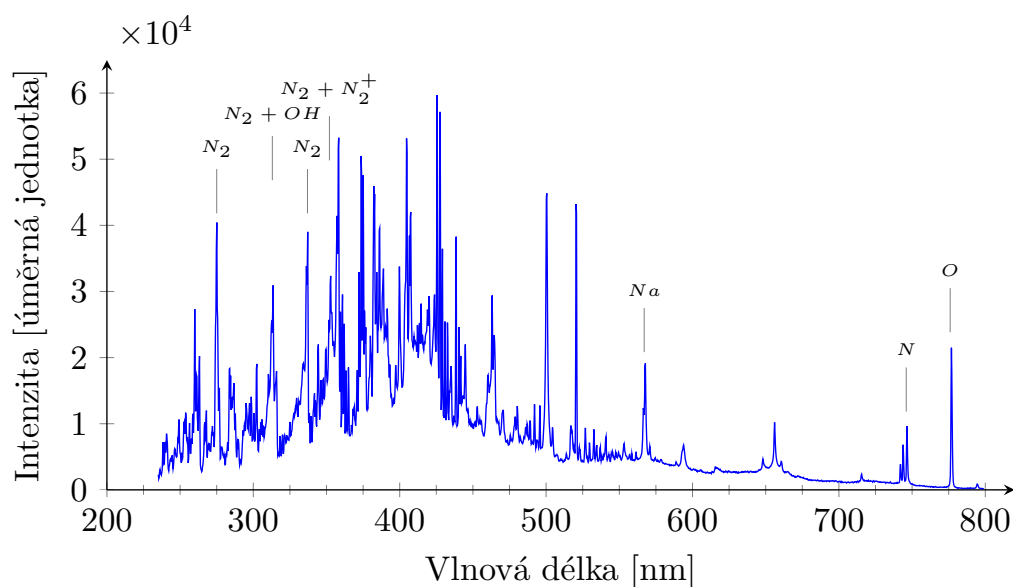
plazmového výboje znamená zvýšený objem plazmatu (Gangoli et al., 2010a,b), což znamená silnější interakci mezi plazmatem a biologickým materiálem. Vzdálenosti mezi jednotlivými výboji jsou závislé na vlastnostech povrchu katody.

Analýzy také potvrdily výsledky publikované v práci Staack et al. (2008), kdy výrazné rozdíly mezi jednotlivými pracovními režimy jsou v teplotě pracovního plynu.

### 4.1.5 Měření spektrálních charakteristik plazmového výboje typu Gliding Arc

Plazmový výboj je zdrojem řady reaktivních částic, jako je například atomární kyslík, hydroxilové radikály a různé sloučeniny dusíku (viz kapitola 1.3), které následně interagují s ošetřovaným povrchem. Pro průmyslové využití celého systému je klíčové, aby koncentrace těchto reaktivních částic byla dostatečná. Přítomnost některých těchto částic byla potvrzena analýzou spekter emitovaného záření v široké oblasti vlnových délek.

K měření spektrálních charakteristik byl využit spektroskop AvaSpec-ULS2048-USB2 vyrobený firmou Avantes BV. K zaznamenání dat byl použit dodávaný program AvaSoft ve verzi 8. Čidlo spektroskopu bylo umístěno ve vzdálenosti 10 cm od hrany plazmové hlavice a nacházelo se na svislé ose z (viz obrázek 4.4) průtoku pracovního plynu.



**Obrázek 4.10:** Spektrální charakteristika výboje Gliding Arc

Na uvedeném spektru jsou viditelné spektrální čáry potvrzující přítomnost požadovaných částic. Velmi výrazné jsou spektrální čáry dvouatomového dusíku ( $N_2$ ) v oblasti UV spektra a spektrální čára atomárního kyslíku v oblasti viditelného spektra. Spektrální analýza tedy potvrzuje, že generovaný výboj obsahuje dostatečné množství požadovaných reaktivních částic, které mohou interagovat s biologickým materiálem a působit tak na plísňe a mykotoxiny.

## 4.2 Vliv plazmatu na vybrané výživové parametry

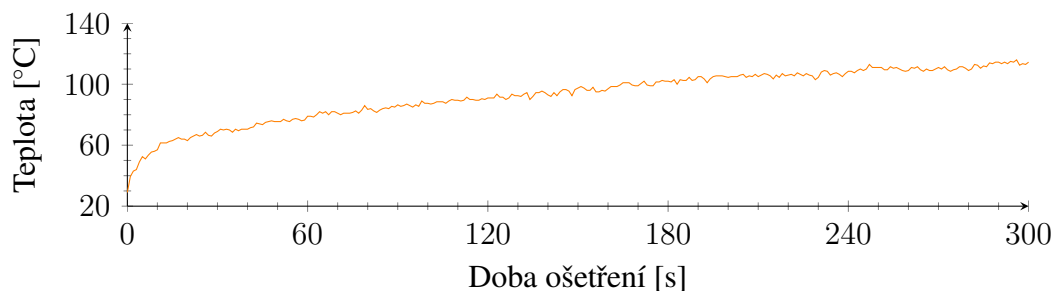
Cílem následujícího experimentu bylo ověřit, zda v důsledku působení plazmového výboje dochází ke změně ve výživových parametrech vybraných zemědělských plodin. Experiment vychází z práce Kříž et al. (2014), který testoval vliv plazmatu na plodinu *Triticale*. Vzhledem k tomu, že k této problematice již byla dostupná některá data a s ohledem na omezené finanční možnosti, byl test proveden pouze na jednom vzorku. Parametry ošetření jsou uvedeny v Tabulce 4.3. Výsledky získané pro ošetřený a neošetřený vzorek jsou shrnuty v následujících grafech.

**Tabulka 4.3:** Parametry ošetření vzorku

Parametr	Hodnota
Vzdálenost od plazmové hlavice	60 mm
Doba ošetření	300 s
Průtok pracovního plynu	30 SCFH
Otáčky míchacího zařízení	1 s <sup>-1</sup>
Hmotnost vzorku	100 g

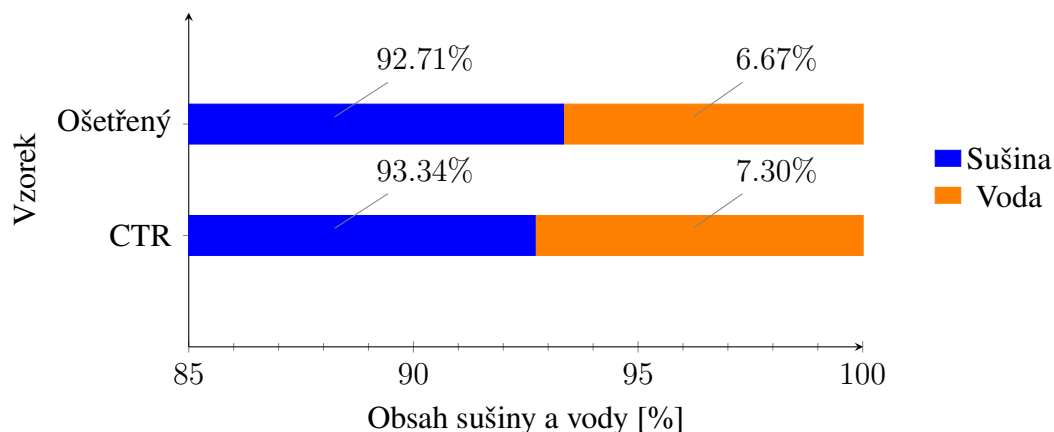
Hmotnost vzorku byla zvolena s ohledem na potřebné množství pro analýzy výživových parametrů a k navážení byla použita stolní váha od firmy Kern EMS 6K0.1 s rozsahem měření do 6 kg s přesností na 0,1 g. Vzdálenost a čas ošetření plazmatem byly vybrány jako extrém – minimální vzdálenost v míchacím zařízení, které lze se současnou aparaturou dosáhnout, a maximální čas, při kterém je ještě ošetřování plazmatem ekonomicky výhodné. Rychlost otáčení míchacího zařízení byla nastavena na 1 s<sup>-1</sup>. Hodnota průtoku pracovního plynu 30 SCFH byla zvolena s ohledem na skutečnost, že při tomto průtoku je teplota pracovního plynu nejvyšší a lze tak očekávat největší vliv na výživové parametry krmiva.

Po ošetření byl vzorek znovu zvážen, jelikož v průběhu ošetření je dosahováno vyšších teplot pracovního plynu (viz obrázek 4.11) a je tudíž možno očekávat změnu hmotnosti vzorku v důsledku vysoušení semen. U ošetřených vzorků byla stanovena hmotnost 98,6 g, tj. úbytek hmotnosti činil 1,4 g. Již z této hodnoty lze dělat závěry o výsledcích hodnoty sušiny v krmivech. Obsah sušiny by měl s časem ošetření plazmatem vzrůstat.



**Obrázek 4.11:** Teplota uvnitř míchacího zařízení v závislosti na době ošetření

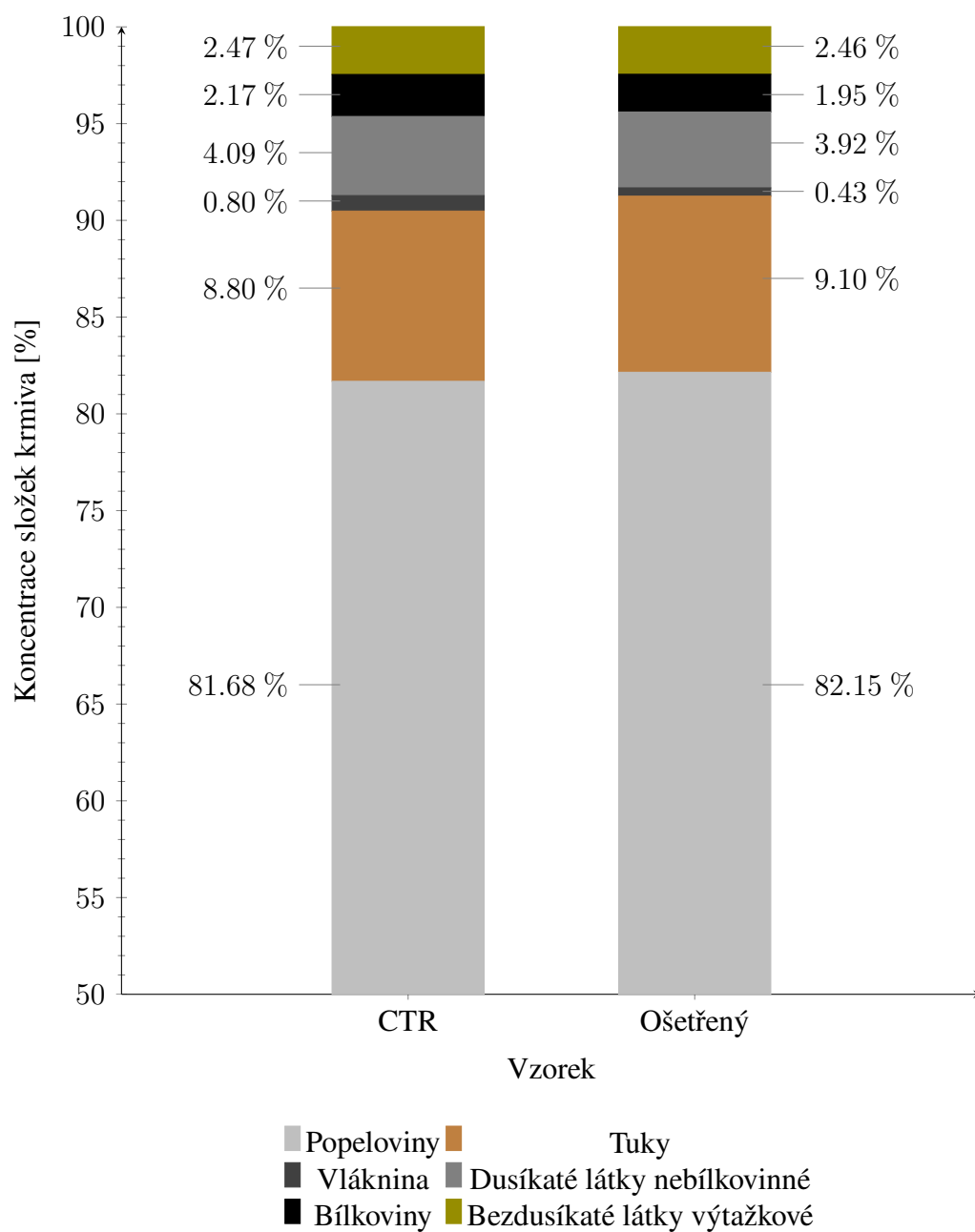
Výsledky analýz obsahu sušiny, respektive vody, ve vzorcích potvrdily domněnku, že obsah sušiny narůstá s dobou ošetření plazmatem. Kontrolní vzorek, který nebyl vystaven plazmatu, obsahoval o 0,63 procentního bodu vody více než ošetřený vzorek (viz obrázek 4.12).



**Obrázek 4.12:** Poměr obsahu sušiny a vody ve vzorcích

Obsah vody ve vzorku byl prakticky jedinou veličinou, která se v důsledku ošetření změnila. Analýza ostatních vybraných výživových složek krmiva neprokázala, že by ošetření plazmovým výbojem měnilo výživové parametry vzorku. Z tohoto důvodu nedošlo ke změně ani v brutto energii vzorku. V případě kontrolního vzorku brutto energie vyšla  $16,9 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$  a u ošetřeného vzorku  $17,0 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Drobné odchylky mezi vzorky mohou být způsobeny rozdíly mezi jednotlivými semeny použitými při vyhodnocování. Experimenty potvrdily výsledky publikované v práci Kříž et al. (2014).

Jedinou otázkou může být, jak ovlivnila teplota výboje tuky v krmivu. Zda došlo k rozkladu tuků nebo jejich žluknutí. Analýzy v tomto směru v rámci předkládané práce nebyly provedeny.



Obrázek 4.13: Koncentrace vybraných složek krmiva ve vzorcích

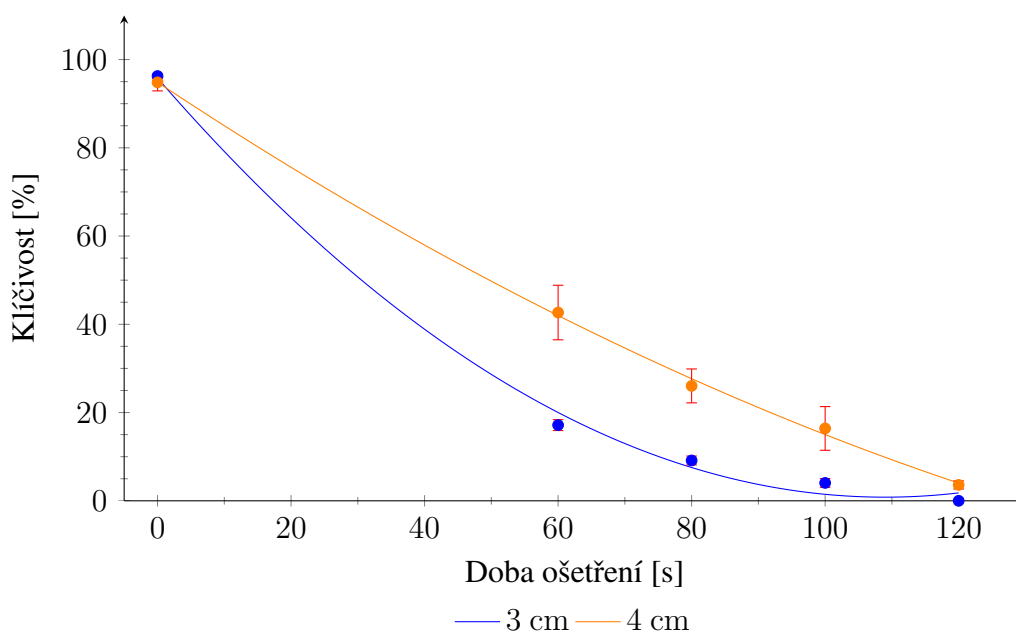
### 4.3 Vliv plazmatu na modelovou houbu *T. virens*

V této části disertační práce jsou prezentovány výsledky, jejichž cílem bylo ověřit vliv plazmového výboje na modelovou houbu *Trichoderma virens*.

Nejprve byl studován vliv plazmatu na klíčivost spor modelové houby v laboratorních podmínkách, přičemž vzorek houby byl umístěn na sterilním podložním mikroskopickém sklíčku. Plazmový výboj měl tak optimální podmínky pro interakci se vzorkem houby. Následně byly realizovány experimenty, jejichž cílem bylo ověřit hypotézu, že plazma snižuje klíčivost modelové houby více než jeho vybrané složky, tj. UV záření a vyšší teplota pracovního plynu. Třetí skupina experimentů byla zaměřena na prokázání vlivu plazmového výboje na houby přítomné na laboratorně infikovaných semenech.

#### 4.3.1 Vliv vzdálenosti plazmové hlavičky od myceliálního disku

K experimentům byla použita plně vysporulovaná sedmidenní kultura *T. virens*. Za pomoci korkovrtu byly z kultury vyříznuty terčíky o průměru 10 mm, které byly následně umístěny na sterilní podložní sklíčko. Myceliální disky byly vystaveny plazmovému výboji o průtoku 30 SCFH. Vzdálenost povrchu disku od hrany plazmatické hlavičky byla nastavena na 3, respektive 4 cm. Doba ošetření byla 60, 80, 100 a 120 s. Pro každou jednotlivou variantu bylo provedeno 9 opakování. Po ošetření byl každý z terčíků z podložního sklíčka přenesen do sterilní zkumavky s 3 ml sterilní destilované vody. Spory byly z terčíků vymyty a ze vzniklé suspenze byl připraven test klíčivosti. Pomocí inokulační kličky bylo nanášeno 10 kapek suspenze na povrch 2% vodního agaru, který byl v tenké vrstvě nalit na povrch sterilního podložního sklíčka. Po zaschnutí kapek byl vzorek inkubován v termostatu při  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Pro každý vzorek bylo po 24 hodinách hodnoceno vždy 100 spor, za pomoci světelného mikroskopu Olympus, a stanovena klíčivost spor.



