

# Vědecký výbor výživy zvířat

## PLÍSNĚ A MYKOTOXINY, PREVENCE JEJICH VZNIKU A DEKONTAMINACE V KRMIVECH

**Prof. MVDr. Ing. Pavel Suchý, CSc.**  
**Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc.**

Praha, duben 2005



**Výzkumný ústav živočišné výroby**  
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,  
PSČ: 104 01, [www.vuzv.cz](http://www.vuzv.cz)

## Obsah

	Str.
1. Úvod	3
2. Infekce zrnin a dalších krmných plodin plísněmi	3
3. Tvorba a charakteristika mykotoxinů	4
4. Vliv mykotoxinů na zdraví zvířat, produkci a kvalitu potravin	6
5. Nejdůležitější mykotoxiny	7
5.1 Aflatoxiny	7
5.2 Kyselina cyklopiazionová	8
5.3 Ochratoxiny	9
5.4 Patulin	10
5.5 Gliotoxin	10
5.6 Citrinin	10
5.7 Fusariové mykotoxiny – Trichotheceny	11
5.7.1 <i>Deoxynivalenol (DON, syn. vomitoxin)</i>	11
5.7.2 <i>Zearalenon (F-2 toxin)</i>	12
5.7.3 <i>Fumonisin</i>	13
5.7.4 <i>T-2 toxin</i>	14
5.7.5 <i>Kyselina fusarová</i>	14
5.8 Kyselina penicilová	14
5.9 Stachybotryotoxiny (atratoxiny)	15
5.10 Sporidesmin	15
5.11 Paličkovice nachová	15
5.12 Sněti	16
6. Prevence vzniku mykotoxinů	16
7. Dekontaminace mykotoxinů v krmivech	18
8. Vzorkování krmiv pro analýzy	21
9. Doporučená literatura	22
10. Tabulky I.- V.	23-25

# PLÍSNĚ A MYKOTOXINY

## PREVENCE JEJICH VZNIKU A DEKONTAMINACE V KRMIVECH

Prof. MVDr. Ing. Pavel Suchý, CSc.

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc.

### 1. Úvod

Z pohledu ochrany zdraví spotřebitele se v současnosti stává prioritou zajištění zdravotní nezávadnosti potravin. Bezpečnost potravního řetězce je ovlivňována řadou faktorů. Významně se zde uplatňují biotechnologie výroby zemědělských produktů, zvláště pak oblast výroby krmiv a jejich zdravotní a hygienická nezávadnost.

Závažné riziko pro kvalitu krmiv, užitkovost zvířat a jejich zdraví, ale i pro bezpečnost potravin a zdraví lidí představují plísně a mykotoxiny (Miller a Trenholm, 1994). Food and Agriculture Organisation odhaduje, že 25 % světových zásob zrnin je ročně kontaminováno mykotoxiny (Mannion a Johnson, 1985; Pasteiner, 1997) a dá se předpokládat, že ještě větší množství může být kontaminováno mykotoxiny dosud neidentifikovanými. Ekonomické ztráty v chovech hospodářských zvířat způsobené kontaminací krmiv mykotoxiny se odhadují na miliony dolarů (Jones aj., 1994).

### 2. Infekce zrnin a dalších krmných plodin plísněmi

Plísně (houby) jsou pravidelnou součástí půdní biocenózy a plní nezbytnou úlohu v recyklaci živin z rozkládajícího se biologického materiálu. Nepříznivé počasí a nevhodné podmínky ošetřování umožní životaschopným sporům plísní klíčení, růst a pomnožení v krmivech přímo na poli. Rozmnožují se sporama, které se v prostředí šíří větrem a hmyzem a mohou napadat rostliny během jejich růstu.

Plísně kontaminují zrniny a krmné plodiny v průběhu celého výrobního procesu, tj. pěstování, sklizně, transportu a zejména pak při skladování a konzervaci. Lze rozlišit tři skupiny plísní: *plísně polní* (rod *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporidium*, *Diplodia*, *Giberella* a další), které jsou přítomny v zrnu již před sklizní obilovin, *plísně skladištní* (rod *Aspergillus*, *Penicillium*), které mohou produkovat mykotoxiny v podmínkách skladování a *polní i skladištní plísně* (rod *Penicillium*).

Větretem roznášené spory mohou infikovat rostliny během jejich růstu, např. plísně rodu *Fusarium* napadají zárodečné tkáně semen rostlin. Poškození perikarpu, povrchové vrstvy obalu semen, např. kukuřice a dalších krmiv, způsobené hmyzem, stresem, příp. dalšími faktory (teplota, vlhkost, vegetační stadium a další) mohou usnadnit napadení plísněmi a tvorbu mykotoxinů. Jakmile se vytvoří vhodné podmínky pro klíčení jejich spor, dochází k růstu a množení plísně. Po počáteční infekci plísní omezuje tvorbu mykotoxinů nízký obsah vody a sacharidů v rostlině.

Jakmile plísně kolonizují krmiva, začnou využívat jejich živiny pro svůj metabolismus a rozmnožování a snižují jejich obsah. Výrazně kontaminovaná kukuřice může po zaplísnění ztratit až 10 % metabolizovatelné energie a 5 % bílkovin. Zhoršení nutriční hodnoty krmiv je

dáno i poklesem esenciálních aminokyselin v zaplísněných krmivech (lysinu, cysteinu a argininu). Metabolická činnost hub je v krmivech spojena s aerobním dýcháním, při kterém se spotřebovávají významné živiny, především tuky a sacharidy. Bartov (1985) uvádí, že po 50 dnech skladování se snížil obsah tuku u kontaminované kukuřice o 52 až 57 %. Tím dochází i k výraznému snížení energické složky krmiva.

Kontaminace krmiv plísněmi je v některých geografických oblastech velmi vysoká:  
u objemných krmiv i přes 90 %,  
u jaderných krmiv určených pro výživu telat a prasat do 90 %,  
u jaderných krmiv pro drůbež až 100 %.

Na přítomnost plísní a mykotoxinů v krmivech nás mohou upozornit již některé sensorické změny, jako charakteristický zápach, barva nebo morfologické změny na semenech a plodech. Plísňové metabolity výrazně snižují i chutnost krmiva.

Plísně rostou na značném množství zemědělských komodit, zahrnující obiloviny, luskoviny, olejniny, ovoce, zeleninu a řadu dalších plodin.

Intenzivní výzkum plísní a mykotoxinů započal až v roce 1960, kdy ve Velké Británii uhynulo přes 100 tisíc kuřat po zkrmování podzemnicového šrotu. Jako patologické agens byl stanoven aflatoxin, produkt plísně *Aspergillus flavus*.

### **3. Tvorba a charakteristika mykotoxinů**

Vzhledem k rychlému růstu plísní a spotřebě využitelných živin substrátu, dochází ke dvěma jevům:

- a) ke tvorbě nových spor umožňujících rozmnožování jednotlivých druhů plísní. Sporulace vytváří ohromné populace reprodukčních struktur, které mohou iniciovat infekci a růst plísní v krmivech,
- b) k rozvoji různých biochemických procesů společně nazývaných „sekundární metabolismus“.

Výsledkem sekundárního metabolismu je produkce určitých nízkomolekulárních sloučenin - mykotoxinů, z nichž některé se ukázaly být toxické pro zvířata a lidi. Termín „mykotoxin“ je odvozený z řeckého slova „mykes“, což znamená houba a slova „toxicum“ označující jed.

Mykotoxiny představují vysoce stabilní toxické nízkomolekulární látky. Producenti mykotoxinů jsou živé rostoucí houby v krmivech. Jsou to vláknité sporulující houby produkující sekundární metabolity – mykotoxiny. Část vyprodukovaného mykotoxinu zůstává v mycéliu, větší část penetruje do substrátu. V substrátu mohou mykotoxiny dlouho perzistovat, i když houby zde již nejsou zachyceny.

Mykotoxiny jsou jednou z nejvýznamnějších skupin antinutričních látek, které nacházíme v krmivech. Reprezentují nejrozumnější chemické látky s molekulovou hmotností většinou v rozmezí od 200 do 500. Z hlediska zdravotně-hygienického je možno mykotoxiny pokládat za nejzávažnější látky v krmivech. V současné době je kontaminace krmivářských komodit plísněmi a mykotoxiny považována za jeden z nejdůležitějších negativních faktorů v produkci kulturních plodin a kvalitě krmiv určených pro výživu zvířat.

Je známo více než 300 druhů mykotoxinů produkovaných asi 350 druhy toxikogenních plísní. Různé druhy plísní mohou produkovat více než jeden druh mykotoxinu a naopak jeden typ mykotoxinu může být produkován více druhy plísní. Většina mykotoxinů není ovlivněna běžným technologickým zpracováním při výrobě krmiv. Za vysoce stabilní z tohoto pohledu lze pokládat aflatoxiny, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenon, fumonisiny a další.

Produkce mykotoxinů je ovlivněna řadou faktorů. Mezi faktory *biotické* zařazujeme přítomnost jednoho, resp. více druhů toxikogenních plísní, což může vést k synergickým i antagonistickým vztahům. Synergické efekty byly zaznamenány mezi deoxynivalenolem (DON) a kyselinou fusarovou; DON a fumonisinem B-1 (FB1); diacetyloxyscirpenolem (DAS) a mykotoxiny plísní rodu *Aspergillus*. V poslední době se objevily zprávy o synergismu mezi FB1 a DON nebo T-2 toxinem (D'Mello et al., 1999). Aditivní a synergické účinky mezi známými a neidentifikovanými mykotoxiny mohou objasnit zvýšení nepříznivých účinků pozorovaných po krmení diety kontaminované Fusarií. Některé druhy plísní mohou degradovat toxiny jiného druhu (citrinin).

Složení substrátu (krmiva) je nejvýznamnějším faktorem mající vliv na produkci mykotoxinu (vysoký obsah tuků a sacharidů). Nejčastějšími přenašeči spor plísní jsou zejména roztoči a různé druhy hmyzu, především jde o skladištní škůdce. Pro její aktivitu je důležitá zejména teplota, pod 18 °C se bezobratlí nevyvíjejí.

Mezi faktory *abiotické* patří vlhkost substrátu (min. 14 %), relativní vlhkost vzduchu (min. 65 %), teplota substrátu a vnějšího prostředí. Nejdůležitější je tzv. vodní aktivita ( $A_w$ ). Je to poměr tlaku vodní páry nad potravinou nebo krmivem a tlaku nad vodou za dané teploty. Jde o vodu, která není vázaná na molekuly rozpuštěných látek a je využitelná mikroorganismy. Plísně rostou při  $A_w$  0,75 a jejich rozvoj ustává při  $A_w$  pod 0,65. Pro produkci mykotoxinu u většiny plísní je vhodné rozmezí 15 až 30 °C s optimem 25 °C. Plísně a zejména jejich spory přežívají i při extrémně nízkých i vysokých teplotách. Důležitý je obsah kyslíku ( $O_2$ ) v prostředí. Pokles koncentrace  $O_2$  pod 1 % vede k útlumu produkce mykotoxinů (aflatoxin). Výjimkou je plíseň *Fusarium verticillioides*, která je schopna růst v prostředí s obsahem až 60 %  $CO_2$ . Obecně lze konstatovat, že plísním vyhovuje spíše kyselé, než zásadité prostředí.

Tvorba mykotoxinů závisí na řadě faktorů jako jsou vlhkost, teplota, pH, přítomnost kyslíku v době růstu hub na substrátu, poškození celistvosti zrna způsobené mechanicky nebo hmyzem, teplotním poškozením a kvalitou houbového inokula stejně jako interakcí nebo kompeticí (konkurencí) mezi liniemi hub (Mallmann, 1998). V teplejších klimatických podmínkách se vyskytují častěji aflatoxiny a fumonisiny, v oblastech chladnějších s vysokou vlhkostí představují větší nebezpečí ochratoxiny, zearalenon, deoxynivalenol (DON- vomitoxin), T-2 toxin, diacetoxyscirpenol (DAS) a další (Devegowda a Gati, 2000).

Mezi faktory, které se podílí na šíření plísní a tvorbě mykotoxinů zařazuje Harris (1997) vyšší teplotu, vydatné deště během sklizně, hustotu rostlinného porostu, mechanickou sklizeň, vegetační stadium, sucho, rostlinnou varietu, strukturu půdy, mráz.

#### **4. Vliv mykotoxinů na zdraví zvířat, produkci a kvalitu potravin**

Přesto, že každý druh mykotoxinu má svá specifika, lze uvést, že u řady mykotoxinů kontaminující krmiva pozorujeme společné negativní vlivy, vedoucí u hospodářských zvířat

ke snížení přírůstků, poklesu mléčné a masné užitkovosti, snášky (malá vejce, slabá skořápka), konverze krmiva apod.

Mykotoxiny mohou u zvířat a člověka vyvolat řadu změn:

- vyvolávají patologické změny na orgánech (játra, ledviny, CNS, hemopoesa),
- vyvolávají sníženou plodnost (estrogenní syndrom – mykotické zmetání),
- vedou k alergickým reakcím,
- způsobují oslabení imunitního systému, klesá odolnost organismu vůči infekčním onemocněním, prokázána byla snížená aktivita T nebo B lymfocytů a potlačení produkce protilátek (koncentrace i účinnost) jako jsou imunoglobuliny (snížená účinnost vakcinace i terapeutický účinek léčiv). Imunosupresivní účinky se u jednotlivých mykotoxinů (aflatoxin, vomitoxin, T-2 toxin, ochratoxin, fumonisiny) značně liší a i mechanismus jejich působení na imunitní systém je rozdílný podle druhu mykotoxinu,
- způsobují změnu v membránových strukturách buněk a peroxidaci polynenasycených kyselin uvnitř těchto membrán,
- mají mutagenní, kancerogenní, teratogenní účinky,
- hromadí se a vylučují v produktech, často v metabolicky a toxikologicky aktivnějších formách a tím ohrožují zdraví člověka.

Určitým diagnostickým problémem je, že při mykotoxikózách jsou klinické příznaky málo specifické. Navíc často jsou průvodní symptomy onemocnění mykotoxiny překryté následnými sekundárně vzniklými chorobami.

Působení na zvířata je dáno:

- druhem mykotoxinu,
- přijatou dávkou mykotoxinu (chronická nebo akutní mykotoxikóza),
- přítomností více druhů mykotoxinů (výrazné zvýšení toxicity, např. kyselina penicilová a citrinin, směs trichothecenových mykotoxinů),
- délkou zkrmování,
- druhem zvířete, rozdílná je citlivost jednotlivých druhů, ale i kategorií zvířat,
- pohlavím, různá citlivost samců a samic, estrogenní aktivita,
- výživným stavem, podvyživená zvířata jsou citlivější,
- fyziologickým stavem - vyčerpání, gravidita,
- patologickým stavem (nemoc).

U zvířat i člověka mohou mykotoxiny vyvolat intoxikace s akutním nebo chronickým průběhem. *Akutní primární mykotoxikózy* jsou vyvolány příjmem vysokých dávek. Vyvolávají destrukci jater (degenerace), ledvin, poškození oběhového systému a CNS. Uplatňuje se hepatotoxický účinek (tuková degenerace hepatocytů, nekrózy, cirhóza).

*Chronický průběh* je vyvolán dlouhodobým příjmem nízkých dávek. Projevuje se teratogenními, mutagenními a kancerogenními účinky, poškozením centra krvetvorby (krváčení, snížená srážlivost, změny v kostní dřeni), narušením imunogeneze (zvýšená náchylnost k infekčním chorobám) a snížením užitkovosti zvířat.

V této souvislosti je třeba si uvědomit, že existují i obranné mechanismy. Tyto jsou dány detoxikační funkcí probíhající v játrech. Při detoxikační činnosti, např. u aflatoxinů, se

uplatňují oxidoredukční reakce založené na využití glutathionu, který je částečně tvořen methioninem a cysteinem. Účinkem aflatoxinu tedy dochází k vyčerpání metabolické hladiny methioninu, což má za následek negativní dopad na zdraví a užitkovost zvířat. Zlepšení stavu lze ovlivnit vyšším přísunem methioninu.

Významnější riziko z hlediska bezpečnosti potravin představují vegetabilní potraviny než potraviny animální provenience. Je to dáno především tím, že z krmiv je resorbována jen část vyprodukovaných mykotoxinů, navíc v průběhu trávení a v průběhu metabolických procesů v organismu zvířat je část mykotoxinů inaktivována.

## 5. Nejdůležitější mykotoxiny

### 5.1 *Aflatoxiny*

Producenti: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*.

Živný substrát: zrniny (obilniny), sója, hrách, bob, proso, ořechy, podzemnice.

Podmínky produkce mykotoxinů: teplota 12 – 37 °C optimum 28 °C, pH 2,5 – 6,0, vlhkost nad 14 %, (pod 12 % vlhkosti substrátu se produkce mykotoxinu zastavuje), doba růstu 3 – 15 dní.

Mezi nejvýznamnější aflatoxiny patří aflatoxiny AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2.

Jsou nejčastější i nejvýznamnější skupinou mykotoxinů a je o nich nejvíce informací. Jde o produkty plísní *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus* (*deriváty difuranoylkumarinů*). Jejich spory jsou rozšířeny celosvětově v půdě a vzduchu. Pokud jsou příznivé podmínky a dosažitelný vhodný substrát jako zdroj živin, může dojít ke kolonizaci a růstu plísně. Růst toxinogenních plísní a biosyntéza aflatoxinů závisí na substrátu, vlhkosti, teplotě, pH, přítomnosti kyslíku, obsahu stopových prvků a kompetitivní mikroflóře. Růst plísní je velmi rychlý, pokud vlhkost je vyšší než 14 % a teplota 25 °C nebo vyšší.