Obrázek 4.14: Klíčivost spor houby *T. virens* po 24 hodinách po vystavení plazmatu

**Tabulka 4.4:** Klíčivost spor houby *T. vires* po 24 hodinách po vystavení plazmatu a maximální teplota pracovního plynu

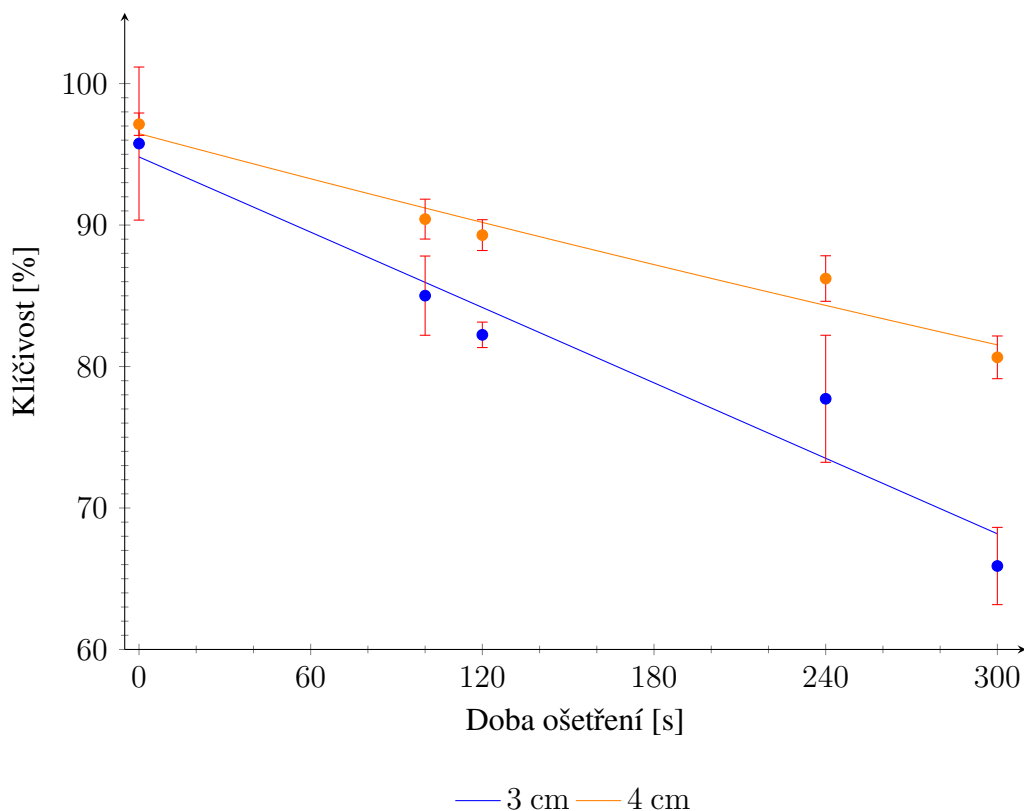
Vzdálenost od plazmové hlavice 3 cm		
Doba ošetření	Klíčivost	Max. teplota
[s]	[%]	[°C]
<b>0</b>	96,26 ± 0,40	23,0
<b>60</b>	17,16 ± 1,24	140,5
<b>80</b>	9,14 ± 1,01	147,7
<b>100</b>	4,05 ± 0,99	183,5
<b>120</b>	0,00 ± 0,00	239,0

Vzdálenost od plazmové hlavice 4 cm		
Doba ošetření	Klíčivost	Max. teplota
[s]	[%]	[°C]
<b>0</b>	94,83 ± 1,93	23,0
<b>60</b>	42,67 ± 6,18	133,2
<b>80</b>	26,04 ± 3,84	131,1
<b>100</b>	16,40 ± 4,95	126,5
<b>120</b>	3,60 ± 0,92	141,9



### 4.3.2 Vliv UV záření na klíčivost spor houby *T. virens*

Plazmový výboj je zpravidla zdrojem intenzivního UV záření, které má negativní vliv na mikroorganismy. Proto byl proveden test této části optického spektra na sedmidenní plně vysporulovanou kulturu. Za pomoci korkovrtu byly z kultury vyříznuty terčíky o průměru 10 mm, které byly následně umístěny na sterilní podložní sklíčko. Myceliální disky byly překryty křemičitým sklem, které eliminuje vzrůst teploty, nepropouští reaktivní částice, ale propouští UV záření. Následně byly disky vystaveny plazmovému výboji o průtoku 30 SCFH. Vzdálenost disku od hrany plazmatické hlavice byla nastavena na 3, respektive 4 cm. Doba ošetření byla volena 100, 120, 240 a 300 s. Pro každou jednotlivou variantu bylo provedeno 9 opakování. Po ošetření byl každý z terčků z podložního sklíčka přenesen do sterilní zkumavky s 3 ml sterilní destilované vody. Spory byly z terčků vymyty a ze vzniklé suspenze byl připraven test klíčivosti. Pomocí inokulační kličky bylo naneseno 10 kapek suspenze na povrch 2% vodního agaru, který byl v tenké vrstvě nalit na povrch sterilního podložního sklíčka. Po zaschnutí kapek byl vzorek inkubován v termostatu při  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Pro každý vzorek bylo po 24 hodinách hodnoceno vždy 100 spor, za pomoci světelného mikroskopu Olympus, a stanovena klíčivost.



**Obrázek 4.15:** Klíčivost spor houby *T. virens* po vystavení UV záření

**Tabulka 4.5:** Klíčivost spor houby *T. vires* po vystavení UV záření a maximální teplota pracovního plynu

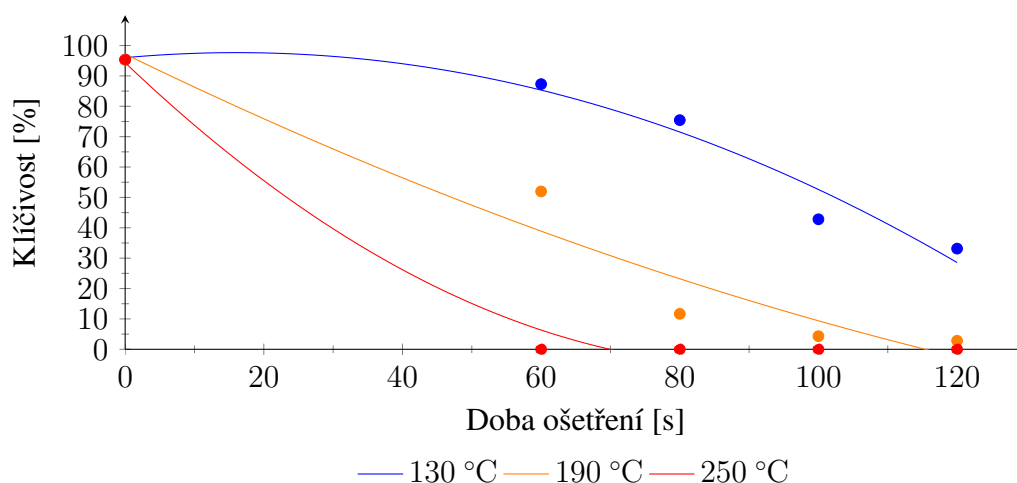
Vzdálenost od plazmové hlavice 3 cm		
Doba ošetření	Klíčivost	Max. teplota
[s]	[%]	[°C]
<b>0</b>	89,76 ± 5,41	23,0
<b>100</b>	85,01 ± 2,80	51,7
<b>120</b>	82,24 ± 0,90	65,7
<b>240</b>	77,72 ± 4,49	61,5
<b>300</b>	65,90 ± 2,73	66,0

Vzdálenost od plazmové hlavice 4 cm		
Doba ošetření	Klíčivost	Max. teplota
[s]	[%]	[°C]
<b>0</b>	97,13 ± 0,79	23,0
<b>100</b>	90,42 ± 1,41	36,8
<b>120</b>	89,29 ± 1,09	35,7
<b>240</b>	86,22 ± 1,61	42,2
<b>300</b>	80,65 ± 1,51	37,7

### 4.3.3 Vliv teplého vzduchu na klíčivost spor houby *T. virens*

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv teploty jako jedné z parametrů výboje na sedmidenní plně vysporulovanou kulturu. Za pomoci korkovrtu byly z kultury vyříznuty terčíky o průměru 10 mm, které byly následně umístěny na sterilní podložní sklíčko. Myceliální disky byly vystaveny horkému vzduchu v horkovzdušné troubě. Teploty vzduchu byly zvoleny s ohledem na teploty vyskytující se v plazmatickém výboji a to 130, 190 a 250 °C. Doba působení horkého vzduchu byla nastavována od 60 do 120 s v krocích po 20 s. Pro každou jednotlivou variantu bylo provedeno 9 opakování. Po ošetření byl každý z terčíků z podložního sklíčka přenesen do sterilní zkumavky s 3 ml sterilní destilované vody. Spory byly z terčíků vymyty a ze vzniklé suspenze byl připraven test klíčivosti. Pomocí inokulační kličky bylo nanášeno 10 kapek suspenze na povrch 2% vodního agaru, který byl v tenké vrstvě nalit na povrch sterilního podložního sklíčka. Po zaschnutí kapek byl vzorek inkubován v termostatu při  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Pro každý vzorek bylo po 24 hodinách hodnoceno vždy 100 spor, za pomoci světelného mikroskopu Olympus, a stanovena klíčivost spor.



Obrázek 4.16: Klíčivost spor houby *T. virens* po vystavení teplému vzduchu

Tabulka 4.6: Klíčivost spor houby *T. virens* po vystavení horkému vzduchu [%]

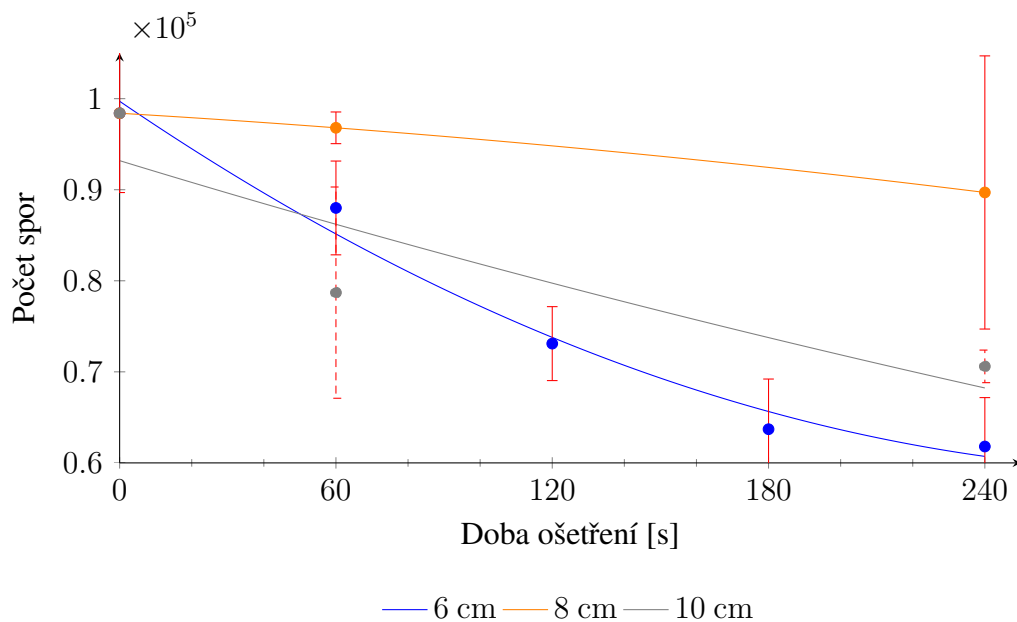
Doba ošetření [s]	Teplota teplému vzduchu		
	130 °C	190 °C	250 °C
0	95,35 ± 0,00	95,35 ± 0,00	95,35 ± 0,00
60	87,30 ± 0,51	51,97 ± 2,28	0,00 ± 0,00
80	75,44 ± 6,74	11,67 ± 0,25	0,00 ± 0,00
100	42,80 ± 0,40	4,31 ± 4,31	0,00 ± 0,00
120	33,14 ± 0,32	2,81 ± 0,44	0,00 ± 0,00

#### 4.3.4 Vliv plazmového výboje na houby přítomné na povrchu laboratorně infikovaných semen

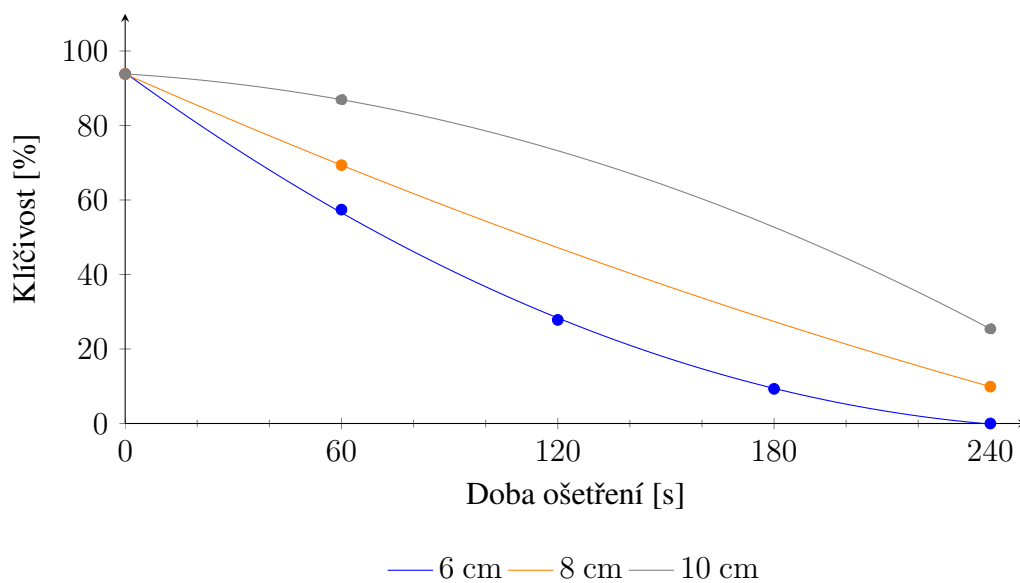
V předchozích experimentech byl prokázán vliv plazmatu na houbu *Trichoderma virens* umístěnou na myceliárním disku. Pro přiblížení se co nejvíce reálným podmínkám, proběhla umělá infekce semen pšenice jarní odrůdy Tercie za účelem ověření degradace plísni i na živém biologickém materiálu. Infekce byla provedena za pomoci suspenze houby *T. virens* a nosiče karboxymethylcelulózy o obsahu  $1 \times 10^6$  spor v 1 ml. K ošetření za pomoci nízkoteplotního plazmatu bylo použito 100 g takto ošetřených obilek, které byly umístěny do míchacího zařízení zajišťující homogenitu ošetření. Rychlost otáčení lopatek míchacího zařízení byla nastavena na  $1 \text{ s}^{-1}$ . Vzdálenost obilek od hrany plazmové hlavice byla 6, 8 a 10 cm. Semena byla vystavena plazmatu po dobu od 1 do 4 min v krocích po 1 min. Pro každou variantu kombinace vzdálenosti od plazmové hlavice a doby ošetření byla provedena 3 opakování. Po ošetření bylo 40 náhodně vybraných obilek vymyto v 3 ml TWEENu a hodnotil se počet a životaschopnost spor houby.

**Tabulka 4.7:** Klíčivost a počet spor houby *T. virens* na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu

Vzdálenost od plazmové hlavice [cm]	Doba ošetření [s]	Klíčivost [%]	Počet spor $\times 10^4$
<b>CTR</b>	0	93,83 $\pm$ 0,00	9,84 $\pm$ 8,71
<b>6</b>	60	57,41 $\pm$ 1,46	8,80 $\pm$ 1,15
	120	27,81 $\pm$ 1,08	7,31 $\pm$ 0,4
	180	9,30 $\pm$ 1,04	6,37 $\pm$ 0,55
	240	0,00 $\pm$ 0,00	6,18 $\pm$ 0,93
<b>8</b>	60	69,35 $\pm$ 1,30	9,68 $\pm$ 0,17
	240	9,90 $\pm$ 1,42	8,97 $\pm$ 1,50
<b>10</b>	60	86,93 $\pm$ 1,16	7,87 $\pm$ 1,16
	240	25,40 $\pm$ 1,22	7,06 $\pm$ 0,18



Obrázek 4.17: Počet spor houby *T. virens* na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu



Obrázek 4.18: Klíčivost spor houby *T. virens* na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu

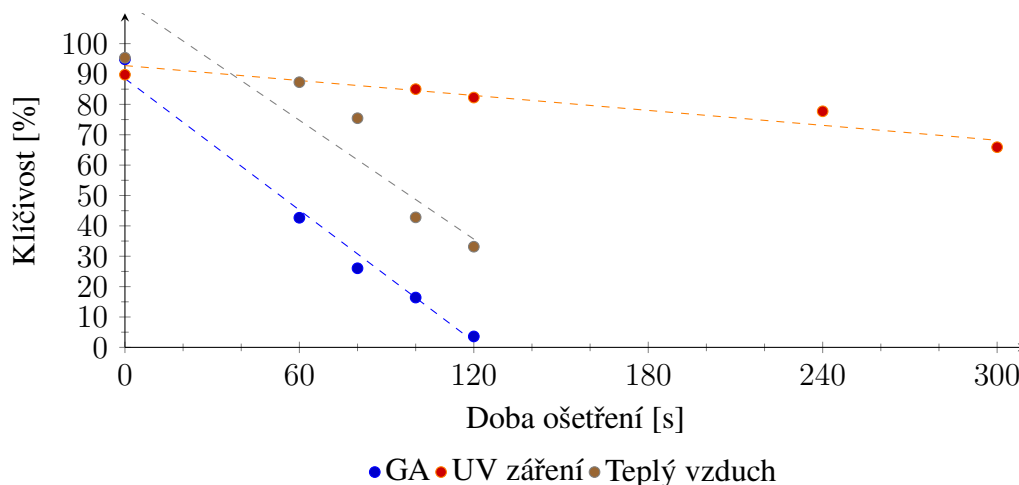
### 4.3.5 Diskuse k výsledkům kapitoly 4.3

Ačkoliv byly experimenty realizovány v rámci vědecko-výzkumných projektů podpořených agenturami TAČR a GAJU, bylo potřeba respektovat velice omezený finanční rozpočet, který byl na pokrytí nákladů k dispozici. Chemické analýzy a biologické experimenty jsou přitom poměrně nákladnou záležitostí. Z tohoto důvodu bylo možné provést experimenty jen v omezeném počtu opakování, který neumožňoval aplikovat standardní statistické metody, které jsou ve vědě běžně využívány k testování statistických hypotéz (platí jak pro výsledky této kapitoly, tak pro výsledky prezentované v kapitole 4.4). Veškerá tvrzení o pravdivostní hodnotě statistických hypotéz formulovaných v kapitole „Cíl práce“ jsou proto založena na trendu funkční závislosti sledovaných veličin, jako je například klíčivost spor hub v závislosti na době ošetření nebo koncentrace mykotoxinů vystavených působení plazmovému výboji v závislosti na době ošetření a při jejich další interpretaci je potřeba mít tuto skutečnost na paměti.