Aflatoxiny jsou v našich klimatických podmínkách málo rozšířeny, mohou však být importovány obilninami a dalšími komponentami určenými pro výrobu krmiv ze subtropických a tropických oblastí. Aflatoxiny jsou prokazovány u různých druhů zrnin, sóji, hrachu, bobu, prosa a ořechů.

### Toxikologické vlastnosti

Aflatoxiny jsou absorbovány ze zažívacího traktu, metabolizovány a do značné míry exkretovány. Distribuce metabolitů do různých míst těla zvířat může být příčinou nebezpečných reziduí v produktech užívaných jako potraviny (mléko, maso a vejce). V organismu dojnic jsou aflatoxiny zčásti konvertovány na hydroxy sloučeniny, toxicky aktivnější formy, označované jako AFM1, AFM2 a přechází do mléka, masa a orgánů (játra, ledviny). Průměrný stupeň konverze je asi 58:1 až 75:1 (1 až 2 % příjmu v dietě) (FROBISH aj., 1986). Hladiny AFM1 v mléce vymizí pokud AFB1 jsou odstraněny z krmné dávky. Současná maximální akceptovatelná množství AFM1 v mléce jsou 10 - 50 ng/kg. Rezidua aflatoxinů byla též prokázána v tkáních kuřecích brojlerů, především v játrech a ledvinách.

Aflatoxiny jsou toxické a karcinogenní. *Akutní toxikóza* se projevuje úhynem bez příznaků, nebo s příznaky anorexie, deprese, dyspnoe, anemie a krvácení. V *subchronických případech* je nacházen ikterus, hypoprotrombinémie, hematomy a gastroenteritida. Nejčastěji se objevuje *chronická aflatoxikóza*, charakterizovaná proliferací žlučových, periportální fibrózou, ikterem, cirhózou jater, sníženou rezistencí k infekčním onemocněním a výrazným poklesem užitkovosti. Obecně se uvádí, že samci jsou vůči aflatoxinům citlivější než samice. Aflatoxin AFB1 je nejúčinnějším známým hepatokarcinogenem.

V organismu v játrech a plicích dochází k jeho biotransformaci, která vede k tvorbě aktivních epoxidů. Tyto látky se váží na makromolekuly, jako jsou proteiny a DNA a tím způsobují buněčnou toxicitu a poškození DNA. V játrech klesá obsah vitamínu A, je narušen jaterní metabolismus lipidů (hyperlipémie), vyvolána tuková degenerace. Charakteristická je i proliferace žlučových a periportální fibróza. Průvodním jevem je i imunosuprese a proto jsou zvířata vnímavější k infekcím. Z hlediska patologického jsou popisovány u samic změny na vaječnicích, u samců pokles objemu ejakulátu a hmotnosti gonád.

Nejcitlivější vůči aflatoxinům je drůbež zejména krůtata a kachňata (LD 50 = 0,3 – 0,6 mg/kg živé hmotnosti). Vnímaví jsou i prasata a koně. Tolerantnější vůči aflatoxinům jsou přežvýkavci, nejodolnější jsou ovce.

V ČR se v krmivech podle druhu pohybují limity v rozmezí 5 – 50 µg/kg aflatoxinu AFB1.

U člověka způsobují aflatoxiny Reyův syndrom, zánět jater, primární hematom, kwashiorkor, oslabení imunitního systému. V nedávné době byla popsána aflatoxikóza u lidí, např. v Keni, kde onemocnělo z kontaminovaného obilí 97 lidí, z toho 51 lidí zemřelo. Z klinických symptomů u těchto lidí byly popisovány nažloutlé bělmo oční, zvracení, žaludeční křeče, vysílení, hubnutí, bezvědomí a smrt.

### 5.2 Kyselina cyklopiazonová (CPA)

Producenti: *Aspergillus flavus*, a některé druhy rodu *Penicillium*.

Živný substrát: obdobné jako pro aflatoxikogenní houby.

Podmínky produkce mykotoxinu: obdobné jako pro aflatoxikogenní houby.

Toxikologické vlastnosti

Z toxikologických vlastností byly popsány změny v transportu iontů vápníku vedoucí k osmotické smrti buněk. Působí inhibičně na adenosintrifosfatázu v sarkoplazmatickém retikulu svalových buněk. Klinicky jde o projevy slabosti, letargie a narušené koordinace. Citlivá k intoxikaci CPA je především drůbež.

CPA může vytvářet rezidua v živočišných produktech. Nízké koncentrace CPA doložené v živočišných potravinách naznačují, že CPA nepředstavuje vážné riziko pro spotřebitele. Určitá rezidua byla prokázána v drůbežím mase. V menší míře se vyskytuje toxin v plísňových sýrech (*Penicillium camemberti*) a plísňových salámech. Při nedodržení technologických postupů při výrobě těchto potravin se může jeho koncentrace výrazně zvýšit.

### 5.3 Ochratoxiny



Producenti: *Aspergillus ochraceus*, *A. verrucosum*, *A. sulphureum*, *A. mellus*, *Penicillium viridicatum*, *P. palitans*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum*, *P. frei*, *P. tricolor*, *P. verrucosum*, *P. polonicum*.

Živný substrát: nejčastější výskyt na obilovinách - ječmen, kukuřice, žito, pšenice, oves, rýže, méně na sójových bobech, fazoli, podzemnici (zelená káva).

Podmínky produkce mykotoxinu: teplota 12 až 37 °C, optimální 25 až 37 °C, vlhkost 18 až 25 %, pH minimálně 2,2. Růst plísni a produkce mykotoxinů ustává při vlhkosti substrátu pod 13 % a teploty v rozmezí 4 až 9 °C.

Nejvýznamnějším mykotoxinem z této skupiny je ochratoxin A (OTA). Vůči vysokým teplotám jsou OTA méně stabilní, než aflatoxiny.

#### Toxikologické vlastnosti

Mechanismus jeho toxicity spočívá v tom, že fenylalaninová část jeho molekuly je t-RNA zaměněna za fenylalanin. Ten je však v ochratoxinu A navázan na kumaronovou část, která brání jeho navázání do proteinového řetězce a tím dochází k zastavení proteosyntézy. Z tohoto pohledu může fenylalanin do určité míry sloužit jako antidotum.

Ochratoxin A je silný teratogen, poškozující játra a ledviny, kde způsobuje nefrotoxikózu v důsledku tubulárního poškození a fibrózy ledvin (bledé ztvrdlé ledviny), dále působí depresivně na CNS, imunosupresivně, snížení přírůstků hmotnosti, produkce vajec a zhoršení kvality skořápky.

U prasat dochází ke snížení užitkovosti a poškození ledvin provází polyurie a polydipsie (patologická nadměrná žíznivost). Nefropatie vznikají především u prasat, ale i u drůbeže a psů. U hlodavců při jejich expozici mykotoxinem vznikají ledvinové nádory. U OTA byly prokázány i imunotoxické, teratogenní a kancerogenní účinky manifestující se vznikem tumorů v močovém ústrojí (promotor kancerogenního procesu).

Nejcitlivější vůči ochratoxinům jsou kuřata, kachňata a krůťata. Odolnější jsou přežvýkavci, u kterých bacherová mikroflóra přeměňuje OTA na méně toxický alfa ochratoxin. Při resorpci v organismu je vázán především na sérové bílkoviny. Do mléka přechází asi 0,026 % denní přijaté dávky toxinu, a proto mléko pro člověka nepředstavuje vážné riziko.

U člověka je intoxikace dávana do souvislosti s tzv. balkánskou endemickou nefropatií a tumory močového ústrojí. Významným zdrojem toxinu pro člověka je káva, ve které se často nalézají toxikologicky významné koncentrace, což souvisí s jakostí kávy (jakostní stupeň I – III).

Ochratoxiny se ukládají v tkáních (ledviny) a přechází do potravin. Jde o termostabilní toxin, tudíž není destruován při tepelné úpravě krmiv a potravin. Určitou výhodou z hlediska bezpečnosti potravin je, že se jen nepatrně kumuluje v živočišných tkáních, takže potraviny živočišného původu nepředstavují pro člověka vážné riziko. Přesto byla prokázána jeho rezidua v masných výrobcích. K jeho vzniku dochází i při použití kulturních plísní, např. v uherském salámu. Z živočišných potravin může být významným zdrojem ochratoxinů vepřová krev (výrobky z krve), ve které se ochratoxin váže na sérový albumin.

Nelze doporučit podávat zvířatům krmiva s obsahem nad 0,2 mg/kg v obilninách (lidský konzum), maximálně 0,3 mg/kg v dietě.