Finanční omezení a bezpečnostní předpisy ovlivnily také volbu modelové houby, která byla v experimentech použita. Řešitelský tým si je vědom skutečnosti, že existují vhodnější druhy hub, které by mohly být v experimentech použity a které jsou v přirozeném prostředí producenty nebezpečných mykotoxinů se závažnými dopady na zdraví lidí a zvířat.

Experimentálně se podařilo prokázat (viz obrázky 4.14, 4.17 a 4.18), že interakce plazmatu s myceliálním diskem vede ke snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* – a to jak v experimentech provedených s houbami umístěnými na mikroskopických sklíčkách, tak v experimentech, kdy byly houbové mikroorganismy přítomny na obilkách semen modelových hospodářských plodin. Hypotézy H1 a H3 jsou z tohoto důvodu považovány za pravdivé.

Prokázán byl také vliv jednotlivých složek plazmatu – konkrétně vliv UV záření (viz obrázek 4.15) a vliv teplého vzduchu (viz obrázek 4.16). Ošetření vzorku plazmovým výbojem přitom vykazuje nejvyšší účinnost v porovnání s výsledky získanými pro dílčí složky – UV záření a teplý vzduch. To je dobře patrné zejména z obrázku 4.19, který shrnuje získané výsledky. Ačkoliv vliv dalších mechanismů působení plazmatu na vzorek houby nebyl přímo studován, je možno předpokládat, že snížení klíčivosti spor hub je ovlivněno také přítomností chemicky reaktivních částic generovaných v plazmatu.



Obrázek 4.19: Porovnání vlivu jednotlivých složek plazmatu na klíčivost spor houby *T. virens*

Tento výsledek je v souladu s pracemi jiných autorů prezentovanými v odborném tisku v nedávné době. Z řady prací je možno uvést například práci (Go et al., 1998), ve které byl prokázán vliv nízkoteplotního plazmového výboje za atmosférického tlaku na houby rodu *Fusarium oxysporum*. V práci Dasan et al. (2016), Sen et al. (2019) nebo Mošovská et al. (2019) byl prokázán vliv plazmatu na houby rodu *A. flavus* a *A. parasiticus*, přičemž autoři pozorovali také změny povrchu spor a jejich morfologie. Nikmaram et al. (2018) experimentálně potvrdil výrazně snížení klíčivosti spor houby *A. fumigatus*. Výrazné funkční závislosti prezentované na obrázcích 4.15 a 4.16 nás vedou k závěru, že hypotéza H2 je také pravdivá.

Na základě výsledků kapitoly 4.3 je pak možno konstatovat, že plazmový výboj typu Gliding Arc je vhodným prostředkem pro eliminaci plísni rodu *Trichoderma virens*, samozřejmě při zachování vhodných procesních parametrů.

## 4.4 Vliv plazmatu na mykotoxiny

Experimenty realizované v rámci této etapy si kladou za cíl prokázat vliv plazmatu na mykotoxin DON a jeho konjugát D3G. Jelikož je koncentrace mykotoxinů silně ovlivněna procesy uvnitř semen a mění se v čase (Maul et al., 2012; Pazderů et al., 2016), byly v prvním kroku provedeny experimenty s čistým standardem mykotoxinů, který byl nanesen na Petriho miskách. V druhém kroku se přešlo na experimenty s reálným biologickým materiálem, který byl přirozeně infikován mykotoxiny. Vzhledem k rozličným toxickým účinkům mykotoxinů, představují značné riziko pro zdraví a je nutné k provádění analýz a zjišťování koncentrací mykotoxinů splňovat zákonná kritéria. Pracoviště Jihočeské univerzity nedisponuje nutnými zákonnými povoleními, proto byla navázána spolupráce s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a. s. v Brně (VÚPS). Výzkumný ústav se již dlouhodobě zabývá mykotoxinovou zátěží v semenech, krmivech a potravinách. Ve spolupráci s tímto pracovištěm byly provedeny i všechny předkládané experimenty se zaměřením na mykotoxiny. Biologický materiál pro experimenty byl poskytnut VÚPS, a.s..

Pro určení a kvantifikaci DON a DON-3-Glc bylo využito přístroje HPLC společnosti Finnigan Surveyor s iontovou pastí LCQ Advantage společnosti Thermo-Fisher (USA). Chromatografické separace bylo dosaženo v koloně  $4\mu$  Synergi Hydro RP 80A HPLC ( $3,0 \times 150$  mm, velikost částic  $4,0$  mm) vybavené ochranou patronou SecurityGuard<sup>TM</sup> C18 ( $4,0 \times 3,0$  mm,  $4,0$  mm) metodou gradientové eluce – složení mobilní fáze se mění s časem (zvyšuje se její eluční síla). Jako mobilní fáze byl použit methanol s 10 mM octanu amonného v poměru 20/80 (v/v), který se nechal prokapávat kolonou rychlostí  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Mykotoxiny byly analyzovány ve full-scan módu.

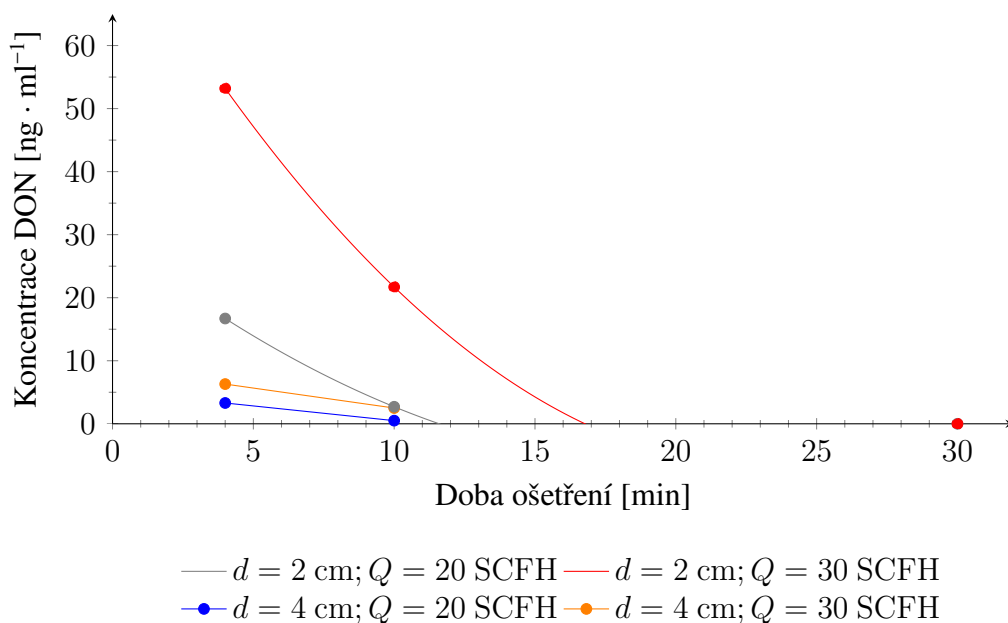
### 4.4.1 Vliv plazmového výboje na koncentraci DON a D3G na laboratorních substrátech

Jelikož mykotoxiny jsou vysoce nebezpečné a zdraví škodlivé chemické látky, byly prvotní experimenty provedeny na zředěných mykotoxinech v acetonitrilu (koncentrace  $1\,000 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Jako modelový mykotoxin byl zvolen DON a jeho konjugát D3G, jež se v hospodářských plodinách v České republice hojně vyskytují. Zředěný DON (D3G) byl následně nanesen na Petriho misky a acetonitril se nechal 10 min při běžné teplotě odpařit. Vzdálenost umístění Petriho misky se vzorkem od hrany plazmové hlavice byla zvolena 2 cm, respektive 4 cm. Průtok pracovního plynu byl nastaven na 20 SCFH, respektive 30 SCFH. Pro ošetření byly zvoleny časy expozice plazmatu 4, 10 a 30 min. Expozice vzorku po dobu 30 minut plazmatu nebyla prováděna pro vzdálenost 2 cm z důvodu vysoké teploty výboje, sklo Petriho misky by mohlo prasknout a takový výsledek nemá z pohledu dalšího využití plazmového výboje v průmyslové praxi žádné opodstatnění. Po vystavení plazmatu byly mykotoxiny rozpuštěny v 1 ml 50% MeOH a následně analyzovány na LC/MS. Pro každou variantu byla provedena dvě opakování.



Tabulka 4.8: Koncentrace a úbytek DON na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

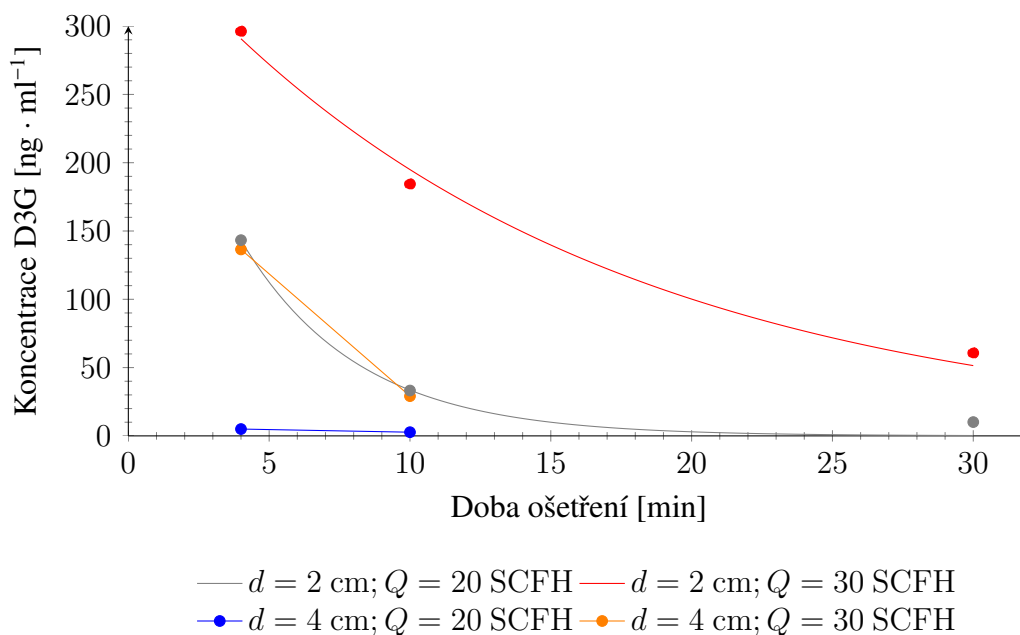
#	Vzdálenost od hrany pl. hlavice	Průtok prac. plynu	Doba ošetření	DON	Úbytek
	[cm]	[SCFH]	[min]	[ng · ml <sup>-1</sup> ]	[%]
CTR	–	–	–	1 000,0	0,00
01	2	20	4	3,3	99,67
02		30		6,3	99,37
03		20	10	0,5	99,95
04		30		2,5	99,75
05	4	20	4	16,7	98,33
06		30		53,2	94,68
07		20	10	2,7	99,73
08		30		21,7	97,83
09		20	30	0,0	100,00
10		30		0,0	100,00



Obrázek 4.20: Koncentrace čistého DON na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

**Tabulka 4.9:** Koncentrace a úbytek D3G na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

#	Vzdálenost od hrany pl. hlavice	Průtok prac. plynu	Doba ošetření	D3G	Úbytek
	[cm]	[SCFH]	[min]	[ng · ml <sup>-1</sup> ]	[%]
CTR	–	–	–	1 000,0	0,00
01	2	20	4	5,0	99,50
02		30		136,5	86,35
03		20	10	2,7	99,73
04		30		29,1	97,90
05	4	20	4	143,3	85,67
06		30		296,2	70,38
07		20	10	33,2	96,68
08		30		184,4	81,56
09		20	30	10,1	98,99
10		30		60,7	93,93



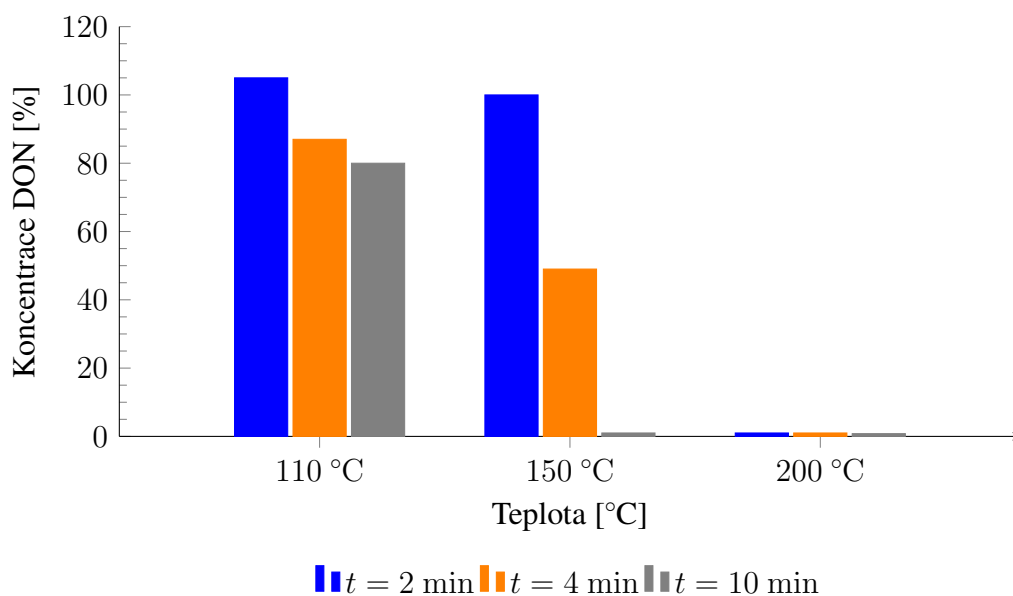
**Obrázek 4.21:** Koncentrace čistého D3G na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

#### 4.4.2 Tepelná stabilita mykotoxinu DON

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv teploty jako jedné z parametrů plazmového výboje na degradaci standardu mykotoxinu DON. Vzorky DON naředěného v acetonitrilu na koncentraci  $1\,000\text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  byly naneseny na Petriho misky. Acetonitril se nechal při běžné laboratorní teplotě odpařit. Jednotlivé vzorky byly vloženy do horkovzdušné trouby předehřáté na teplotu  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kde byly ponechány po dobu 2, 4 a 10 min. Po ošetření byly vzorky zpětně rozpuštěny v roztoku 1 ml 50% MeOH a následně zanalyzovány na LC/MS.

**Tabulka 4.10:** Tepelná stabilita DON o původní koncentraci  $1\,000\text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$

Mykotoxin	Doba ošetření	Teplota		
		110 °C	150 °C	200 °C
DON [ $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	CTR	1 000,0	1 000,0	1 000,0
	2 min	1 052,5	1 003,1	10,1
	4 min	874,1	486,3	9,5
	10 min	796,4	14,5	7,6



**Obrázek 4.22:** Tepelná stabilita DON o původní koncentraci  $1\,000\text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$

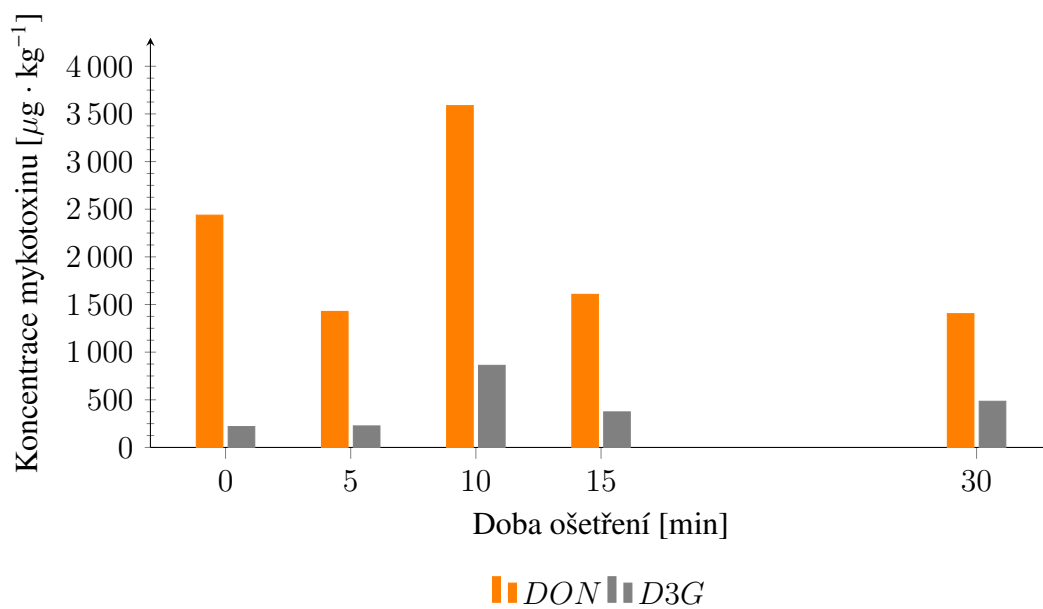
### 4.4.3 Vliv plazmového výboje na obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici jarní

Po experimentu na standardu mykotoxinu DON, byly provedeny experimenty na uměle infikovaných obilninách. K experimentům byly vybrány dvě zemědělské plodiny, a to: a) pšenice jarní a za b) ječmen jarní. Hmotnost každého vzorku byla 150 g. Z výsledků plynoucích z diagnostiky plazmové aparatury byla pro zachování kvality sladu zvolena pro proces ošetření vzdálenost semen od hrany plazmové hlavice 10 cm. Pracovním plynem byl opět vzduch o průtoku 30 SCFH. Vzorky byly v plazmatu ponechány 5, 10, 15 a 30 min. Pro každou variantu bylo provedeno 6 opakování.