#### 5.4 Patulin

Producenti: *Penicillium urticae*, *P. expansum*, *P. claviforme*, ale produkují jej i plísň rodu *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. giganteus*, *A. terreus*).

Živný substrát: rýže, nahnilé ovoce, ovocné šťávy (jablečné), rajčatové výrobky, může být produkován i v plesnivých silážích.

Podmínky produkce mykotoxinu: teplota 2 do 35 °C, optimum 25 °C, pH 3,0 až 6,5, doba růstu 6 až 8 dní.

Patulin byl popsán již ve 40. létech minulého století, a dokonce byl krátkou dobu využíván jako léčebné antibiotikum. Po průkazu jeho kancerogenity byl z terapie vyřazen.

#### Toxické vlastnosti

V gastrointestinálním traktu (GIT) vyvolává degeneraci epitelových buněk, záněty, ulcerace a hemoragie. Jde o neurotoxický mykotoxin, poškozují CNS, slezinu, játra, žaludek, ledviny a respirační aparát. Nejčastěji vyvolává intoxikace u drůbeže. Při dlouhodobém podávání je karcinogenní. U skotu jsou popisovány i akutní otravy patulinem manifestující se jako plicní edém. Při krmení kontaminovanou siláží může vyvolat vnitřní krvácení. Za charakteristické klinické projevy intoxikace lze pokládat ztrátu koordinace, paralýzu a degeneraci neuronů mozkové kůry.

Pro člověka jsou hlavním zdrojem patulinu nejrůznější potraviny vyrobené ze zkaženého ovoce. Proti jeho tepelnému rozkladu působí vitamín C, který toxin tepelně stabilizuje i při sterilizačních teplotách.

#### 5.5 Gliotoxin

Jde o silný imunosupresivní toxin produkováný plísní *Aspergillus fumigatus*. Vyvolává patologické změny na orgánech, zejména na plicích, gastrointestinálním traktu a močovém ústrojí. Plíseň může přímo v organismu způsobit endomykózu s produkcí mykotoxinu přímo v místě infekce. Klinicky se onemocnění manifestuje u drůbeže dýchacími potížemi, u skotu byly zaznamenány aborty.

#### 5.6 Citrinin

Producenti: plísň rodu *Penicillium* (*P. citrinum*, *P. expansum*, *P. verrucosum*) a rodu *Aspergillus* (*A. terreus*, *A. candidus*).

Podmínky produkce mykotoxinu: mykotoxin je produkován při teplotě 15 až 37 °C, optimum je 30 °C.

Má podobnou strukturu jako ochratoxin A, chybí mu však postranní aminokyselinový řetězec. S ochratoxinem A působí synergicky. V silně alkalickém prostředí dochází k jeho rozkladu.

Jde o nefrotoxin, způsobuje lymfopenii. U citrininu byly prokázány kancerogenní, mutagenní a teratogenní vlastnosti. U krav mléčného typu vyvolává onemocnění označované jako syndrom pyrexie-pruritus-hemoragie. Toxin má antifungální, antibakteriální, antiprotozoární, insekticidní a fytotoxické účinky. U obilovin je zaznamenána jeho přítomnost často již před sklizní.

### 5.7 Fusariové toxiny - Trichotheceny

Mimořádně důležité jsou trichotheceny, zearalenon (ZEN) a fumonisiny. Trichotheceny jsou členěny do čtyř základních skupin, z nichž nejdůležitější jsou typy A a B. Typ A trichothecenů zahrnuje T-2 toxin, HT-2 toxin, neosolaniol a diacetoxyscirpenol (DAS). Typ B trichothecenů zahrnuje deoxynivalenol, nivalenol a fusarenon X.

Producenti: jednotlivé druhy plísní rodu *Fusarium* (*Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*).

Jde o skupinu velice si podobných látek, více než 80 typů, charakteristických trichothecenovým jádrem (sesquiterpenoidní strukturou). Nejznámější z těchto mykotoxinů jsou deoxynivalenol (DON-vomitoxin), zearalenon (F- 2 toxin), fumonisiny, moniliformin, nivalenol a T- 2 toxin. Jsou méně stabilní v silně alkalickém prostředí. Trichotheceny jsou známé jako inhibitory proteosyntézy a imunosupresivní látky.

Z toxikologických účinků trichothecenů lze uvést obecné symptomy, jako je nauzea, silná iritace pokožky a porucha hemopoézy. Vzhledem k poměrně častému výskytu onemocnění způsobených trichotheceny u lidí a zvířat, jsou ve světě pokládány za nejvýznamnější skupinu mykotoxinů. Trichotheceny jsou rychle resorbovány z gastrointestinálního traktu a v játrech vznikají epoxidy, které negativně ovlivňují základní buněčné funkce, jako je syntéza bílkovin a DNA, a tím negativně ovlivňují replikaci buněk.

Tři skupiny fusariových mykotoxinů jsou z hlediska zdraví zvířat a jejich užitkovosti mimořádně důležité. V rámci skupiny trichothecenů je DON spojován se zvracením prasat, T-2 toxin může přivodit reprodukční poruchy prasec. Další skupina zahrnující zearalenon a jeho deriváty má estrogenní vlastnosti. Třetí kategorie zahrnuje fumonisiny, které jsou spojeny se specifickými toxickými syndromy jako je leukoencefalomalacie koní (ELEM) a plicní edém prasat (PPE).

U člověka byla popsána alimentární toxická aleukie „septická angína“.

Nejznámější z těchto mykotoxinů jsou

#### 5.7.1 Deoxynivalenol (DON, syn. vomitoxin)

Producenti: *Fusarium sporotrichiella*, *F. graminearum*, *F. culmorum* aj.

Živný substrát: obiloviny, kukuřice, pšenice.

Z fusariotoxinů je DON obvykle ještě s T-2 toxinem nejvíce frekventovaným mykotoxinem v krmivech. Často je v odebraných vzorcích krmiv determinován téměř na 100 % a je proto považován za marker upozorňující na přítomnost i dalších mykotoxinů. Na obsah DON

v cereáliích upozorňuje přítomnost načervenalých, bělavých, nápadně lehkých nebo scvrklých zrn.

#### Toxikologické vlastnosti

Obecné symptomy jsou nauzea, iritace pokožky a poruchy krvetvorby. U přežvýkavců dochází ke snížené užitkovosti a příjmu krmiva. V bacherů nastává jeho degradace asi 50 % za 24 hod. Uvádí se, že jeho vylučování mlékem představuje 0,0001 % jeho dávky v krmivu.

Velmi citlivá jsou prasata, je uváděn snížený příjem až odmítnutí krmiva při vyšší koncentraci než 0,7 mg DON/kg krmiva, snížení přírůstků a zvracení. Toxické efekty se však mohou dostavit již při koncentraci 0,25 mg/kg krmiva.

U drůbeže snižuje hmotnost vajec a je zhoršená kvalita vaječné skořápky, nachází se rezidua ve vejcích.

Účinnost DON je spojována s gastroenteritidami, intestinálními hemoragiemi a úhynem. Hlavním mechanismem toxického účinku je v enterocytech, kde inhibuje syntézu proteinů a vyvolává apoptózy.

Při intoxikaci DON dochází k poklesu tvorby protilátek a poklesu počtu leukocytů. Uvádí se, že mykotoxin je transportován do mozku, kde spouští dopaminergické receptory, což vede ke zvracení u prasat, u ostatních zvířat k odmítání krmiva, ztrátě koordinace a letargii.

V USA a Kanadě platí limit v krmivu 4 mg/kg. Za kritické koncentrace DON pro dojnice se považuje 5 mg/kg krmiva (88 % sušinu). V ČR je stanoven maximální obsah DON v zrninách 2 mg/kg, v mouce 1 mg/kg.

#### 5.7.2 *Zearalenon (F-2 toxin)*

Producenti: *Fusarium graminearum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum* a další.

Živný substrát: obilniny, kukuřice, čirok, seno, siláž, velmi často se vyskytuje v krmivech živočišného původu.

Podmínky produkce mykotoxinu: teplota 3 až 8 °C (při 25 °C se netvoří).

Jde o lakton kyseliny resorcyklické a je ligandem pro receptory estrogenů. V organismu je mykotoxin metabolizován na estrogeně mnohem aktivnější  $\beta$  - zearalenon.

#### Toxikologické vlastnosti

U monogastrických zvířat prokazuje estrogení aktivitu (negativně působí na reprodukci), velmi citlivá jsou především prasata (prasničky). Jeho účinky jsou podobné syntetickým analogům estrogenů – hyperestrogenizace prasnic, poruchy reprodukčního cyklu, vulvovaginitidy. U dospívajících prasniček je intoxikace spojována s klinickými příznaky manifestujícími se otokem vulvy, zvětšením dělohy a mléčné žlázy, ve vážnějších případech dochází k výhřezu uteru nebo rekta, dále dochází k narušení říjového cyklu, snížené plodnosti a perzistenci žlutého tělíska. Popsané efekty se mohou dostavit již při koncentraci 1 mg/kg krmiva. Někteří autoři považují u chovných prasat za limitní hodnotu ZEN již koncentraci

0,05 mg/kg krmiva proto, že již při koncentracích 50 µg/kg krmiva se mohou objevovat histologické změny na děložní sliznici a vaječnících. U kanců je intoxikace provázena sníženým sexuálním pudem, sníženou koncentrací testosteronu, sníženou spermiogenezi až neplodností, a to již při koncentracích ZEN 30 µg/kg krmiva.

U experimentálních zvířat (potkan) pod jeho vlivem byly vyvolány léze uteru, testes a dalších orgánů při dávkách 10 – 100 mg/kg živé hmotnosti (nezkrmovat více jak 500 µg/kg). Určitou toleranci vůči mykotoxinu lze pozorovat u drůbeže a přežvýkavců. I přes určitou odolnost přežvýkavců vůči zearalenonu byly pod jeho vlivem pozorovány u dojníc poruchy plodnosti, zvýšení výskytu onemocnění mléčné žlázy (zvýšený počet somatických buněk v mléce), paznehtů a zhoršení vitality narozených telat. Za kritické koncentrace v krmné dávce pro dojnice (limit i pro ostatní zvířata) se považuje 0,5 mg/kg krmiva (88 % sušinu).

Pro člověka může být zdrojem mléko, do kterého se zearalenon vylučuje asi 0,01 % přijaté denní dávky. V odborné literatuře existují práce popisující korelaci mezi výskytem zearalenonu a dalších trichothecenů v potravě matek v průběhu těhotenství a výskytem některých poruch nervového systému u potomstva, včetně schizofrenie. Odhaduje se, že pro člověka je bezpečný příjem ZEN ve výši 0,05 µg/kg tělesné hmotnosti.

### 5.7.3 *Fumonisin*

Producenti: *Fusarium verticillioides* (moniliforme), *F. proliferatum*

Živný substrát: obiloviny, kukuřice (pro koně je vhodné ji vyšetřit)

Podmínky produkce mykotoxinu: optimum 25 °C, pH 3 – 9,5

Fumonisin jsou polární sloučeniny a tudíž jejich resorpce z GIT je poměrně nízká. Jde o mykotoxiny dobře rozpustné ve vodě a málo v polárních rozpouštědlech. Po chemické stránce možno je zařadit k aminopolyalkoholům.

Toxikologické vlastnosti

Za nejtoxičtější je pokládán fumonisin B1 inhibující enzym ceramid syntetázu, N-acetyl transferázu katalyzující syntézu sfingolipidů.

U koní vyvolává onemocnění označované jako leukoencefalomalacie (ELEM). ELEM je smrtelné onemocnění koní lokalizované v mozku (progresivní nekróza neuronů CNS), jsou postižena játra a ledviny. Klinický obraz onemocnění - natažený krk a končetiny, ataxie, paralýza, vrávoravá chůze. Pro koně jsou riskantní diety s obsahem 5 mg/kg fumonisinu. Příznaky onemocnění se objeví za 7 – 35 dní.

U prasat vyvolává plicní edém (PPE), který v současné době je dáván do souvislosti spíše se srdeční dysfunkcí, než z narušením plicní tkáně. Současně se vyvíjí i jaterní hyperplazie.

U laboratorních zvířat iniciuje vznik zhoubných nádorů (u potkanů.).

Méně citliví jsou přežvýkavci, u kterých dochází v průběhu bachorové fermentace k jejich výrazné degradaci. Proto i jeho transfer do mléka je minimální. Přesto při koncentraci 100

mg/kg byla u dojnic pozorována snižená dojivost. Za maximální přípustnou hranici toxinu v krmivu lze pokládat koncentraci 5 mg/kg krmiva.

U drůbeže je popsán syndrom toxicity krmiva.

U člověka je popisována v souvislosti s fumonisiny rakovina jícnu v Číně. Jeho zdrojem ve výživě člověka je především kukuřice a výrobky z ní. V USA je popisován velmi vzácný defekt dvou narozených dětí s anencefálií (zrůda bez lebního kostěného krytu a bez vyvinutého mozku), dávaný do souvislosti s konzumací kukuřice kontaminované fumonisinem.

#### 5.7.4 T-2 toxin

Producenti: *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum*.

Podmínky produkce mykotoxinu: teplota 3 až 8 °C (při 25 °C se již netvoří).

Toxikologické vlastnosti

Za kritickou hodnotu T-2 toxinu v krmivu je považována koncentrace 0,5 mg/kg. Charakteristickými klinickými příznaky jsou kožní a slizniční nekrotické leze, zejména v horní části gastrointestinálního traktu po kontaktu s mykotoxinem. Tyto patologické změny byly pozorovány u drůbeže a prasat. U drůbeže je pozorováno zduření sliznice v koutku zobáku, postižení burzy Fabricii a brzlíku.

Jsou pozorovány gastroenteritidy, intestinální hemoragie, krváceniny v oblasti hlavy a pohlavních orgánů, pokles hladiny protilátek, poruchy krvetvorby, těžké průjmy. Byla prokázána i jeho exkrece mlékem.

U kočky – zvracení, průjmy, nekróza kůže a krvácení. U myši byly prokázány teratogenní vlastnosti.

#### 5.7.5 Kyselina fusarová

Toxicita této látky je pro teplotně živočichy v porovnání s výše uvedenými mykotoxiny podstatně nižší. Její toxikologický význam spočívá především v tom, že výrazně potencuje účinky ostatních fuzariových toxinů.

#### 5.8 Kyselina penicilová

Producenti: *Penicillium martensii*, *P. palitans*, *P. cyclopium*, *P. puberolum*

Živný substrát: zrniny – na navlhklých skladovaných obilovinách je produkována kyselina penicilová při nízkých teplotách (1 až 10 °C).

Působí tukovou degeneraci a nekrotické změny jaterního parenchymu, je považována za karcinogenní.

#### 5.9 Stachybotryotoxiny (atratoxiny)

Producenti: *Stachybotrys alternans*, *S. chartarum*

Živný substrát: krmiva s vysokým obsahem celulózy – sláma, seno, plevy.

Podmínky produkce: teplota optimum 20 – 25 °C (>2-4 °C), pH 3,0 – 6,5, růst doba 6 – 8 dní.

Toxikologické vlastnosti

Způsobuje hemoragickou diatézu, záněty sliznic (na sliznici dutiny ústní), kyselá krmiva (bachorová acidóza) urychlují jeho vstřebávání a prohlubují intoxikaci. Citlivá jsou zejména mláďata, koně a ovce. Odolnější jsou prasata a drůbež. Krmivo s nálezem spor *S. alternans* nezkrmovat je považováno za závadné.

Výše uvedený výčet mykotoxinů představuje jen část těch nejvýznamnějších, které nejčastěji vznikají v krmivech.

V současné době lze v odborné literatuře nalézt informace o dalších mykotoxinech, které byly diagnostikovány v krmivech a potravinách, jako jsou luteoskyrin, rubratoxin, sterigmatocystin, tremorgenové mykotoxiny – skupina mykotoxinů označovaná podle jejich účinku.

Ve světě byly pozorovány významné patologické změny u pasoucích se zvířat po zkrmování některých zaplísňených píceň. Příkladem je Jílek mámivý (*Lolium temulentum*), na kterém roste houba (plíseň) *Stromatina temulentata*, jejíž podhoubí prorůstá celou rostlinou. Při jeho zkrmování byly zaznamenány případy vážného poškození zdraví u přežvýkavců. Patologické změny jsou označovány jako lícní ekzém – zánětlivé změny na kůži a tváři pod vlivem slunečního záření.

Původně byly uváděny jako etiologický agens alkaloidy, které obsahují tyto lipnicovité pícniny, až později se ukázalo, že příčinou je mykotoxin sporidesmin.

### 5.10 *Sporidesmin*

*Pithomyces chartarum* je všudypřítomný saprofyt na pastvinách, který má schopnost syntetizovat sporidesmin A, sloučeninu vyvolávající faciální ekzém a poškození jater u ovcí.

Pro úplnost přehledu je nutné se zmínit i o dalších toxických látkách z vyšších hub.

5.11 *Paličkovice nachová* (*Claviceps purpurea*) – roste na žitě, pšenici, ovsu, ale i na pícninách, plevelných travách, roste zvláště v létě s vlhčím počasím v době květu.

Produkuje námelové alkaloidy – jde o deriváty kyseliny lysergové

Dělí se na dvě skupiny - ergotaminovou

- ergobasinovou.