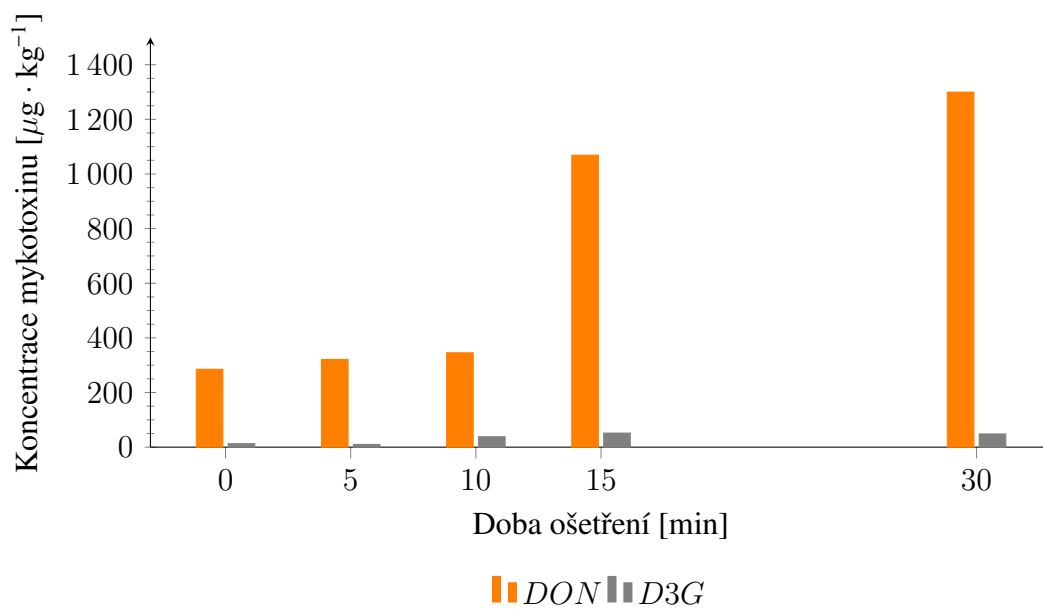
Při vyhodnocování byla sledována koncentrace DON, D3G a obsah vody v jednotlivých vzorcích.

**Tabulka 4.11:** Koncentrace mykotoxinů v ječmeni a pšenici po vystavení plazmatu

Doba ošetření [min]		CTR	5	10	15	30
Ječmen	DON [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	2 437,6	1 427,2	3 587,0	1 606,5	1 403,9
	D3G [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	218,7	225,9	861,5	373,1	484,5
Pšenice	DON [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	285,1	321,0	345,4	1 068,9	1 299,7
	D3G [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	12,8	9,9	37,9	51,4	48,3



(a) Ječmen



(b) Pšenice

**Obrázek 4.23:** Obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici

#### 4.4.4 Vliv plazmového výboje na obsah mykotoxinů ve sladu

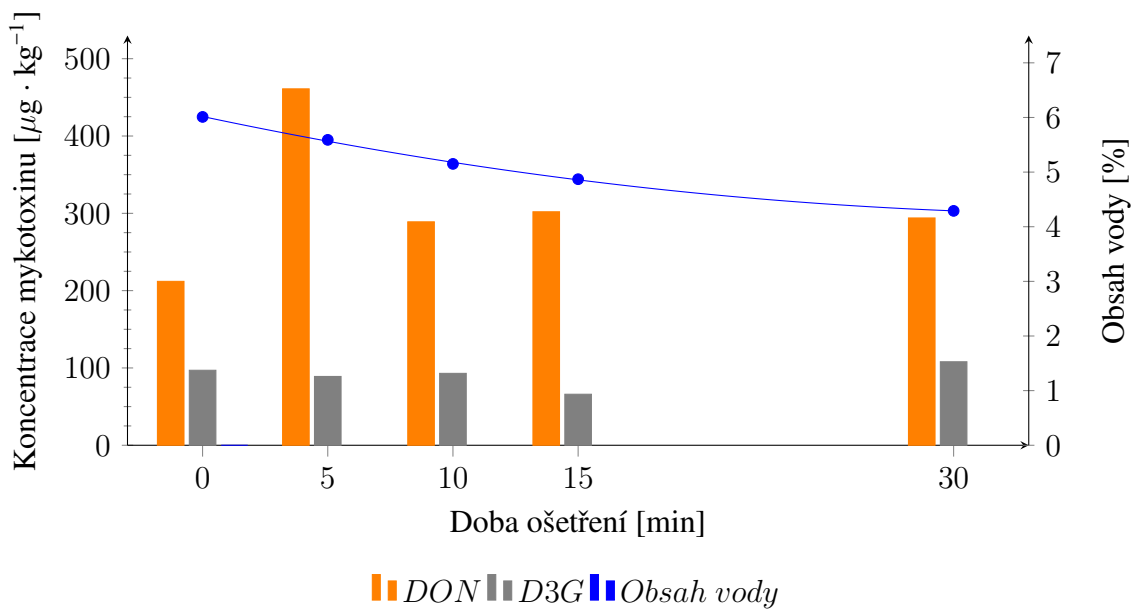
##### Časová řada

Po provedení prvních pokusů na uměle infikovaném ječmeni a pšenici byly k ošetření vybrány dva druhy přirozeně mykotoxiny kontaminovaného sladu, a to: a) slad pšeničný a za b) slad ječný. Hmotnost každého vzorku byla 180 g. Vzdálenost sladu od hrany plazmové hlavice byla nastavena na 10 cm. Jako pracovní plyn byl zvolen vzduch a jeho průtok plazmovou hlavicí byl nastaven na 30 SCFH. Byla provedena časová řada délky ošetření, kdy byly zvoleny časy procesu 5, 10, 15 a 30 min. Pro každou variantu bylo provedeno 6 opakování.

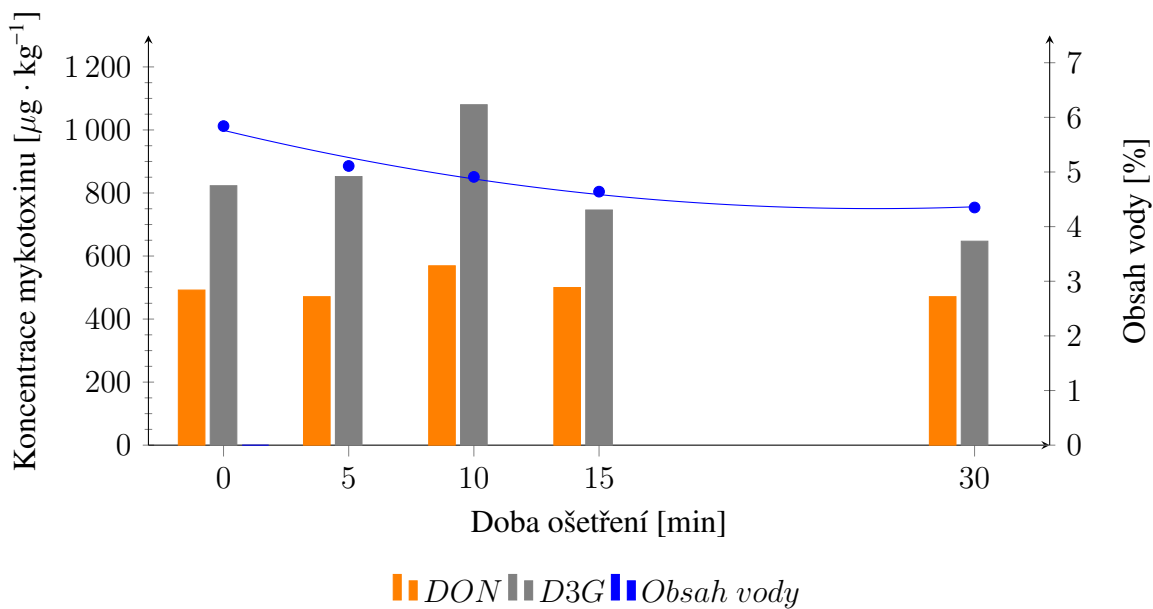
Při vyhodnocování byla sledována koncentrace DON, D3G a obsah vody v jednotlivých vzorcích.

**Tabulka 4.12:** Koncentrace mykotoxinů ve sladu po vystavení plazmatu

	Doba ošetření [min]	CTR	5	10	15	30
Slad pšeničný	Obsah vody [%]	6,01	5,59	5,15	4,87	4,29
	DON [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	212	461	289	302	294
	D3G [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	97	89	93	66	108
	Obsah vody [%]	5,84	5,11	4,91	4,64	4,35
Slad ječný	DON [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	492	471	569	500	471
	D3G [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	823	852	1 080	746	647



(a) Slad pšeničný



(b) Slad ječný

**Obrázek 4.24:** Obsah mykotoxinů v pšeničném a ječném sladu

### Gushingový slad

Gushing je fenomén pozorovaný u nápojů sycených oxidem uhličitým jako je například pivo. Jedná o se masivní přetečení piva po otevření nádoby. Principem tohoto jevu je okamžité uvolnění oxidu uhličitého po otevření lahve (Shokribousjein et al., 2011). Podle příčiny uvolnění CO<sub>2</sub> jej lze rozdělit na primární a sekundární gushing (Gjertsen et al., 1965). Zatímco primární gushing souvisí s kvalitou sladu, sekundární je spojen se zpracováním sladu v pivovaru. Je dobře známo, že nejdůležitějším faktorem způsobující primární gushing je infekce obilovin vláknitými houbami, které produkují povrchově aktivní proteiny, tzv. hydrofobiny (Postulkova et al., 2016). Nejznámější rod hub způsobující gushing je *Fusarium* (Virkajärvi et al., 2017), který je hlavním producentem mykotoxinů DON a jeho konjugátu D3G .

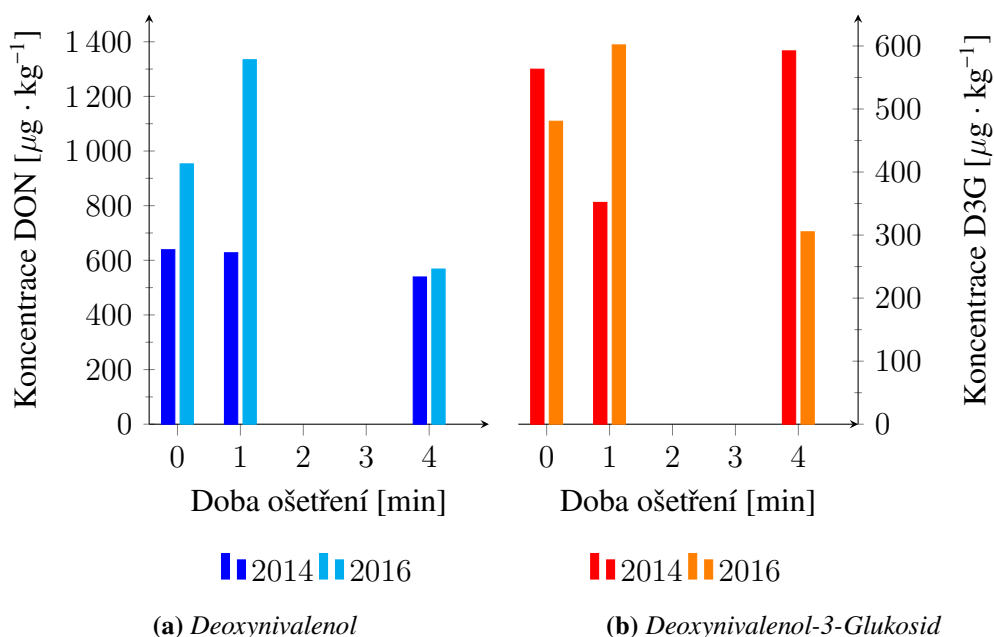
Pro následující pokusy byly vybrány vzorky gushingového sladu, kterými disponoval Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Brně. K ošetření sladu byly použity následující procesní parametry: vzorky byly ošetřovány v množství po 150 g, hrana plazmové hlavice se nacházela ve výšce 10 cm nad vrstvou sladu, proces probíhal po dobu 1 min, respektive 4 min, jako pracovní plyn byl opět použit vzduch o průtoku 30 SCFH. Pro každou variantu bylo provedeno 8 opakování.

Obsah mykotoxinů v gushingovém sladu byl proveden opakovaně v letech 2014 a 2016, což umožnilo sledovat vliv skladování komodity na obsah mykotoxinů.

**Tabulka 4.13:** Koncentrace mykotoxinů v gushingovém sladu po ošetření plazmatem

Rok	Název mykotoxinu	CTR	Doba ošetření	
			1 min	4 min
2014	DON [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	638,7	627,6	539,0
	D3G [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	563,2	351,8	592,2
2016	DON [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	953,0	1334,3	568,0
	D3G [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ]	480,6	601,7	305,2





(a) Deoxynivalenol

(b) Deoxynivalenol-3-Glukosid

**Obrázek 4.25:** Koncentrace mykotoxinů po vystavení plazmatu

#### 4.4.5 Diskuse k výsledkům kapitoly 4.4

Pro následující závěry a další úvahy opět platí konstatování uvedené v prvních dvou odstavcích kapitoly 4.3.5.

Experimentálně se podařilo prokázat, že se snižující se vzdáleností mezi vzorkem a hranou plazmové hlavice rapidně klesá koncentrace čistého DON (D3G) na Petriho miskách (viz obrázky 4.20 a 4.21). Cíleným experimentem se podařilo prokázat, že snížení koncentrace mykotoxinů na Petriho misce v důsledku proudění vzduchu z plazmové hlavice je zanedbatelné, tj. proudící vzduch odnese pouze zanedbatelnou část vzorku z Petriho misky. Při tomto experimentu byl plazmový výboj ponechán vypnutý a docházelo pouze k proudění vzduchu z kompresoru na Petriho misku.

Koncentrace DON výrazně klesá také s narůstající dobou ošetření, kdy již po 4 minutách dochází k úbytku téměř 95 % v případě 4 centimetrové vzdálenosti od plazmové trysky s průtokem pracovního plynu 30 SCFH, u ostatních vzorků se snížení koncentrace pohybovalo dokonce mezi 98 % a 99 %. V případě D3G je tento trend podobný, ale koncentrace mykotoxinu klesá v čase pomaleji. Hypotézu H4 tedy považujeme za pravdivou, přičemž intenzitu rozkladu mykotoxinů je možné ovlivnit vzdáleností plazmové trysky od vzorku a dobou ošetření.

Rozklad mykotoxinu Aflatoxin B1 umístěného na podložním mikroskopickém sklíčku za pomoci plazmového výboje generovaného v dusíku pozoroval také Sakudo et al. (2017) a jeho tým. K podobným výsledkům došel i tým B. J. Parka (Park et al., 2007), který k degradaci mykotoxinů použil mikrovlnného plazmového výboje v argonu. Dle informací uvedených v článku docházelo k degradaci mykotoxinu již po prvních sekundách od vystavení plazmatu, po 10 sekundách byly mykotoxiny již kompletně rozloženy. S ohledem na dobu ošetření je tedy možné předpokládat, že mikrovlnný výboj je pro odstraňování mykotoxinové zátěže výhodnější.

V případě reálných biologických substrátů nebyl vliv plazmatu na obsah mykotoxinů prokázán. Hlavním důvodem je především absence vhodného materiálu, který by bylo možné k objektivnímu posouzení vlivu plazmatu na mykotoxiny v obilkách hospodářských plodin použít. Experimentálně stanovené hodnoty koncentrace mykotoxinů ve vzorcích se pohybovaly nahodile a často pod mezí detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). S podobnými problémy se musel vypořádat a k podobným výsledkům dospěl také tým pod vedením A. Malachové (Malachová et al., 2010). Pravdivost hypotézy H5 tedy není možné potvrdit.

V interpretaci negativního výsledku je potřeba brát zřetel na skutečnost, že ošetření vzorku proběhlo při předem zvolených parametrech systému, přičemž snížení mykotoxinové zátěže nebylo následně prokázáno. Neznamená to však, že použitím jiných parametrů bude získán stejný výsledek, tj. mohou existovat takové procesní parametry, při kterých bude snížení mykotoxinové zátěže prokazatelně dosaženo.

## 4.5 Systém pro kontinuální ošetření vzorků

Výsledky, které byly prezentovány v předchozích kapitolách, byly získány na vzorcích ošetřených v dávkovém režimu. Dávkový režim není z ekonomických důvodů vhodný pro následné technické aplikace. Dílčím cílem projektu TAČR TA04021252 byl také vývoj funkčního vzorku zařízení pro ošetření semen v semi-kontinuálním režimu a ověření jeho účinnosti při snižování houbové infekce.

Navržený systém využívá stejnou plazmovou aparaturu, která byla popsána v části Materiál a metodika a která byla použita k ošetření vzorků v dávkovém režimu. Analýzou výsledků získaných pro dávkový režim byla určena vhodná vzdálenost ošetřovaných vzorků od plazmové trysky a optimální doba, kterou musí obilky strávit v plazmovém výboji tak, aby došlo k dostatečné eliminaci patogenů na povrchu obilek. Hodnoty byly následně zohledněny při návrhu nového systému pro kontinuální ošetření vzorků. Významně limitujícím faktorem je požadavek na ekonomiku provozu – z ekonomických důvodů není možné dobu, po kterou se vzorek nachází v plazmatu, libovolně prodlužovat, ačkoliv by to umožnilo lepší ošetření obilek.

V této kapitole budou stručně popsány dvě varianty zařízení, které byly během projektu postupně vyrobeny a odzkoušeny. Funkční vzorky se mezi sebou liší zejména ve způsobu, kterým je zajištěn pohyb obilek pod plazmovými hlavicemi, přičemž využito je:

- šnekového dopravníku,
- pásového dopravníku.

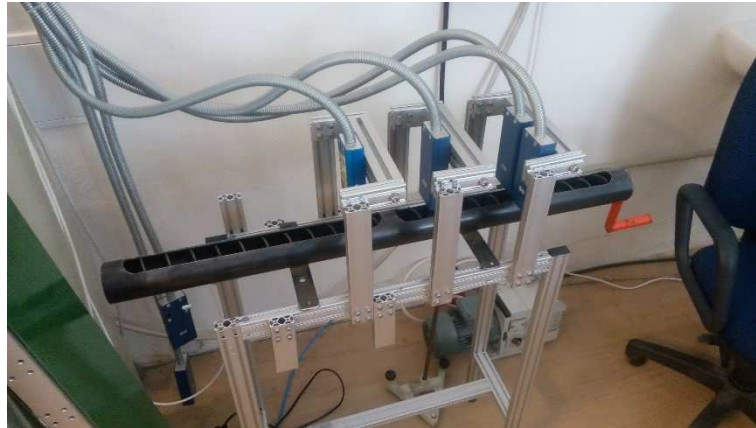
**Plazmové zdroje** Všechny experimentální systémy byly vybaveny stejnými plazmovými zdroji typu Gliding Arc, jenž jsou popsány výše v kapitole 1.3.4. U systémů se lišilo pouze jejich rozmístění nad vytyčenou trasou ošetřovaných komodit.

### 4.5.1 Systém se šnekovým dopravníkem

Systém využívající k pohybu ošetřovaných zrnin šnekového dopravníku nabízí řadu výhod. Semena jsou během pohybu přirozeně otáčena, čímž je zajištěno jejich rovnoměrné ošetření plazmovým výbojem. Systém zároveň umožňuje libovolně měnit rychlost otáčení šneku, čímž lze upravovat rychlost posunu zrnin v systému, potažmo čas strávený pod plazmovou hlavicí.

Systém se skládá z kovové bezosé spirály vnějšího průměru 60 mm, vnitřního průměru 36 mm, tloušťce 4,3 mm a se stoupáním 40 mm umístěné v železném žlabu tloušťky 4 mm o průměru 70 mm. Celá konstrukce byla umístěna na hliníkových profilech ITEM a nad ní byly na stejných profilech umístěny plazmové hlavice. Šnek byl otáčen ručně pomocí kliky, přičemž v dalších etapách vývoje se počítalo s připojením spirály k motoru s řízenými otáčkami.

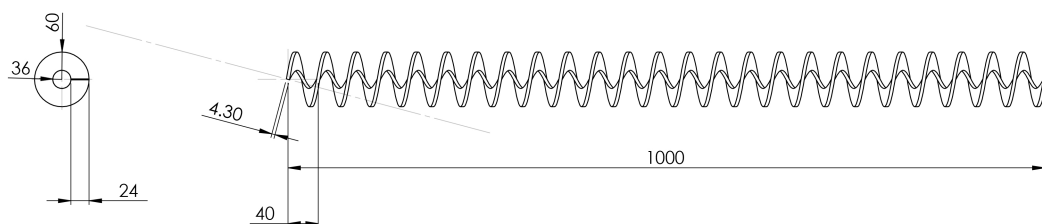
Analýza vzorků ošetřených plazmovým výbojem v systému využívajícího šnekového dopravníku prokázala, že plazmový výboj nemá na spory hub prakticky žádný vliv. Hlavním důvodem je zřejmě použití kovové konstrukce a šneku, které jsou vyrobené z elektricky vodivého materiálu (kovů), čímž dochází ke snížení koncentrace reaktivních částic v plazmatu. Proces se tak stává neefektivní.



Obrázek 4.26: Systém se šnekovým dopravníkem



Obrázek 4.27: Výroba železného žlabu



Obrázek 4.28: Technický výkres šroubovice

Tabulka 4.14: Parametry systému se šnekovým dopravníkem

Parametr	Hodnota
Vnější průměr	60 mm
Vnitřní průměr	36 mm
Střední průměr	48 mm
Tloušťka materiálu	4,3 mm
Stoupání šroubovice	40 mm
Délka šroubovice	1 000 mm
Průměr žlabu	70 mm
Tloušťka materiálu žlabu	4 mm
Materiál šroubovice a žlabu	ocel

#### 4.5.2 Systém s pásovým dopravníkem

Základním prvkem zařízení je pásový dopravník se sérií hlavic plazmových trysek umístěných nad dopravníkem. Jednotlivé trysky jsou napájeny z vlastního vysokonapětového zdroje. Zdroje jsou umístěny v řídicím racku s elektronickým ovládním. Součástí zařízení je také zásobník, ve kterém jsou umístěna semena určená k ošetření a na pás se dostávají za pomoci mechanického pohybu dávkovače. Za pomoci vymezovačů pohybu jsou vytvořeny pracovní cesty, kterými jsou unášena semena pod plazmové trysky se zapálenými výboji. Po absolvování celého procesu ošetření jsou semena shromažďována v zásobníku ošetřených semen.

Procesní parametry je možno upravovat změnou rychlostí posunu dopravníku, počtem plazmových hlavic a jejich vzdáleností od ošetřovaného materiálu.



Obrázek 4.29: Celkový pohled na zařízení

### Zdroj plazmatu

Za pomoci vymezovačů pohybu jsou vytvořeny dvě pracovní cesty. Nad každou pracovní cestou jsou rozmístěny tři plazmové hlavice (celkově 6 hlavíc), které jsou upevněny na hliníkových profilech ITEM. Nastavení výšky hlavice nad ošetřovaným materiálem lze provést v rozsahu od 50 do 100 mm. Rozestupy jednotlivých trysek lze nastavit dle potřeby na délce 580 mm konstrukce držící celý dopravník. Zároveň je možno natočit plazmovou hlavici od normály v rozsahu  $-80^\circ$  až  $80^\circ$ .

Vysoké napětí vygenerované ve vysokonapětových zdrojích umístěných v racku je za pomoci vodičů přivedeno na elektrody v plazmových hlavicích. Každou hlavici je možno nezávisle ovládat, zapínat a vypínat, z dotykového panelu umístěného v racku.

### Pásový dopravník

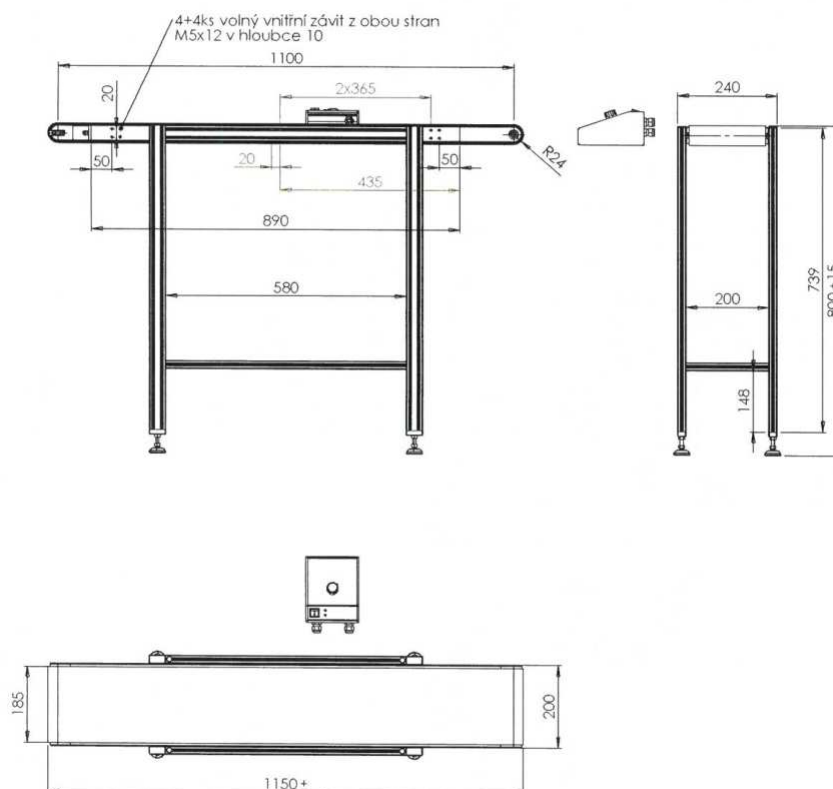
Pásový dopravník typ MINI 24V od firmy Haberkorn Ulmer, s.r.o je tvořen rámem z hliníkových profilů ITEM a nekonečného pásu, který je upevněn v rámu pomocí hnacího a hnaného bubnu s ložisky a napínáky.



**Obrázek 4.30:** Pásový dopravník s dávkovačem a podavačem

Dopravník má rozměry  $1\,150 \times 200$  mm a jeho maximální zatížení je  $3\text{ kg} \cdot \text{m}^{-1}$ . Pohyb pásu zajišťuje elektromotor s planetovým převodem napájený ze zdroje stejnosměrného napětí 7-26 V. Elektromotor umožňuje nastavení rychlosti pohybu pásu od  $1,5$  do  $18,2\text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ . V případě ohrožení zdraví operátora je na konstrukci umístěno tlačítko STOP.

Pásový dopravník je řešen stylem nekonečného pásu o šířce 186 mm a délce 2 346 mm. Pás je vyroben z Ropanylu EM 8/2 00+02 a má antistatickou a potravinářskou povrchovou úpravou. Pracovní cesty jsou vymezeny teflonovými lištami dlouhými 1 000 mm, vysokými 50 mm a širokými 2 mm. Teflonové lišty byly zvoleny po zkušenostech s šnekovým dopravníkem, kde kovové části odstraňovaly reaktivní částice z plazmatu. Lišty jsou připevněny na hliníkových profilech ITEM držících plazmové trysky. Šířka pracovní cesty byla zvolena s ohledem na šířku aktivní části plazmového výboje.



**Obrázek 4.31:** Náskres pásového dopravníku

**Tabulka 4.15:** Parametry pásového dopravníku

### Pásový dopravník

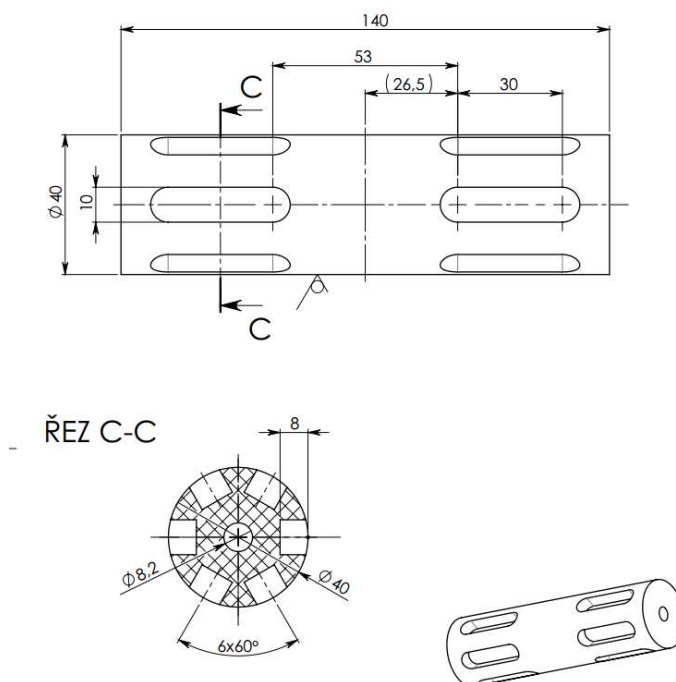
Délka	1 150 mm
Šířka	200 mm
Zatížení	3 kg · m <sup>-1</sup>
Pohon	Elektromotor s planetovým převodem
Rychlost pohybu pásu	1,5–18,2 m · min <sup>-1</sup>
Napájení elektromotoru	7–26 V

### Nekonečný pás

Délka	2 346 mm
Šířka	186 mm
Materiál	Ropanyl EM 8/2 00+02
– povrchová úprava	antistatická a potravinářská

### Dávkovač a nádoba na uložení ošetřených semen

Rovnoměrné rozložení ošetřeného materiálu nezbytné k optimálnímu ošetření je realizováno za pomoci dávkovače. Dávkovač je složen ze zásobníku a mechanicky rotujícího válce podavače. Rozměry podavače jsou 160×40 mm s podélnými výřezy 30×10 mm. Výřezy jsou umístěné 2× v ose válce a 6× po obvodu s rozstupem 60°. Množství dávky je řízeno z ovládacího panelu umístěného v racku za pomoci změny rychlosti otáčení podavače.



Obrázek 4.32: Dávkový zařízení

### Procesní parametry pro ošetření semen ječmene, sladu a pšenice

Procesní parametry pro ošetření zrnin ječmene, sladu a pšenice jsou uvedeny v tabulce 4.16.

Tabulka 4.16: Procesní parametry

Parametr	Hodnota
Výška trysky nad pásem dopravníku	6 cm (ječmen, slad), 5 cm (pšenice)
Vzdálenost mezi tryskami	18 cm
Sklon trysky od normály	0°
Průtok vzduchu	0,85 m <sup>3</sup> · h <sup>-1</sup> (tj. 30 SCFH)
Rychlost posuvu pásu	2,5 cm · s <sup>-1</sup>



### 4.5.3 Ekonomické zhodnocení systému s pásovým dopravníkem

V závěrečné fázi projektu byly odhadnuty ekonomické parametry jednotlivých zařízení – cena provozu a cena za kilogram ošetřeného materiálu. Zařízení, které by bylo účinné a funkční, ale ekonomicky nevýhodné, by nemělo šanci uspět při nasazení v reálném průmyslovém provozu.

Spotřeba elektrické energie potřebné k ošetření komodit byla vypočtena podle vztahu 4.1

$$E = P_0 \cdot t, \quad (4.1)$$

kde:

$E$  – spotřebovaná elektrická energie [J],

$P_0$  – stálý elektrický příkon [W],

$t$  – doba odběru elektrické energie [s].

Náklady na elektrickou energii jsou převzaty z ceníky firmy E.ON, která k 1.1.2017 činila 4 311,31 Kč/MWh.

**Kompresor** Přetlak pracovního plynu byl ve všech systémech vytvořen kompresorem Orlík IKD 11/40. Kompresor byl nastaven na udržování přetlaku 600 kPa – kompresor byl natlakován na 900 kPa a při poklesu hodnoty na 600 kPa sepnul. Empiricky bylo stanoveno, že kompresor spíná jednou za 7 min 36 s, tj.  $7,89 \times$  během jedné hodiny provozu. Doba za kterou dojde k opětovnému dotlakování vzdušníku je 1 min 32 s. Celkové náklady na provoz vzdušníku jsou tedy 1,30 Kč.

**Tabulka 4.17:** Ekonomické zhodnocení systému s pásovým dopravníkem

Součást	Příkon $P_0$ [W]	Celková energie $E$ [kW]	Cena za provoz [Kč · h <sup>-1</sup> ]
Kompresor	1 500	1,5	6,47
Tryska	400	0,4	1,73
Pohon pásu	6	0,006	0,03
Počet trysek	6		
<b>Celková cena provozu</b>			1,72 Kč · h <sup>-1</sup>
<b>Množství ošetřených semen</b>			5,40 kg · h <sup>-1</sup>
<b>Cena za jednotku hmotnosti</b>			2,18 Kč · kg <sup>-1</sup>
<b>Požizovací náklady plazmové aparatury</b>			150 000 Kč · ks <sup>-1</sup>

---

# Závěr

Současná intenzivní zemědělská výroba klade na produkci zemědělských komodit vysoké požadavky, a to jak po stránce kvantitativní, tak kvalitativní. Očekávané hospodářské výsledky podniku je možné dosáhnout pouze při striktním dodržování technologie chovu, což mimo jiné předpokládá také použití kvalitních a zdravotně nezávadných krmiv.

V předložené dizertační práci jsou prezentovány vybrané výsledky experimentů, jejichž cílem bylo posoudit možnosti využití nízkoteplotního klouzavého plazmového výboje generovaného za atmosférického tlaku k eliminaci modelových houbových patogenů přítomných v krmivech a možnosti využití této technologie ke snížení mykotoxinové zátěže krmiva. Z rešerše literatury, která byla provedena před zahájením studia, bylo zřejmé, že plazmové technologie mohou být pro tento účel velmi vhodným nástrojem, který by mohl konkurovat jiným metodám využívaným v současnosti.

Během doktorského studia se podařilo dosáhnout všech vytyčených cílů. Experimentálně bylo prokázáno, že plazmový výboj ovlivňuje výživové parametry krmiva jen minimálně, přičemž nejmarkantnější je pokles vlhkosti krmiva. Zároveň se podařilo charakterizovat parametry plazmové aparatury, která byla pro další experimenty využívána. Získané údaje mohou pro svou práci využít pracovní skupiny, které budou na tuto dizertační práci navazovat.

Úspěšně se podařilo také posoudit pět hypotéz, které byly formulovány v části „Cíle práce“.

## Hypotéza H1

**Znění hypotézy:** Ošetření spor houby *Trichoderma virens* plazmovým výbojem typu Gliding Arc snižuje jejich klíčivost v laboratorních podmínkách.

**Potvrzení/zamítnutí hypotézy** Výsledky provedených experimentů **potvrdily** snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* po vystavení plazmovému výboji typu Gliding Arc v laboratorních podmínkách.

## Hypotéza H2

**Znění hypotézy:** Snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* je způsobeno synergií několika mechanismů působení plazmového výboje – zejména teplotou, UV zářením a interakcí spor s reaktivními částicemi generovanými v plazmatu.

**Potvrzení/zamítnutí hypotézy** Dílčí experimenty vlivu jednotlivých složek plazmatu **potvrdily** jejich účinek na snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens*. Současně s tím byl **potvrzen** vliv synergického efektu fyzikálně/chemických mechanismů v plazmatu na účinnost ošetření.

### Hypotéza H3

**Znění hypotézy:** Ošetření plazmovým výbojem vede ke snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* na obilkách semen modelových hospodářských plodin.

**Potvrzení/zamítnutí hypotézy** Výsledky provedených experimentů **potvrzují** vliv plazmového výboje na snížení klíčivosti spor houby *Trichoderma virens* na obilkách semen modelových hospodářských plodin.

### Hypotéza H4

**Znění hypotézy:** Ošetření vzorku mykotoxinů DON a DON-3-Glc umístěného na Petriho misce plazmovým výbojem typu Gliding Arc způsobuje jejich rozklad, tj. snižuje koncentraci mykotoxinů ve vzorku.

**Potvrzení/zamítnutí hypotézy** Plazmový výboj **má** pozitivní vliv na vzorky mykotoxinů DON a DON-3-Glc umístěného na Petriho misce, tj. snižuje koncentraci mykotoxinů ve vzorku.