Tyto námelové toxiny způsobují závažné onemocnění u zvířat i člověka, označované jako otrava námelem (ergotismus). Onemocnění mělo výskyt v podobě epidemií již v ranném středověku. Bylo označováno jako „oheň svatého Antonína“.

U člověka se manifestuje jako pálivá bolest v končetinách vyvolaná poruchami prokrvení. Toxiny plísně vyvolávají poruchy centrálního nervového systému a periferního vaskulárního systému s výskytem křečových záchvatů, ochablostí a poruchami lokomoce. Pro člověka

existuje riziko otravy z bioproduktů připravených z obilnin pěstovaných v rámci ekologického zemědělství z oblastí s výskytem této houby.

Ergotaminy způsobují zúžení periferních cév a vlásečnic.

Prasata, skot – odúmrtí periferních částí (uši, ocas, struky i celé čtvrti vemene, potraty).

Drůbež – odúmrtí hřebínku, špičky jazyka.

Popsány smrtelné otravy u dojnic se siláží vyrobených z píce masivně infikovaných námelem (alkaloidy nebyly zjištěny v mléce).

V současné době narůstá i problém zvýšeného výskytu hub ze skupiny

### 5.12 Sněti.

U obilovin, a to zejména u pšenice, jako jednoho z nejvýznamnějších krmiv se setkáváme se třemi hlavními druhy snětí.

Prašná sněť pšeničná (*Ustilago tritici*)

Mazlavá sněť pšeničná (*Tilletia caries*)

Zakrslá sněť pšeničná (*Tilletia controversa*)

Hlavním zdrojem infekce jsou chlamydospory nacházející se v půdě, dalším je infikované osivo. Houba napadá obilná zrna, která mění na hálku naplněnou spory. Infekce se přenáší kontaminovaným osivem spory houby. Spory jsou vysoce odolné a v půdě přežívají až 10 let. Silně napadené obilí má typický zápach a je pro jakékoliv účely nepoužitelné. Důrazně se nedoporučuje ani jeho zkrmování.

Zvláště závažný je výskyt mazlavé snětí. V sporách obsahuje trimethylamin, který propůjčuje napadené pšenici zápach po zkažených rybách.

Přesto, že u snětí nejsou prokázány produkty typu mykotoxinů, při zkrmování napadeného krmiva bylo u hospodářských zvířat pozorováno snížení přírůstků a trávicí poruchy.

## 6. Prevence vzniku mykotoxinů

Mykotoxiny představují jeden z nejvýznamnějších problémů výživy hospodářských zvířat. Na jedné straně vyvolávají onemocnění zvířat s významným ekonomickým dopadem na produkci a reprodukci. Na druhé straně řada mykotoxinů může přecházet do živočišných produktů a tím ohrozit bezpečnost potravin a zdraví lidí. Riziko spočívá i v tom, že organismus zvířete může mykotoxiny z krmiva v potravních produktech koncentrovat a transformovat na toxikologicky aktivnější formy.

Za riziková krmiva lze pokládat prakticky všechny obilniny, olejninu, luskoviny a produkty z nich vyrobené. Z konzervovaných krmiv jsou nejčastějším zdrojem mykotoxinů seno a siláže, především kukuřičné. Naproti tomu u jetelotravních a vojtěškových siláží je kontaminace mykotoxiny v terénních podmínkách zaznamenávána mnohem méně.

Prevence plísňové a mykotoxinové kontaminace je obtížná, neboť přítomnost plísní v zrninách a pícech je ovlivňována řadou obtížně kontrolovatelných faktorů. Žádný monitorovací nebo



preventivní program nemůže být úspěšný, pokud si neuvědomíme význam všech vstupů a výstupů spojených s tímto problémem. Začíná to výběrem genetického materiálu, který je použit pro setí a může končit výběrem systémů dekontaminujících nebo neutralizujících toxiny, jestliže selžou preventivní opatření (Mallmann, 1998).

Prevence vzniku mykotoxinů je jedním z nejvýznamnějších opatření. Ideálním stavem by bylo najít takové metody, které by vzniku mykotoxinů v krmivech zabránily. V praktických podmínkách jde o velmi těžce zvládnutelný problém, vycházející ze samotné biologické podstaty vzniku mykotoxinů. Z prostředí je prakticky nemožné odstranit toxikogenní plísňe, respektive jejich vysoce odolné spory. Velkým problémem je i skutečnost, že kontaminace krmiv spory může nastat v celém řetězci jejich výroby „od pole až po žlab“. V průběhu výroby, transportu a uskladnění krmiv je obtížné zajistit takové podmínky a ošetření krmiv, abychom zabránili jejich kontaminaci spory, růstu plísni a produkci mykotoxinů.

Preventivní opatření by měla zabránit:

*a) infekci již při pěstování a sklizni krmiv*

- střídání plodin v osevních postupech, omezit vliv předplodin, riziková je z tohoto pohledu především kukuřice,
- zpracování půdy,
- výběr vhodné odrůdy, hybridu,
- protiplísňové ošetření osiv (fungicidy – mořidla),
- vyrovnaná výživa porostů,
- boj proti plevelům (rezervoární organismy),
- boj proti škůdcům a chorobám,
- šlechtění odrůd odolných proti houbovým chorobám a škůdcům (GM – odrůdy),
- dodržování všech agrotechnických zásad při pěstování kulturních plodin,
- udržování porostů v dobrém zdravotním stavu,
- využitím atoxigenních kmenů konkurenčně vyloučit z prostředí toxikogenní plísňe,
- zabránit mechanickému poškození zrna (při sklizni a uskladnění nebo jakékoliv manipulaci),
- kvalitní ošetření a uskladnění krmiv po sklizni,
- po sklizni cereálií do 48 hodin snížit vlhkost pod 14 % .

*b) kontaminaci a růstu plísni při skladování a konzervaci krmiv*

*Koncentrovaná krmiva*

Zajistit méně než 14 % vody v krmivu, uskladnění v suchém prostředí do 65 % relativní vlhkosti, minimální přístup O<sub>2</sub>, odstranit jakékoliv zbytky starých krmiv ze skladovacích prostor, které by byly zdrojem kontaminace, ošetření krmiv protiplísňovými přípravky.

Pečlivě je třeba sledovat vysoce rizikové krmné komponenty jako je šrot z podzemnice olejné nebo šrot z bavlníkových semen. U krmných směsí dodržovat zásadu "první dovnitř, první ven", pro lepší promíchání krmných směsí používat metodu dvou zásobníků, vypracovat plán a časový harmonogram objednávání jednotlivých komponent, omezit skladování na minimum, používat vzduchotěsné a vodotěsné zásobníky na krmiva, řádně vyčistit zásobníky před každým plněním.

Skladování krmných komodit, bez zajištění vhodných podmínek a ošetřování, může zvýšit růst plísní, neboť spory plísní jsou vždy přítomné. Kvalitní zrniny by měly být skladovány při menší než 14% vlhkosti, neboť vlhkost a kyslík jsou nezbytné pro klíčení spor (14,5 až 15,5 %) a růst plísní (13,5 až 14 %). Při skladování musí být krmiva suchá, bez kyslíku, fermentována nebo ošetřena chemikáliemi, které inhibují plísně.

### *Objemná krmiva*

U silážované píce je důležité uplatnit zásady dobré výrobní praxe, která zahrnuje sklizeň píce v optimální silážní zralosti (28 až 35 % sušiny), zajištění dokonalé fermentace, rychlé naplnění siláže, vytěsnění kyslíku v průběhu konzervace (utužit konzervovanou hmotu), zakrytím silážního prostoru zamezit druhotnou kontaminaci. V anaerobním prostředí probíhá rychlé odumírání plísní rodů *Fusarium*, *Alternaria* a *Cladosporium*. Ke zlepšení fermentace mohou být použita silážní konzervativa.

Správný odběr siláže ze sila a rychlé zkrmení minimalizuje sekundární fermentaci, která může vzniknout zvláště v létě, pokud je siláž na vzduchu déle než 6 až 10 hodin.

U suchých objemných krmiv – dobře je usušit a uskladnit ve vhodných podmínkách

## **7. Dekontaminace mykotoxinů v krmivech**

Při zjištění klinických příznaků, resp. patologicko-anatomických změn můžeme mít podezření, že použité krmivo je mykotoxiny kontaminováno (Mabbett, 1999). U skotu pozorujeme omezený příjem krmiva, nízké přírůstky a sníženou produkci mléka, zvýšený výskyt potratů a embryonální mortality, tiché říje, nepravidelný pohlavní cyklus, nižší procento zabřezávání, zadržování a záněty dělohy, sníženou imunitu, dysfunkce slezu, ketózy a ztučnění jater, rezidua v mléce.

U drůbeže sledujeme zhoršený růst, snížený příjem krmiva, špatnou konverzi krmiva, atrofii vaječníků, sníženou líhnivost a deformovaná vejce, ztučnění jater, hemoragie, nižší hladinu protilátek v krvi, snížený počet bílých krvinek a T-lymfocytů, nižší koncentrace fagocytů, orální leze.