### Hypotéza H5

**Znění hypotézy:** Ošetření vzorku mykotoxinů DON a DON-3-Glc přítomných v obilkách pšenice a ječmene plazmovým výbojem typu Gliding Arc způsobuje jejich rozklad, tj. snižuje koncentraci mykotoxinů ve vzorku.

**Potvrzení/zamítnutí hypotézy** Výsledky provedených experimentů **nepotvrdily** vliv plazmového výboje na rozklad mykotoxinů DON a DON-3-Glc přítomných v obilkách pšenice a ječmene.

Samostatnou kapitolou je pak využití získaných poznatků při experimentálním vývoji systému pro semikontinuální ošetření vzorků. Výsledkem těchto aktivit je funkční vzelek zařízení, které se skládá ze systému šesti plazmových trysek se zdroji umístěnými v centrálním racku, pásového dopravníku, dávkovače krmiva a zásobníku na ošetřený materiál. Funkční zařízení je možno úspěšně využít k eliminaci houbové infekce na obilkách ošetřovaných plodin.

Závěrem je možno konstatovat, že plazmový výboj typu Gliding Arc má potenciál pro aplikační využití v oblasti zvyšování kvality krmiv.

# Seznam použitých zdrojů

- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castellá, G., a Cabañes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7):2650–2652.
- Amini, M. a Ghoranneviss, M. (2016). Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. *{LWT} - Food Science and Technology*, 73:178–184.
- Aoki, T., Ward, T. J., Kistler, H. C., a O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *JSM Mycotoxins*, 62(2):91–102.
- Baier, M., Görgen, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Herppich, W. B., a Schlüter, O. (2014). Non-thermal atmospheric pressure plasma: Screening for gentle process conditions and antibacterial efficiency on perishable fresh produce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22:147–157.
- Bartoš, P., Ptáčník, J., Kříž, P., Špatenka, P., Havelka, Z., Olšan, P., a Veselý, B. (2016). Distribution of electric field between electrodes in plasma jet: Computational study. *Journal of Electrical Engineering*, 16(1):99–106.
- Bartoš, P., Špatenka, P., a Volfová, L. (2009). Deposition of TiO<sub>2</sub>-based layer on textile substrate: Theoretical and experimental study. *Plasma Processes and Polymers*, 6(SUPPL. 1):S897–S901.
- Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., Fuchs, E., Gaylor, D. W., Hard, G., Gregory, D. B., Pitt, J. I., Plestina, R., Shephard, G., Solfrizzo, M., Verger, P. J. P., a Walker, R. (2001). Ochratoxin A safety evaluation of certain mycotoxins in food. *Food and Nutrition Paper*, 74:281–415.
- Bermúdez-Aguirre, D., Wemlinger, E., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G., a Garcia-Perez, M. (2013). Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. *Food Control*, 34(1):149–157.
- Běláková, S., Benešová, K., Čáslavský, J., Svoboda, Z., a Mikulíková, R. (2014). The occurrence of the selected *fusarium* mycotoxins in Czech malting barley. *Food Control*, 37:93–98.
- Bhat, R., Rai, R., a Karima, A. (2010). Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1):57–81.

- Bishop, C. A. (2011). The DC glow discharge or plasma. In *Vacuum Deposition onto Webs, Films and Foils*, pages 251–260. Elsevier BV, Oxford, 2nd edition. ISBN: 978-1-4377-7867-0.
- Boeuf, J.-P. (1987). Numerical model of RF glow discharges. *Physical Review A General Physics*, 36(6):2782–2792.
- Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., a van der Mullen, J. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57(4):609–658.
- Bolechová, M., Benešová, K., Běláková, S., Čáslavský, J., Pospíchalová, M., a Mikulíková, R. (2015). Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Republic. *Food Control*, 47(4):108–113.
- Bosch, L., Pfohl, K., Avramidis, G., Wieneke, S., Viölm, W., a P., K. (2017). Plasma based degradation of mycotoxins produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* species. *Toxins*, 9(3):97.
- Broks, B. H. P., Brok, W. J. M., Remy, J., van der Mullen, J. J. A. M., Benidar, A., Biennier, L., a Salama, F. (2005). Numerical investigation of the discharge characteristics of the pulsed discharge nozzle. *Physical Review E*, 71(3, 2).
- Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2):134–158.
- Burlica, R., Hnatiuc, E., Pricop, C., a Felea, C. (2014). A comparative study of non-thermal plasma Glidarc reactors. *2014 International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM 2014*, pages 1060–1065.
- CAST (2003). *Mycotoxins - Risks in plant, animals and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA. ISBN: 1-887383-22-0.
- Cole, R. J., Jarvis, B. B., a Schweikert, M. A. (2003). *Handbook of secondary fungal metabolites*, volume I, II. and III. Academic Press, New York. ISBN: 978-0-12-179460-6.
- Cui, H., Ma, C., Li, C., a Lin, L. (2016). Enhancing the antibacterial activity of thyme oil against *Salmonella* on eggshell by plasma-assisted process. *Food Control*, 70:183–190.
- Cullen, J. M. a Newberne, P. N. (1994). *The toxicology of aflatoxins Human health, veterinary, and agricultural significance*, chapter Acute hepatotoxicity of aflatoxins, pages 3–26. Academic Press, San Diego, CA. ISBN: 978-0-12-228255-3.
- Dasan, B. G., Boyaci, I. H., a Mutlu, M. (2016). Inactivation of aflatoxigenic fungi (*Aspergillus spp.*) on granular food model, maize, in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system. *Food Control*, 70:1–8.
- Devreese, M., Girgis, G. N., Tran, S. T., DeBaere, S., DeBacker, P., Croubels, S., a Smith, T. K. (2014). The effect of feed-borne *Fusarium* mycotoxins and glucomannan in turkey poult based on specific and non-specific parameters. *Food and Chemical Toxicology*, 63:69–75.

- Doležal, P. (2012). *Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat*. Petr Baštan, Olomouc. ISBN: 978-80-87091-33-3.
- Eaton, D., Beima, K., Bammler, T., Riley, R. T., a Voss, K. A. (2010). Hepatotoxic mycotoxins. *Comprehensive Toxicology*, 9:527–569.
- Ehlbeck, J., Schnabel, U., Andrasch, M., Stachowiak, J., Stolz, N., Fröhling, A., Schlüter, O., a Weltmann, K. (2015). Plasma treatment of food. *Contribution to Plasma Physics*, 55:753–757.
- Elen, O., Abrahamsen, U., a Brodal, G. (2002). The response of *Fusarium spp.* on different growing systems of barley. In *Proceedings of the Conference: Sustainable Systems of Cereal Crop Protection Against Fungal Diseases as the way of Reduction of Toxin Occurrence in Food Webs.*, pages 213–217, Kroměříž, Czech Republic.
- Eliasson, B., Egli, W., a Kogelschatz, U. (1994). Modeling of dielectric barrier discharge chemistry. *Pure and Applied Chemistry*, 66(6):1279–1286. 11th International Symposium on Plasma Chemistry, Loughborough, England, Aug 22-27, 1993.
- Esteban, A., Leong, S.-L. L., a Tran-Dinh, N. (2005). Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci in *Aspergillus niger*. *Molecular Ecology Notes*, 5(2):375–377.
- Fassatiová, O. (1979). *Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii*. SNTL, Praha. Řada potravinářské literatury.
- Flannigan, B. a Healy, R. E. (1983). The microflora of barleys accepted and rejected for malting. *Journal of the Institute of Brewing*, 89:341–343.
- Flannigan, B., Okagbue, R., Khalid, R., a Teoh, C. (1982). Mould flora of malt in production and storage. *Brewing & Distilling International*, 12:31–37.
- Fridman, A., Nester, S., Kennedy, L. A., Saveliev, A., a Mutaf-Yardimci, O. (1999). Gliding arc gas discharge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 25(2):211–231.
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., a Fridman, A. (2008). Applied plasma medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5(6):503–533.
- Frisvad, J. C. (1989). The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18(3):452–467.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I., a Samson, R. A. (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In Samson, R. A. a Pitt, J. I., editors, *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*, pages 55–62. Springer. ISBN 978-1-4419-3204-4.
- Gangoli, S. P., Gutsol, A. F., a Fridman, A. A. (2010a). A non-equilibrium plasma source: Magnetically stabilized gliding arc discharge: I. Design and diagnostics. *Plasma Source Science and Technology*, 19(6):065003.

- Gangoli, S. P., Gutsol, A. F., a Fridman, A. A. (2010b). A non-equilibrium plasma source: Magnetically stabilized gliding arc discharge: II. Electrical characterization. *Plasma Source Science and Technology*, 19(6):065004.
- Geiser, D. M., Frisvad, J. C., a Taylor, J. W. (1998). Evolutionary relationships in *Aspergillus* section fumigati inferred from partial beta-tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia*, 90(5):831–845.
- Gjertsen, P., Trolle, B., a Andersen, K. (1965). Harmful effects of mycotoxins on animal physiology Gushing caused by microorganisms, specially *Fuserium* species. In *Proceedings of the 10th Congress –European Brewery Convention*, pages 428–438, Stockholm, Amsterdam. Elsevier.
- Glyn, N. C., Hare, M. C., Parry, D. W., a Edwards, S. G. (2005). Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status. *Mycological Research*, 109(Pt 8):872–880.
- Go, S.-M., Park, M.-R., Kim, H.-S., Choi, W. S., a Jeong, R.-D. (1998). Antifungal effect of non-thermal atmospheric plasma and its application for control of postharvest *Fusarium oxysporum* decay of paprika. *Food Control*, 98:245–252.
- Grossmannová, H. (2008). *Diagnostika rozkladu těkavých organických látek v klouzavém obloukovém plazmatickém výboji*. Vysoké učení technické v Brně, Brno. Disertační práce.
- Habischied, K., Šarkanj, B., Klapac, T., a Krstanović, V. (2011). Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions. *Food Chemistry*, 129(2):329–332.
- Haikara, A., Mäkinen, V., a Hakulinen, R. (1977). On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. In *Proceedings of European Brewing Convention*, page 35, Amsterdam, Nederland.
- Hajšlová, J. (2008). *Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha. [cit. 2017-20-02], Dostupné z: <http://www.phytopathology.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>.
- He, J., Zhou, T., Young, J. C., Boland, G. J., a Scott, P. M. (2010). Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2):67–76.
- Henneberg, W. a Stohman, F. (1860). *Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer*. CA Schwetschtke and Sohn (M. Bruhn), Braunschweig, Germany.
- Henriksen, B. a Elen, O. (2005). Natural *Fusarium* grain infection level in wheat, barley and oat after early application of fungicides and herbicides. *Journal of Phytopathology*, 153(4):214–220.

- Hocking, A. D. (2006). *Aspergillus* and related teleomorphs. In de W. Blackburn, C., editor, *Food Spoilage Microorganisms*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pages 451–487. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-966-6.
- Hýsek, J., Vach, M., a Javůrek, M. (2008). *Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům*. Výzkumný ústav rostlinn výroby, Praha, metodika pro praxi edition. ISBN 978-80-87011-56-0.
- Chalupáčová, M. (2002). Prevence plísňových onemocnění. [online]. [cit. 2015-09-15], Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/czsp/edice/plne\\_znani/prevence\\_plisni.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/czsp/edice/plne_znani/prevence_plisni.pdf).
- Cheeke, P. R. (1998). *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*, chapter Mycotoxins in cereal grains and supplements, pages 87–136. Interstate Publishers, Inc., Danville, IL. ISBN: 978-0813431284.
- Chen, H. H., Chang, H. C., Chen, Y. K., Hung, C. L., Lin, S. Y., a Chen, Y. S. (2016). An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma. *Food Chemistry*, 191:120–127. *Advances in Rice Chemistry, Nutrition and Technology*.
- Chu, P. K. (2007). Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies. *Surface and Coatings Technology*, 201(19–20):8076–8082. {SMMIB 2005} 14th International Conference on Surface Modification of Materials by Ion Beams.
- IARC (1993). *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*, volume 56. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Lyon, France.
- ICMSF (1998). Cereals and cereal products. In *Microorganism in Foods*, pages 313–355. Springer, Boston, MA. ISBN 978-1-4613-7422-0.
- Iheshiulor, O. O. M., Esonu, B. O., Chuwuka, O. K., Omede, A. A., Okoli, I. C., a Ogbuewu, I. P. (2011). Effect of mycotoxins in animal nutrition: A review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 5(1):19–33.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., a Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In Butt, T. M. and Jackson, C. a Magan, N., editors, *Fungi as biocontrol agents -progress, problems and potential*, pages 23–69. CAB International, Wallingford, UK.
- Ingr, I. (2007). *Základy konzervace potravin*. MZLU v Brně, Brno, 3rd edition. ISBN 978-80-7375-110-4.
- Jin, Q., Wang, H., Yu, A., Duan, Y., Liu, X., a Wang, F. (1991). Studies on fundamental characteristics of a new analytical source – Microwave plasma torch (MPT) discharge. *Analytical Sciences*, 7(S):559–562.



- Johannessen, G. S. a Torp, M. (2005). Improving the safety of organic vegetables. In Jongen, W., editor, *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pages 331–348. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-956-7.
- Kabak, B. (2009). Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2):348–352.
- Kalina, T. a Váňa, J. (2005). *Sinice, řasy, houby, mechorostry a podobné organismy v současné biologii*. Univerzita Karlova, Praha. ISBN: 80-246-1036-1.
- Kheyrodin, H. a Kheirodin, S. (2017). New method identification of *Fusarium* species isolated from soil and plants. *Academia Journal of Scientific Research*, 5(7):209–217.
- Kim, B., Yun, H., Jung, S., Jung, Y., Jung, H., Choe, W., a Jo, C. (2011). Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiology*, 28(1):9–13.
- Kim, J. C., Kang, H. J., Lee, D. H., a Yoshizawa, T. (1993). Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11):3798–3802.
- Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*, 22(1):366–383.
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands. ISBN 90-70-351-46-3.
- Kogelschatz, U. (2003). Dielectric-barrier discharges: Their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 23(1):1–46.
- Kogelschatz, U. a Salge, J. (2001). High-pressure plasmas: Dielectric-barrier and corona discharges properties and technical Applications. In Hippler, R., Kersten, H., Schmidt, M., a Schoenbach, K. H., editors, *Low temperature plasmas, fundamental, technologies, and techniques*, pages 439–462. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 978-3-527-40673-9.
- Kolev, S. a Bogaerts, A. (2015). Similarities and differences between gliding glow and gliding arc discharges. *Plasma Sources Science and Technology*, 24(6):065023.
- Konvalina, P., Štěrba, Z., Vlášek, O., Moudrý, J., J., Capouchová, I., a Stehno, Z. (2016). *Fusarium spp.* occurrence in grains of ancient wheat species. *Romanian Agricultural Research*, 33.
- Korolev, Y., Frants, O., Landl, N., Bolotov, A., a Nekhoroshev, V. (2014). Features of a near-cathode region in a gliding arc discharge in air flow. *Plasma Sources Science and Technology*, 23(5):054016.
- Kostelanská, M., Hajšlová, J., Zachariášová, M., Malachová, A., Kalachová, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P. M., Berthiller, F., a Krska, R. (2009). Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8):3187–3194.

- Kottapalli, B. a Wolf-Hall, C. E. (2008). Effect of hot water treatments on the safety and quality of *Fusarium*-infected malting barley. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2):171–178.
- Kovačević, D. B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambrak, A. R., a Herceg, Z. (2016). Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chemistry*, 190:317–323.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., a Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6):1595–1612.
- Krmenčík, P. a Kysilka, J. (1.1.2001). Toxikon. [online]. [cit. 2015-09-11], Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/>.
- Kříž, P., Olšan, P., Havelka, Z., Horáková, M., Bartoš, P., Vazdová, P., Syamkrishna, B., a Špatenka, P. (2014). Seed treatment and water purification by the synergical effect of gliding arc plasma and photocatalytic film. In *2014 International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM)*, pages 1042–1046.
- Kříž, P., Bartoš, P., Havelka, Z., Kadlec, J., Olšan, P., Špatenka, P., a Dienstbier, M. (2015). Influence of plasma treatment in open air on mycotoxin content and grain nutriment. *Plasma Medicine*, 5(2-4):145–158.
- Kulhánek, P. (2011). *Úvod do teorie plazmatu*. AGA, Praha, 1st edition. ISBN: 978-80-904582-2-2.
- Kulovaná, E., Kummer, V., a Faldíková, L. (23.1.2002). Účinky mykotoxinů na zdraví a reprodukci hospodářských zvířat. [online]. [cit. 2019-04-09], Dostupné z: <https://www.naschov.cz/ucinky-mykotoxinu-na-zdravi-a-reprodukcii-hospodarskych-zvirat/>.
- Kunhardt, E. E. (1980). Electrical breakdown of gases: The prebreakdown stage. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 8(3):130–138.
- Lancová, K., Hajšlová, J., Poustka, J., Krplová, A., Zachariášová, M., Dostálek, P., a Sachambula, L. (2008). Transfer of *Fusarium* mycotoxins and masked deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control Exposure & Risk Assessment*, 25(5):732–744.
- Laroussi, M., Dobbs, F. C., Wei, Z., Doblin, M. A., Ball, L. G., Moreira, K. R., Dyer, F. F., a Richardson, J. P. (2002). Decontamination of water by excimer UV radiation. *IEEE Transaction on Plasma Science*, 30(4):1501–1503.
- Laroussi, M. a Leipold, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233(1-3):81–86.