*Prasata* projevují nechutenství, poruchy reprodukce, průjmy, zvracení, extrémní rozklad zažitiny, změněné biochemické ukazatele krve.

Na dekontaminaci lze pohlížet jako na proces řešící již vzniklou situaci, kdy jsou v krmivu mykotoxiny přítomny. Vzhledem k tomu, že neexistují, ani nelze v blízké budoucnosti počítat s tím, že by se našly stoprocentní metody prevence vzniku mykotoxinů v krmivech, je nutné zabývat se dekontaminačními metodami.

Obdobně jako u preventivních metod je těžké najít a v současné době ani neexistují, univerzální dekontaminační metody. Je to dáno obrovskou škálou mykotoxinů, dnes je známo více než 300 druhů, jejich různorodou chemickou strukturou, vysokou stabilitou vůči řadě fyzikálních, chemických i biologických faktorů.

K dekontaminaci krmiv jsou využívány *metody fyzikálně chemické* (např. vodný roztok chloridu vápenatého, čpavkování, kombinace tepla a tlaku), *adsorbční efekt* minerálních jíílů, produktů stěn buněk kvasinek (může však docházet k vyvázání důležitých složek krmiva) i

*degradace mykotoxinů za využití enzymů esterázy a epoxidázy, nebo kombinace minerálních jílu s enzymy.*

*Fyzikální způsoby dekontaminace mykotoxinů v krmivech:*

Většina mykotoxinů má velmi pevnou chemickou strukturu, která zajišťuje jejich velkou stabilitu, jak při působení vysokých teplot, tak při nízkých hodnotách pH. Mykotoxiny je možné rozložit horkem nebo kombinací tepla a tlaku, senzibilita závisí na typu mykotoxinu, teplotě, době zahřátí a obsahu vody v krmivu.

Základním opatřením musí být mechanické odstranění všech nečistot ve skladovacích prostorech a technologických linkách včetně zásobníků, čištění zrnin, odstranění malých, svařtělých zrn. např. čištěním surové kukuřice se snížil celkový obsah toxinů až o 32 %.

Některé mykotoxiny jako bezvodé aflatoxiny, trichothecenové toxiny (DON), zearalenon, ochratoxin A, patulin a kyselina penicilová jsou termostabilní. Naopak termolabilní jsou citrinin, který je zahřátím relativně snadno rozrušen a patulin. Proti tepelnému rozkladu patulinu působí vitamín C, který toxin tepelně stabilizuje i při sterilizačních teplotách.

Ultrafialové a ionizující záření může být při destrukci některých mykotoxinů jako je např. aflatoxin efektivní, ale zároveň jsou destruovány živiny krmiva.

Sorbenty jsou minerální látky schopné adsorbovat nebo vázat molekuly mykotoxinů, které potom nemohou být ze střeva absorbovány a stráveny. Používají se minerální sorbenty, jejichž povrch je nasycen molekulami vody, které přitahují polární funkční struktury mykotoxinů. Lze použít aktivované živočišné uhlí, syntetické zeolity a minerální jíly. Účinnost sorbetů závisí na řadě faktorů – adsorpční kapacitě, jejich molekulární struktuře, jejich čistotě, druhu mykotoxinu, apod.

Nevýhodou těchto metod je, že podle typu a intenzity použitého fyzikálního faktoru dochází k různému stupni narušení živin a jejich absorpce, čímž se snižuje biologická hodnota krmiva.

Novějším způsobem dekontaminace je použití krmných aditiv, která působí proti mykotoxinům in vivo. Některé minerální sloučeniny jsou schopny adsorbovat nebo vázat molekuly mykotoxinů. Adsorpce izoluje toxiny, omezuje jejich absorpci nebo trávení zvířetem. Aktivované živočišné uhlí, produkty stěn buněk kvasinek, syntetické zeolity a těžené minerální jíly, jako jsou bentonity a sepiolity, mají uvedené vlastnosti. Jejich účinnost závisí na sorpční kapacitě jejich molekulární struktury, stejně jako na jejich čistotě a charakteristikách cíleného mykotoxinu. Hlinitokřemičitany působí proti aflatoxinům, mohou být v omezeném měřítku účinné proti zearalenonu a B-trichothecenům jako je deoxynivalenol nebo nivalenol.

Komerčně dostupná krmná aditiva spojují adsorpční efekt s enzymovou degradací, neboť se očekává detoxikace krmiva kontaminované řadou mykotoxinů. Používají se minerální adsorbenty, jejichž povrch je nasycen molekulami vody, které přitahují polární funkční struktury mykotoxinů. Takto izolované toxiny neprostupují do krve a vnitřního prostředí zvířete. V případě nedostatku polárních funkčních skupin zajistí jejich likvidaci enzymy. Enzym esteráza a epoxidáza štěpí funkční atomové skupiny od molekul mykotoxinů a zbytek molekuly se stává netoxickým, je tráven a vyloučen. Enzym esteráza například rozlomí laktonový kruh zearalenonu, zatímco enzym epoxidáza degraduje 12,13- epoxy skupinu u trichothecenů.

### *Chemické způsoby dekontaminace mykotoxinů v krmivech*

Snaha o dekontaminaci napadených zrnin je letitá, zahrnuje extrakci s použitím organických rozpouštědel, uplatnění vodných roztoků chloridu vápenatého nebo bikarbonátu sodného, horké vody se solí apod. Tato relativně ekonomická opatření způsobují určité problémy ve výživě zvířat. Ošetření amoniakem a monomethylaminem a hydroxidem vápenatým může být efektivní za kontrolovaných podmínek.

Mezi účinná a ekonomická opatření patří čpavkování, které rozkládá aflatoxiny (vznikají mutagenní produkty). Účinek ozonu byl prokázán na dekontaminaci aflatoxinu B1, kdy u kukuřice po 92 hodinách expozice O<sub>3</sub> byl snížen jeho obsah o 95 %.

### *Biologické způsoby dekontaminace mykotoxinů v krmivech*

Lze využít antagonistické mikroorganismy a jejich produkty, např. kvasinkové kultury (*Saccharomyces cerevisiae*, pивní kvasinky), produkty buněčných stěn kvasinek (oligosacharidy zejména ze skupiny glukomananů), bakteriální kultury *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus* mají schopnost vázat aflatoxiny a trichothecen). Obsah vlákniny v krmivu může částečně vázat např. zearalenon a T-2 toxin. Patulin se rozkládá při alkoholickém kvašení účinkem kvasinek rodu *Saccharomyces*.

### *Použití enzymů*

Novější postupy dekontaminace mykotoxinů představuje použití enzymů. Jsou dostupné enzymy na inaktivaci zearalenonu, trichothecenů zahrnující T-2 toxin, HT-2 toxin, DON, nivalenolu a diacetoxyscypenolu. Enzymy degradují toxin rozštěpením molekuly na neškodné metabolity. Komerčně dostupná aditiva mohou spojovat adsorpční efekt s enzymovou degradací. Přítomné enzymy – esterázy (schopné rozlomit laktonový kruh zearalenonu) a epoxidázy štěpící funkční atomové skupiny trichothecenů.

### *Podpora detoxikačních funkcí organismu zvířat*

Pokud jsou mykotoxiny absorbovány drůbeží nebo jinými zvířaty neporušené, vstupují během trávení do krevního řečiště a mohou ovlivnit zdravotní stav. V játrech, která mykotoxiny detoxikují podobně jako další jedy, se uplatňují oxidoredukční reakce, založené na využití glutationu, který je částečně tvořen metionem a cysteinem. Jedním z účinků aflatoxinů je vyčerpání metabolických hladin metioninu, což může negativně ovlivnit zdraví zvířat a užitkovost. U brojlerů, při příjmu aflatoxinem kontaminovaných krmiv, se doporučuje mimořádný přísun metioninu o 30 - 40 % vyšší než doporučují normy (NRC).

Proti mykotoxinům lze využít ochranné účinky aplikace antioxidantů (vitamín A, vitamín E, kyselina askorbová, koenzym Q, selen, případně různé rostlinné extrakty)

## **8. Vzorkování krmiv pro analýzy**

Metodika na stanovení počtu spor plísní je zpracována ve "Všeobecných pokynech pro stanovení počtu kvasinek a plísní" (ISO 79 54, původně ČSN 56 00 87). Existuje i vnitřní pokyn veterinární služby, který je však nezávazný. Stanovení mají své klady i problémy. Ty začínají již při ředění. Vedle plísní rostou na půdách i bakterie, roli sehrává i teplota, při které

je kultivace prováděna, několik různých druhů půd, vyočkování každé kolonie, která na půdě naroste apod. Nelze požadovat okamžité stanovení počtu, kultivace předpokládá dobu 4-5 dní při 25 °C.