- Lee, K. H., Kim, H.-J., Woo, K. S., Jo, C., Kim, J.-K., Kim, S. H., Park, H. Y., Oh, S.-K., a Kim, W. H. (2016). Evaluation of cold plasma treatments for improved microbial and physicochemical qualities of brown rice. *{LWT} - Food Science and Technology*, 73:442–447.
- Leipold, F., Schultz-Jensen, N., Kusano, Y., Bindslev, H., a Jacobsen, T. (2011). Decontamination of objects in a sealed container by means of atmospheric pressure plasmas. *Food Control*, 22(8):1296–1301.
- Leslie, J. F. a Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Wiley-Blackwell, Iowa, USA. ISBN: 978-0-813-81919-8.
- López, C. E., Ramos, L. L., Ramadán, S. S., a Bulacio, L. C. (2003). Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14(1):31–34.
- Magan, N. a Olsen, N. (2004). *Mycotoxin in food: Detection and control*. Woodhead Publishing limited, Cambridge, England. ISBN: 978-0849325579.
- Malachová, A., Hajšlová, J., Ehrenbergerová, J., Kostelanská, M., Zachariášová, M., Urbanová, J., Cerkal, R., Šafránková, I., Marková, J., Vaculová, K., a Hrsková, P. (2010). *Fusarium* mycotoxins in spring barley and their transfer into malt. *Kvasný průmysl*, 56(3):131–136.
- Malíř, F., Ostrý, V., a Novotná, E. (2013). Toxické účinky vybraných trichotecenových (epoxytrichotecenových) mykotoxinů u člověka. *Kontakt*, 15(1):89–99.
- Mallman, C. A. a Dilkin, P. (2011). *Mycotoxins and mycotoxicosis in swine secure*. Special Nutrients, inc. [cit. 2017-20-01], Dostupné z: <http://www.specialnutrients.com/pdf/book/Mycotoxins%20and%20Mycotxicosis%20in%20Swine%20Secure.pdf>.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E. M., Mateo, F., a Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2):79–83.
- Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F. J., a Irene, N. (2012). Germination induced the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chemistry*, 131(1):274–279.
- McKane, J. a Kandel, J. (1996). *Microbiology essentials and applications*. McGraw-Hill Companies, USA, California, 2nd edition. ISBN: 978-0070451544.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., a Van Sanford, D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease*, 96(12).
- Mertens, D. (2000). Physically effective NDF and its use in dairy rations explored. *Feedstuffs*, 4:16–20.
- Misra, N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J., Keener, K., a Cullen, P. (2014a). In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *Journal of Food Engineering*, 125:131–138.

- Misra, N. N., Keener, K. M., Bourke, P., Mosnier, J.-P., a Cullen, P. J. (2014b). In-package atmospheric pressure cold plasma treatment of cherry tomatoes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2):177–182.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.-C., Pelletier, J., Philip, N., a Saoudi, B. (2009). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 74(3):349–358.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., a Yahia, L. (2001). Low-temperature sterilization using gas plasmas: A review of the experiment and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 226(1-2):1–21.
- Montie, T. C., Kelly-Wintenberg, K., a Roth, J. R. (2000). An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28(1):41–50.
- Moreau, M., Orange, N., a Feuilleley, M. (2008). Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26(6):610–617.
- Moretti, A. (2009). Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, 117.
- Moss, M. O. a Thrane, U. (2004). *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153(1):23–28.
- Mošovská, S., Medvecká, V., ria Gregová, M., na Tomeková, J., ubomí r Valík, Ľ., Mikulajová, A., a Zahoranová, A. (2019). Plasma inactivation of *Aspergillus flavus* on hazelnut surface in a diffuse barrier discharge using different working gases. *Food Control*, 104:256–261.
- Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I., a Gruber-Dorninger, C. (2019). Mycotoxins in corn: Occurrence, impacts, and management. In Serna-Saldivar, S. O., editor, *Corn (Third Edition)*, pages 235 – 287. AACCC International Press, Oxford, 3rd edition. ISBN 978-0-12-811971-6.
- Nagl, V. a Schatzmayr, G. (2015). Deoxynivalenol and its masked forms in food and feed. *Current Opinion in Food Science*, 5:43–49.
- Naïtali, M., Herry, J.-M., Hnautic, E., Kamgang, G., a Brisset, J.-L. (2012). Kinetics and bacterial inactivation induced by peroxydinitrite in electric discharges in air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 32(4):675–692.
- Nelson, P., Desjardins, A., a R.D., P. (1993). Fuminisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemsity and significance. *Annual Review Phytopathology*, 31:233–252.
- Nikmaram, H., Kanavi, M. R., Ghoranneviss, M., Balagholi, S., Ahmadi, H., Roshandel, D., a Amini, M. (2018). Cold atmospheric pressure plasma jet for the treatment of *Aspergillus keratitis*. *Clinical Plasma Medicine*, 9:14–18.
- Noots, I., Delcour, J. A., a Michiels, C. W. (1999). From field barley to malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(2):121–153.

- Nucci, M. a Anaissie, E. J. (2009). Hyalohyphomycosis. In Anaissie, E. J., McGinnis, M. R., a Pfaller, M. A., editors, *Clinical mycology (Second Edition)*, pages 309 – 327. Churchill Livingstone, Edinburgh, second edition edition. ISBN 978-1-4160-5680-5.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tackle, B. K., a Casper, H. H. (2000). Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14):7905–7910.
- Oh, Y. A., Roh, S. H., a Min, S. C. (2016). Cold plasma treatments for improvement of the applicability of defatted soybean meal-based edible film in food packaging. *Food Hydrocolloids*, 58:15 –159.
- Ohkawa, H., Akitsu, T., Tsuji, M., Kimura, H., Kogoma, M., a Fukushima, K. (2006). Pulse-modulated, high-frequency plasma sterilization at atmospheric-pressure. *Surface & Coatings Technology*, 200:5829–5835.
- Osborne, L. E. a Stein, J. M. (2007). Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1):103–108. Mycotoxins from the Field to the Table.
- Pankaj, S., Bueno-Ferrer, C., Misra, N., Milosavljević, V., O'Donnell, C., Bourke, P., Keener, K., a Cullen, P. (2014). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35(1):5–17.
- Park, B. J., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, IH.and Lee, M., Han, D., Chung, K., Hyun, S. O., a Park, J. (2007). Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface & Coatings Technology*, 201:5733–5737.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., a McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – A review. *Plant Pathology*, 44(2):207–238.
- Pasquali, F., Stratakos, A. C., Koidis, A., Berardinelli, A., Cevoli, C., Ragni, L., Mancusi, R., Manfreda, G., a Trevisani, M. (2016). Atmospheric cold plasma process for vegetable leaf decontamination: A feasibility study on radicchio (red chicory, *Cichorium intybus* L.). *Food Control*, 60:552–559.
- Pazderů, K., Vepříková, Z., Capouchová, I., Konvalina, P., Prokinová, E., Janovská, D., Škeříková, A., a Honsová, H. (2016). Changes in the content of various *Fusarium* mycotoxins forms in germinating winter wheat and spring barley kernels. *Plant, Soil and Environment*, 62(1):42–46.
- Penkov, O. V., Khadem, M., Lim, W.-S., a Kim, D.-E. (2015). A review of recent applications of atmospheric pressure plasma jets for materials processing. *Journal of Coatings Technology and Research*, 12(2):225–235.
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., a Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93(4):689–703.

- Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Savi, G. D., Carnielli-Queiroz, L., a De Carvalho Fontes, L. (2019). Assessment of toxigenic *Fusarium* species and their mycotoxins in brewing barley grains. *Toxins (Basel)*, 11(1):31.
- Piacentini, K. C., Savi, G. D., Pereira, M. E., a Scussel, V. M. (2015). Fungi and the natural occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Food Chemistry*, 187:204–209.
- Pitt, J. a Samson, R. (1993). Species names in current use in the *Trichocomaceae* (Fungi, Eurotiales). *Regnum Vegetabile*, 128:13–57.
- Pitt, J. I. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talarymyces*. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- Pitt, J. I. (2000). *A laboratory guide to common penicillium species*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, North Ryde, N.S.W., Australia, 3rd edition. ISBN 0643048375.
- Pitt, J. I. (2006). *Penicillium* and related genera. In de W. Blackbur, C., editor, *Food spoilage microorganisms*, pages 437–450. Woodhead Publishing. ISBN 978-1855739666.
- Pitt, J. I. a Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, England, 2nd edition. ISBN 978-0412554605.
- Pitt, J. I., Samson, R. A., a Frisvad, J. C. (2000). List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In Samson, R. A. a Pitt, J. I., editors, *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, pages 9–49. Hardwood Academic Publishers.
- Postulkova, M., Riveros-Galan, D., Cordova-Agiular, K., Zitkova, K., Verachtert, H., Deldinckx, G., Dostalek, P., Ruzicka, M. C., a Branyik, T. (2016). Technological possibilities to prevent and suppress primary gushing of beer. *Trends in Food Science and Technology*, 49:64–73.
- Rada, V. (2009). *Siláž a zdraví zvířat*. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha.
- Rada, V. a Havlík, J. (2012). *Transformace mykotoxinů střevními mikroorganismy*. Vědecký výbor výživy zvířat, Praha.
- Ragni, L., Berardinelli, A., Vannini, L., Montanari, C., Sirri, F., Guerzoni, M. E., a Guarnieri, A. (2010). Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *Journal of Food Engineering*, 100(1):125–132.
- Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., a Rocculi, P. (2015). Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 107:55–65.
- Ramos, B., Miller, F., Brandão, T., Teixeira, P., a Silva, C. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20:1–15.

- Raper, K. B. a Fennell, D. I. (1965). *The genus Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganism and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4):47–56.
- Reichl, J. a Všetická, M. (c2006-2016). Encyklopedie fyziky: Nesamostatný a samostatný výboj. [online]. [cit. 2016-06-09], Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/282-nesamostatny-a-samostatny-vyboj-v-plynu>.
- Revel, I., Belenguer, P., Boeuf, J. P., a Pitchford, L. C. (1999). Modeling nonthermal plasmas generated in glow discharges. *Pure and Applied Chemistry*, 71(10):1837–1844.
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B., a Pestka, J. J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48(1):1–34.
- Sakudo, A., Toyokawa, Y., Misawa, T., a Imanishi, Y. (2017). Degradation and detoxification of aflatoxin B1 using nitrogen gas plasma generated by a static induction thyristor as a pulsed power supply. *Food Control*, 73:619–626.
- Samson, R. a Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49:1–251.
- Samson, R. a Pitt, J. (1986). *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Springer, Boston, MA. ISBN 978-1-4419-3204-4.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., a Filtenorg, O. (2004). *Introduction to food- and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmcultures, Utrecht, Netherlands, 7th edition.
- Samson, R. A., Houbraken, J., a Thrane, U. (2010). *Food and indoor fungi*. CBS KNAW Biodiversity Center, Utrecht, Netherlands.
- Sandoval-Denis, M., Swart, W. J., a Crous, P. W. (2018). New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *Mycologia*, 34:63–92.
- Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R. F., Taniwaki, M. H., a Niessen, L. (2003). Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-Primers based on AFLP. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1):138 – 146.
- Schmiedt, L. (2006). Úvod do fyziky plazmatu. [online]. [cit. 2016-06-09], Dostupné z: <http://atrey.karlin.mff.cuni.cz/~marble/d/?p=0>.
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., a Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*, 33(6):1108–1119.
- Schrödter, R. (2004). Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. *Toxicology Letters*, 153(1):47–49.
- Schwarzer, K. (2009). Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. In *17th Annual ASIAN SEA Feed Technology and Nutrition Workshop*, Hue, Vietnam.

- Sen, Y., Onal-Ulusoy, B., a Mutlu, M. (2019). *Aspergillus* decontamination in hazelnuts: Evaluation of atmospheric and low-pressure plasma technology. In Press. Accepted Manuscript.
- Shokribousjein, Z., Deckers, S. M., Gebruers, K., Lorgouilloux, Y., Baggerman, G., Verachtert, H., Delcour, J. A., Etienne, P., Rock, J.-M., Michiels, C., a Derdelinckx, G. (2011). *Fusarium* profiling and barley malt gushing propensity. *Cerevisia*, 35(4):85–101.
- Somma, S., Petruzzella, A. L., Logrieco, A. F., Meca, G., Cacciola, O. S., a Moretti, A. (2014). Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterisation of their molecular and chemical chemotypes. *Crop & Pasture Science*, 65(1):52–60.
- Song, H. P., Kim, B., Choe, J. H., Jung, S., Moon, S. Y., Choe, W., a Jo, C. (2009). Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26(4):432–436.
- Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*, 232:461–465.
- Speijers, G. J. A. a Speijers, M. H. M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 152(1):91–98.
- Staack, D., Farouk, B., Gutsol, A., a Fridman, A. (2008). DC normal glow discharges in atmospheric pressure atomic and molecular gases. *Plasma Sources Science and Technology*, 17(2):025013.
- Stapelmann, K., Kylián, O., Denis, B., a Rossi, F. (2008). On the application of inductively coupled plasma discharges sustained in Ar/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ternary mixture for sterilization and decontamination of medical instruments. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41(19):192005.
- Štercová, E., Straková, E., Rusníková, L., a Hudečková, P. (2012). Chemická analýza krmiv: Multimediální studijní materiál. [online]. [cit. 2017-20-02], Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvv/chemicka\\_analyza\\_krmiv/metodiky/chemickaanalyza.pdf](https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvv/chemicka_analyza_krmiv/metodiky/chemickaanalyza.pdf).
- Suchý, P. a Herzig, I. (2005). *Plísně a mykotoxiny - prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha.
- Suga, H. a Hyakumachi, M. (2004). Genomics of phytopathogenic *Fusarium*. In Arora, D. K. a Khachatourians, G. G., editors, *Fungal Genomics*, volume 4 of *Applied Mycology and Biotechnology*, pages 161–189. Elsevier.
- Šerá, B., Gajdová, I., Šerý, M., a Špatenka, P. (2013). New physicochemical treatment method of poppy seeds for agriculture and food industries. *Plasma Science and Technology*, 15(9):935–938.
- Šerá, B., Špatenka, P., Šerý, M., Vrchotová, N., a Hrušková, I. (2010). Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 38(10 PART 2):2963–2968.



- Špatenka, P., Endres, H.-J., Krumeich, J., a Cook, R. (1999). Process control of plasma polymerization in a large industrial reactor. *Surface and Coatings Technology*, 116–119:1228–1232.
- Talpa, D. (1.3.2010). Plazmová sterilizace v Nemocnici Havlíčkův Brod. [online]. [cit. 2013-04-04], Dostupné z: <http://www.kr-vysocina.cz/plazmovasterilizace-v-nemocnici-havlickuv-brod/d-4027558/p1=32066>.
- Tappi, S., Berardinelli, A., Ragni, L., Rosa, M. D., Guarnieri, A., a Rocculi, P. (2014). Atmospheric gas plasma treatment of fresh-cut apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21:114–122.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., a Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90(1):135–159.
- Varga, J., Juhász, Á., Kevei, F., a Kozakiewicz, Z. (2004). Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6):627–640.
- Velíšek, J. a Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin II*. Osis, Havlíčkův Brod. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- Věchet, L. (2008). Významné houbové choroby obilnin. *Úroda*, 56(4):37–40.
- Virkajärvi, V., Sarlin, T., a Laitila, A. (2017). *Fusarium* profiling and barley malt gushing propensity. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3):181–192.
- Voet, D. a Voet, J. (1995). *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha. ISBN: 80-85605-44-9.
- Wang, J., Zhuang, H., Hinton, A., J., a Zhang, J. (2016). Influence of in-package cold plasma treatment on microbiological shelf life and appearance of fresh chicken breast fillets. *Food Microbiology*, 60:142–146.
- Weidenborner, M. (2001). *Encyclopedia of food mycotoxins*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. ISBN: 978-3-662-04464-3.
- Wolf-Hall, C. E. (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2):89–94.
- Xu, X. a Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 47:83–103.
- Yang, B., Chen, J., Yu, Q., Li, H., Lin, M., Mustapha, A., Hong, L., a Wang, Y. (2011). Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *Journal of Dentistry*, 39(1):48–56.
- Yoshida, S., Hagiwara, K., Hasebe, T., a Hotta, A. (2013). Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surface and Coatings Technology*, 233:99–107.

- Yoshizawa, T., Yamashita, A., a Luo, Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high - and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5):1626–1629.
- Yun, H., Kim, B., Jung, S., Kruk, Z. A., Kim, D. B., Choe, W., a Jo, C. (2010). Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminum foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food Control*, 21(8):1182–1186.
- Zahoranová, A., Henselová, M., Hudecová, D., Kaliňáková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., a Černák, M. (2016). Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedling vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36(2):397–414.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2):129–144.
- Zeman, L., Doležal, P., a Horký, P. (2015). Mykotoxiny u prasat. In *Krmivářství*, volume 3, pages 13–15. Profi Press s. r. o., Praha.
- Zhang, N., Hu, K., a Shan, B. (2014). Ballast water treatment using UV/TiO<sub>2</sub> advanced oxidation processes: An approach to invasive species prevention. *Chemical Engineering Journal*, 243:7–13.

# Seznam zkratek

<b>APFBP</b>	Atmospheric Pressure Fluidized Bed Plasma	Plazmový systém fluidního lože za atmosférickém tlaku
<b>Ash</b>		Popeloviny
<b>BNLV</b>		bezdušikáté látky výtahkové
<b>CF</b>	Crude fiber	Hrubá vláknina
<b>CP</b>	Crude proteins	Dusíkaté látky
<b>DON</b>		Deoxynivalenol
<b>D3G</b>		Deoxynivalenol-3-Glukosid Deoxynivalenol-3- $\beta$ -D-glukopyranosid
<b>DM</b>	Dry matter	Sušina
<b>EE</b>	Ether extract	Tuk
<b>FAO</b>		Organizace pro výživu a zemědělství
<b>GA</b>	Gliding Arc	Klouzavý výboj
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>MS/MS</b>	Tandem Mass Spectrometry	Tandemová hmotnostní spektrometrie
<b>OTA</b>		Ochratoxin A
<b>PP</b>		Polypropylen
<b>PTFE</b>		Polytetrafluorethylen
<b>PVC</b>		Polyvinylchlorid
<b>SOH</b>		Stravitelnost organické hmoty
<b>UV</b>	Ultraviolet	Ultrafialové
<b>ZON</b>		Zearalenon

# Seznam tabulek

1.1	Maximální limity mykotoxinů v obilovinách dle Úř. věšt. L 364 . . . . .	22
1.2	Limitní hodnoty koncentrace mykotoxinů v krmivech . . . . .	23
1.3	Vliv příjmu mykotoxinů na zdravotní stav prasat . . . . .	25
3.1	Vybrané parametry experimentálního zařízení . . . . .	45
3.2	Orientační spotřeba krmiv u vybraných druhů zvířat . . . . .	47
4.1	Příkon napájecího zdroje v závislosti na průtoku pracovního plynu . . . . .	60
4.2	Vypočtené výkony plazmové trysky při různých parametrech výboje . . . . .	62
4.3	Parametry ošetření vzorku . . . . .	68
4.4	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> po 24 hodinách po vystavení plazmatu a maximální teplota pracovního plynu . . . . .	72
4.5	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> po vystavení UV záření a maximální teplota pracovního plynu . . . . .	74
4.6	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> po vystavení horkému vzduchu [%] . . . . .	75
4.7	Klíčivost a počet spor houby <i>T. virens</i> na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu . . . . .	76
4.8	Koncentrace a úbytek DON na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu . . . . .	81
4.9	Koncentrace a úbytek D3G na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu . . . . .	82
4.10	Tepelná stabilita DON o původní koncentraci 1 000 ng · ml <sup>-1</sup> . . . . .	83
4.11	Koncentrace mykotoxinů v ječmeni a pšenici po vystavení plazmatu . . . . .	84
4.12	Koncentrace mykotoxinů ve sladu po vystavení plazmatu . . . . .	86
4.13	Koncentrace mykotoxinů v gushingovém sladu po ošetření plazmatem . . . . .	88
4.14	Parametry systému se šnekovým dopravníkem . . . . .	93
4.15	Parametry pásového dopravníku . . . . .	95
4.16	Procesní parametry . . . . .	96
4.17	Ekonomické zhodnocení systému s pásovým dopravníkem . . . . .	97

# Seznam obrázků

1.1	Struktura Aflatoxinu $B_1$ (vlevo) a Aflatoxinu $B_2$ (vpravo)	18
1.2	Struktura Deoxynivalenolu	19
1.3	Struktura Zearalenonu	19
1.4	Struktura Ochratoxinu A	20
1.5	Struktura T-2 toxinu	20
1.6	Struktura Fumonisinu B1	21
1.7	Faktory ovlivňující napadení zemědělských plodin houbovými patogeny	26
1.8	Skupenství hmoty	29
1.9	Princip generování plazmatu	30
1.10	Možnosti interakce plazmatu s bakteriemi na povrchu těles	31
1.11	Voltampérová charakteristika ideálního plazmového výboje (zelená – ne-samostatný výboj; červená – samostatný výboj)	32
1.12	Schéma plazmové trysky typu Gliding Arc	35
1.13	Příklady tvarů divergentních elektrod	36
1.14	Fáze vývoje GA výboje	36
3.1	Systém pro generování plazmového výboje typu Gliding Arc	43
3.2	Fotografie plazmové hlavice	44
3.3	Míchací zařízení	45
3.4	Vizualizace jednotlivých složek krmiv	48
3.5	Příprava vzorku na extrakci mykotoxinů	57
4.1	Průběh elektrického napětí a proudu na elektrodách plazmové trysky (50 ms; 30 SCFH)	61
4.2	Výkon počítaný z dat zpracovaný 15 bodovým filtrem	62
4.3	Výkon počítaný z dat zpracovaný 5 bodovým filtrem	62
4.4	Umístění teplotní sondy	63
4.5	Závislost teploty pracovního plynu na jeho průtoku pro různé vzdálenosti od plazmové trysky	64
4.6	Závislost teploty pracovního plynu na vzdálenosti od plazmové hlavice pro různé průtoky	64
4.7	Závislost teploty výboje na vzdálenosti od plazmové hlavice $d$ a průtoku pracovního plynu $Q$	64
4.8	Vzhled plazmového výboje v různých pracovních režimech (f/8; 1/80 sec.; ISO 800; -1EV)	65
4.9	Porovnání vzhledu plazmového výboje při použití elektrod různých tvarů a vyrobených z různých materiálů (f/2.8; 1/35 sec; ISO 124)	66
4.10	Spektrální charakteristika výboje Gliding Arc	67

4.11	Teplota uvnitř míchacího zařízení v závislosti na době ošetření . . . . .	68
4.12	Poměr obsahu sušiny a vody ve vzorcích . . . . .	69
4.13	Koncentrace vybraných složek krmiva ve vzorcích . . . . .	70
4.14	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> po 24 hodinách po vystavení plazmatu . . .	71
4.15	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> po vystavení UV záření . . . . .	73
4.16	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> po vystavení teplému vzduchu . . . . .	75
4.17	Počet spor houby <i>T. virens</i> na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu	77
4.18	Klíčivost spor houby <i>T. virens</i> na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu . . . . .	77
4.19	Porovnání vlivu jednotlivých složek plazmatu na klíčivost spor houby <i>T. virens</i> . . . . .	78
4.20	Koncentrace čistého DON na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu . . . . .	81
4.21	Koncentrace čistého D3G na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu	82
4.22	Tepelná stabilita DON o původní koncentraci 1 000 ng · ml <sup>-1</sup> . . . . .	83
4.23	Obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici . . . . .	85
4.24	Obsah mykotoxinů v pšeničném a ječném sladu . . . . .	87
4.25	Koncentrace mykotoxinů po vystavení plazmatu . . . . .	89
4.26	Systém se šnekovým dopravníkem . . . . .	92
4.27	Výroba železného žlabu . . . . .	92
4.28	Technický výkres šroubovice . . . . .	92
4.29	Celkový pohled na zařízení . . . . .	93
4.30	Pásový dopravník s dávkovačem a podavačem . . . . .	94
4.31	Nákres pásového dopravníku . . . . .	95
4.32	Dávkovací zařízení . . . . .	96

# Seznam vlastních publikovaných prací

## Články v impaktovaných časopisech

1. Bartoš, P., Dolan, A., Smutný, L., Šístková, M., Celjak, I., Šoch, M. a **Havelka, Z.** (2016). Effects of phytogetic feed additives on growth performance and on ammonia and greenhouse gases emissions in growing-finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 212:143–148.
2. Váchalová, R., Maroušek, J., Kolář, L., Peterka, J., Kopecký, M., **Havelka, Z.**, Pártlová, P. a Váchal, J. (2017). Nitrates in beetroot and sodium fertilization. *Sugar and Sugar Beet Journal*, 133(12):386–388.
3. Strejčková, M., Bohatá, A., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Kříž, P., Beran, P., Bartoš, P., Čurn, V., Špatenka, P. (2018). Enhancement of the Yield of Crops by Plasma and Using of Entomopathogenic and Mycoparasitic Fungi: From Laboratory to Large-Field Experiments. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 8(6):829–836.

## Články v recenzovaných časopisech

1. Kříž, P., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Horáková, M., Bartoš, P., Vazdová, P. a Krishna, S. B. (2014). Seed Treatment and Water Purification by the Synergical Effect of Gliding Arc Plasma and Photocatalytic Film. In *International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM 2014*, Brasov, Romania, s. 1042–1046. ISBN 978-1-4799-5183-3.
2. Bartoš, P., Ptáčník, J., Kříž, P., Špatenka, P., **Havelka, Z.**, Olšan, P. a Veselý, B. (2014). Plasma Jet for Environmental Applications: Computational Study of the Electric Field Distribution between Electrodes. In *International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment, OPTIM 2014*, Brasov, Romania, s. 999–1004. ISBN 978-1-4799-5183-3.
3. Kříž P., Bartoš P., **Havelka Z.**, Kadlec J., Olšan P., Špatenka P., Dienstbier M. (2015). Influence of Plasma Treatment in Open Air on Mycotoxin Content and Grain Nutriments, *Special Issue on Plasma Systems for Biological/Medical Applications, Plasma Medicine*, 5(2-4):145–158.
4. Strejčková M., Bohatá A., Čurn V., Bartoš P., Olšan P., **Havelka Z.**, Kříž P. a Špatenka P. (2015). Vliv fyzikálního a biologického ošetření osiva na vývoj porostu a na zdravotní stav modelových plodin. *Úroda 12*, roč. LXIII, vědecká příloha, s. 61–64.

5. Strejčková, M., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Bohatá, A., Kříž, P., Bartoš, P., Čurn, V. a Špatenka, P. (2016). Vliv fyzikálního a biologického ošetření osiva ječmene jarního na výnos zrna. *Úroda 12*, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 45–51.
6. Bartoš, P., Ptáčník, J., Kříž, P., Špatenka, P., **Havelka, Z.**, Olšan, P. a Veselý, B. (2016). Distribution of electric field between electrodes in plasma jet: Computational study. *Journal of Electric Engineering*, 16(1):99–106.
7. Beran, P., Zemanová, M., Kříž, P., Stehlíková, D., Olšan, P., **Havelka, Z.** a Čurn, V. (2016). Vliv nízkoteplotního plazmatu na životaschopnost fytopatogenních bakterií. *Úroda 12*, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 129–132.
8. Vernerová, K., Jelínková, I., Čurn, V., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Bartoš, P. a Špatenka, P. (2016). Změna povrchové struktury semen řepky po ošetření nízkoteplotním plazmatem. *Úroda 12*, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 189–192.
9. Konopická, J., Bohatá, A., Vondruška, J., Kročárková, J., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Bartoš, P., Kříž, P., Čurn V. a Špatenka P. (2016). Navýšení účinnosti entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na vybrané druhy hostitelů. *Úroda 12*, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 245–248.
10. Celjak, I., Kuneš, R., **Havelka, Z.**, Bartoš, P. a Šístková, M. (2016). Problematika velkochovů drůbeže jako zdrojů pachových látek, *Náš chov 10*, roč. LXXVI, s. 80–82.
11. Celjak, I., Kuneš, R., Šístková, M. a **Havelka, Z.** (2016). Problematika emisí prachových látek z velkochovů drůbeže, *Náš chov 12*, roč. LXXVI, s. 42–43.
12. Celjak I., Filip M., Zoubek T. a **Havelka Z.** (2017). Ověření vybraných parametrů souprav techniky určených pro minimalizaci. *Mechanizace 4*, roč. LXVII., s. 24–28.
13. Kuneš, R., Bartoš, P., Celjak, I., **Havelka, Z.**, Šístková, M. a Šoch, M. (2017). Technology for Intensive Poultry Production as a Source of Odour Emissions with Time-Varying Intensity. *Acta Technologica Agriculturae*, 4:91–95.
14. Kriz P., Olsan P., **Havelka Z.**, Bartos P., Bohata A., Strejckova M., Curn V. a Spatenka P. (2017) Enhancement of the yield of rape seeds by plasma discharge and biological protection: Field experiments. In *2017 International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM) 2017 Intl Aegean Conference on Electrical Machines and Power Electronics (ACEMP)*, s. 1045–1050.
15. Bohatá A., Tichá E., Konopická J., Strejčková M., Olšan P., **Havelka Z.**, Kříž P., Bartoš P., Čurn V. a Špatenka P. (2017). Vliv biologického ošetření osiva ječmene jarního na klíčení obilky a mortalitu larev *Tenebrio molitor* po vysetí osiva do substrátu. *Úroda 12*, roč. LXV, vědecká příloha, s. 283–286.
16. **Havelka Z.**, Olšan P., Strejčková M., Bohatá A., Kříž P., Bartoš P., Čurn V., Špatenka P. a Konopická J. (2017). Vliv plazmatu na klíčivost modelové houby *Trichoderma virens*. *Úroda 12*, roč. LXV, vědecká příloha, s. 291–294.



17. Bartoš, P., Kříž, P., **Havelka, Z.**, Bohatá, A., Olšan, P., Špatenka, P., Čurn, V., a Dientsbier, M. (2017). Plasma Technology in Food Industry: mini-review. *Kvasný průmysl*, 63(3):134–138.
18. Běláková, S., **Havelka, Z.**, Bohatá, A., Hartman, I., Kábelová, H., Kříž, P., Dientsbier, M., Bartoš, P. a Špatenka, P. (2018). The effect of treatment of barley grain and malt with low-temperature plasma discharge on the malt gushing potential. *Kvasný průmysl*, 64(6):314–317.
19. Čurn, V., Bohatá, A., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Strejčková, M., Kříž, P., Bartoš, P., Špatenka, P. a Beran, J. (2018). Nechemické metody ošetření osiva - využití nízkoteplotního plazmatu a biologického ošetření osiva u řepky ozimé. *Agromanuál*, 14(6):30–32.
20. Březinová, M., **Havelka, Z.**, a Bartoš, P. (2019). Marketing communication in beer industry in the Czech Republic with respect to minibreweries. *Kvasný průmysl*, 65(1):6–12.

## Články ve sborníku

1. Vazdová, P., **Havelka, Z.**, Kříž, P., Lád, F., Špatenka, P., Pejchová, K., Petrášková, E., Návara, D. a Ingvortová, M. (2013). Vliv nízkoteplotního plazmatického výboje na nutriční hodnoty zrnin. In *Konference s mezinárodní účastí o bezpečnosti a produkční účinnosti krmiv: Sborník přednášek z konference* Brno: Tribun EU s.r.o, s. 209–212. ISBN 978 80 263-0365-7.
2. Vazdová, P., Lád, F., Kříž, P., **Havelka, Z.** a Pejchová, K. (2013). Monitoring of Changes in Nutritional Value of Grains After Treatment With Low-temperature Plasma Discharge. In *NutriNET*. Nitra: Slovak Agricultural University, s. 163–167. ISBN 978-80-552-1065-0.
3. Vazdová, P., Pejchová, K., Lád, F., Ingvortová, M., Petrášková, E., **Havelka, Z.**, Kříž, P., Volfová, K. a Novotná, M. (2014). Effect of Low-Temperature Plasma Discharge on the Protein Composition of Grains. In *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky XI*. Košice: Lazarove dni výživy a veterinárnej dietetiky XI, s. 32–35. ISBN 978-80-8077-408-0.
4. Olšan, P., Kříž, P., **Havelka, Z.**, Bohatá, A., Strejčková, M., Bartoš, P. a Špatenka, P. (2015). Rape Treatment by the Low Pressure Microwave Plasma Discharge and Gliding Arc Plasma, In *Book of Contributed Papers: 20th Symposium on Application of Plasma Processes and COST TD1208 Workshop on Application of Gaseous Plasma with Liquids*, Tatranská Lomnica, Slovakia. ISBN 978-80-8147-027-1.
5. **Havelka, Z.**, Olšan, P., Kříž, P., Bohatá, A., Strejčková, M., Bartoš, P. a Špatenka P. (2015). Rapeseed Treatment by the Low Temperature Plasmas. In *Sborník mezinárodní vědecké konference Technoforum 2015 New Trends in Mechanics and Technologies for Biosystems*, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Technická fakulta, Katedra strojov a výrobných systémov, Ráčkova dolina, s. 93–98. ISBN 978 80-552-1326-2.

6. Šístková, M., Pšenka, M., Bartoš, P., **Havelka, Z.**, Celjak, I. a Mihina, I. (2015). Hlukové aspekty robotického dojenia. In *Sborník mezinárodní vědecké konference Technoforum 2015 New Trends in Mechanics and Technologies for Biosystems*, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Technická fakulta, Katedra strojov a výrobných systémov, Ráčkova dolina, s. 240–245. ISBN 978 80-552-1326-2.
7. Vazdová, P., Kafková, M., Pejchová K., Ingvortová M., Novotná, B., **Havelka, Z.** a Lád, F.(2015). Vliv aplikace nízkoteplotního plazmatického výboje na vybrané druhy plísni. In *Zootechnika 2015: sborník z konference mladých vědeckých pracovníků*. České Budějovice: Zootechnika 2015, s. 131–136. ISBN 978-80-7394-518-3.
8. Benešová, K., Běláková, S., Hartman, I., Cibulcová, P., Bartoš, P., Kříž, P., Kábelová, H., **Havelka, Z.** a Bohatá, A. (2016) Determination of vitamin E content in barely and malt after treatment with low-temperature plasma discharge. In *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2016*, Olomouc, Česká republika, s. 75–76. ISBN 978-80-244-4961-6.
9. Benešová, K., Běláková, S., Hartman, I., Dienstbier, M., Špatenka, P., Bartoš, P., Kábelová, H., **Havelka, Z.** a Bohatá, A. (2016). Vliv fyzikálního ošetření pomocí nízkoteplotního plazmatu na obsah mykotoxinů v zrně ječmene a ve sladu. In *5. konference české společnosti pro hmotnostní spektrometrii*, České Budějovice, Česká republika, s. 50. ISBN 978-80-905045-6-1.
10. Kříž, P., Bohatá, A., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Strejčková, M., Bartoš, P. a Špatenka, P. (2019). The effect of low-temperature plasma treatment of seeds of selected crops on germination and its biological activity in early growth. In *SAPP XXII: Book of Contributed Papers*, Štrbské Pleso, Slovakia, 18-24. January, pp. 357-362.

## Patenty

1. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Způsob ošetření semen plazmatem a kmenem houby *Trichoderma virens* TVI-601-TACR. Původci: Bohatá A., Olšan P., **Havelka Z.**, Bartoš P., Kříž, P., Čurn, Špatenka P. Česká republika. Patent 307159, 27.12.2017.

## Funkční vzorky

1. Olšan, P., **Havelka, Z.**, Bartoš, P., Kříž, P., Bohatá, A., Strejčková, M., Špatenka, P., Dienstbier, M, Hartman, I. a Čurn V. (2016). *Laboratorní zařízení k ošetření semen a sladu plazmatem - "funkční vzorek"*, výsledek projektu TAČR TA04021252.
2. Olšan, P., **Havelka, Z.**, Bartoš, P., Kříž, P., Bohatá, A., Strejčková, M., Špatenka, P., Dienstbier, M, Hartman, I. a Čurn, V. (2017). *Laboratorní linka pro ošetření semen fyzikální cestou s následným nanesením biopreparátů - "funkční vzorek"*, výsledek projektu TAČR TA04021252.

## Metodiky

1. Bohatá, A., Bartoš, P., Konopická, J., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Strejčková, M., Kříž, P., Čurn, V. a Špatenka, P. (2016). *Metodika pro nanášení vybraných druhů entomopatogenních a mykoparazitických hub na semena*, výsledek projektu TAČR TA04021252.

## Užité vzory

1. Kříž, P., Olšan, P., **Havelka, Z.**, Bartoš, P., Bohatá, A., Špatenka, P., Dienstbier, M. a Hartman, I. (2017) Equipment for grain processing using low-temperature plasma discharge, výsledek projektu TAČR TE02000177.

## Další výsledky

1. Bartoš P., Celjak I., Dolan A., **Havelka Z.** a Kuneš R. (2017). *Emise amoniaku a zápachu z intenzivních chovů drůbeže a prasat ve vztahu k Závěrům o BAT*. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 64 s. ISBN 978-80-7434-397-1.