Stanovení mykotoxinů v krmivu je poměrně nákladná záležitost, proto je nutné zajistit taková vyšetření, která by měla co nejvyšší vypovídací schopnost. Je zjištěno, že chybné vzorkování a odběr poměrného vzorku z odebraného celkového vzorku tvoří většinou přes 90 % celkové chyby. Největší problémy jsou s vyšetřováním obilnin, které jsou skladovány v tisícitunových silech. Odebrání jednoho náhodného vzorku ze sila nemá žádný význam, nález mykotoxinu je ovlivněn vysokou mírou náhody.

V momentě vyšetření nemusí již být toxigenní houba zachycena, přestože příslušný toxin je v krmivu přítomen. Vystavení zvířat vlivu více než jednoho mykotoxinu může vyvolat příznaky odlišné od působení stejných mykotoxinů samostatně. Relativně nebezpečnější, než akutní intoxikace, je dlouhodobé působení nízkých hladin mykotoxinů, vedoucí k oslabení imunitního systému, zvýšenému výskytu sekundárních infekcí, zhoršení konverze krmiva a snížení užitkovosti.

Je důležité si uvědomit, že kontaminace mykotoxiny není rozšířena rovnoměrně nebo homogenně na určitém pozemku, přepravním voze nebo v zásobníku krmiv. Dokonce mezi dvěma sousedními pozemky mohou být rozdíly a na jednom mohou mykotoxiny chybět. Značné množství mykotoxinů může být koncentrováno na malém procentu zrnin. Hladiny až 500 000 ppm (mg/kg) mohou být zjištěny na jediném zrna kukuřice.

Vzhledem k heterogennímu rozložení mykotoxinů v krmivu a z toho vyplývající možnosti značné chyby vzniklé odběrem vzorků, časté přítomnosti více druhů mykotoxinů a neexistenci referenčních metod analytických stanovení pro většinu mykotoxinů, nelze jakoukoliv hladinu mykotoxinů v krmivu považovat za zcela bezpečnou.

Z těchto důvodů, pokud je požadováno provedení testu na stanovení mykotoxinů je technika vzorkování rozhodující. Vzorkování vyžaduje odebrat několik menších vzorků (optimálně 20 dílčích vzorků), jejich sloučení a důkladné promíchání před získáním konečného k analýzám použitelného vzorku.

Direktiva Evropské unie z roku 1994 stanoví vzorkovací postup, který byl upraven tak, aby měl vyšší vypovídací schopnost. Suroviny se vzorkují zásadně po sešrotování, a to v časových intervalech podle množství vyrobených tun krmiva za směnu. Obecně je dána minimální hmotnost vzorku vzorcem: odmocnina z (20 x počet tun) = kg vzorku. Tento vzorek je dokonale promíchán a z něj je odebrán minimálně 1 kg konečného vzorku k vyšetření.

Pokud jde o stanovení mykotoxinů v krmivech jsou používány sety různých výrobců, které vyžadují odlišné metodické postupy a jsou limitovány i vybavením laboratoří, např. semikvantitativní stanovení s koncovkou na kapalinovém chromatografu, nebo stanovení na tenké vrstvě. Předpokládá se přepracování metod podle požadavků EU.

## **9. Doporučená literatura**

FAO (2004): Assessing quality and safety of animal feeds. FAO Rome. 152 s. ISBN 92-5-105046-5. ISSN 0254-6019

Kalač, P., Míka, V. 1997: Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. ÚZPI Praha. 317 s. ISBN 80-85120-96-8.

Kummer, V., Faldíková, L., Herzig, I., Láníková, A. 2001: Účinky mykotoxinů na zdraví a reprodukci zvířat, diagnostika a prevence mykotoxikóz. VÚVeL Brno. 43 s.

Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., MacDonald, A.M.C. 1999: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci Technol.*, 78, (1-2): 21-37.

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., MacDonald, A.M.C. 1999: *Fusarium* mycotoxins :A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci Technol.*, 80, (3-4): 183-205.

Tabulka I. Původ nejdůležitějších mykotoxinů vyskytujících se v běžných krmivech a pícech (D’Mello, 2004)

Mykotoxiny	Druhy plísní
Aflatoxiny	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Kyselina cyklopiazonová	<i>A. flavus</i>
Ochratoxin A	<i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i>
Citrinin	<i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
Patulin	<i>P. expansum</i>
Citreoviridin	<i>P. citreo-viride</i>
Deoxynivalenol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
T-2 toxin	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>
Diacetoxyscypenol	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichoides</i>
Zearalenone	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichoides</i>
Fumonisin, moniliformin, kyselina fusarová	<i>F. moniliforme</i>
Kyselina tenuazonová, alternariol, alternariol methyl ester, altenuen	<i>Alternaria alternata</i>
Ergopeptinové alkaloidy	<i>Neotyphodium coenophialum</i>
Lolitremonové alkaloidy	<i>N. lolii</i>
Námelové alkaloidy	<i>Claviceps purpurea</i>
Phomopsisiny	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Sporidesmin A	<i>Pithomyces chartarum</i>

Tabulka II. LD50 u jednotlivých typů mykotoxinů (po perorálním podání)

Aflatoxin	AFB1	18,2 µg/ 50 g (1 denní káče)
	AFG1	39,2 µg/ 50 g (1 denní káče)
	AFB2	84,8 µg/ 50 g (1 denní káče)
	AFG2	172,5µg/ 50 g (1 denní káče)
Aflatoxiny (celkem)		370,0 µg/kg (1 denní kuře)
		500,0 µg/kg (pstruh)
		620,0 µg/kg (sele)
		7400,0 µg/kg (potkan)
Patulin		170,0 mg/kg (slepice)
		35,0 mg/kg (myš)
Ochratoxin		170,0 µg/ks (1 denní káče)
		160,0 µg/ks (slepice)
		3900,0 µg/kg (1 denní kuře)
		4600,0 µg/kg (pstruh)
		22000,0 µg/kg (potkan)
Citrinin		35,0 – 70,0 mg/kg (obecně)
T-2 toxin		4,0 mg/kg (potkan)
		3,0 mg/kg (myš)
		0,6 mg/kg (skot)
Deoxinivalenol		70,0 mg/kg (myš, i.p.)

Tabulka III. Maximální hladiny některých mykotoxinů v krmivech (FDA, 1996)

Maximální hladiny celkových aflatoxinů u krmiv		
Kategorie zvířat	Krmivo	Maximální hladina aflatoxinu
Mláďata a drůbež	Kukuřice a podzemnice	20 ppb
Dojnice	Kukuřice a podzemnice	20 ppb
Chovný skot a prasnice	Kukuřice a podzemnice	100 ppb
Dospělá drůbež	Kukuřice a podzemnice	100 ppb
Prasata ve výkrmu	Kukuřice a podzemnice	200 ppb
Výkrm skotu	Kukuřice a podzemnice	300 ppb
Výkrm skotu, prasat a drůbež	Bavlníkový šrot	300 ppb
Všechna zvířata	Ostatní krmiva	20 ppb

Maximální hladiny fumonisinu u krmiv		
Kategorie zvířat	Krmná dávka	Maximální hladina fumonisinu
Koně	KD bez objemu	5 ppm
Prasnice	Celková KD	10 ppm
Drůbež	Celková KD	10 ppm
Výkrmový skot	KD bez objemu	50 ppm
Mléčný skot	KD bez objemu	Bez doporučení

Maximální hladiny vomitoxinu u krmiv		
Kategorie zvířat	Krmná dávka	Maximální hladina vomitoxinu
Přežvýkavci a výkrmový skot starší 4 měsíců	Zrniny a produkty pod 50%	10 ppm
Kuřata	Zrniny a produkty pod 50%	10 ppm
Prasnice	Zrniny a produkty pod 20%	5 ppm
Ostatní zvířata	Zrniny a produkty pod 40%	5 ppm

Tabulka IV. Doporučené limity aflatoxinů v krmivu (Neuman aj., 1990)

Pstruzi	0,1 µg/kg
Mladá drůbež a bažanti	2,0 µg/kg
Zvířata březí a v laktaci	10,0 µg/kg
Prasata ve výkrmu a drůbež	20,0 µg/kg
Ovce a skot ve výkrmu	50,0 µg/kg



Tabulka V. Nejvyšší přípustný obsah aflatoxinu B1 v krmivech (dle vyhlášky č. 194 z roku 1996)

Babasové semeno, bavlníkové semeno, podzemnice olejná, kokosová moučka, kukuřičné zrno, palmojádro a produkty jejich zpracování	0,02 mg/kg
Ostatní krmné suroviny	0,05 mg/kg
Kompletní a doplňková krmiva pro skot, ovce, kozy s výjimkou telat, jehňat a dojnic	0,05 mg/kg
Doplňková krmiva pro prasata a drůbež s výjimkou mláďat	0,03 mg/kg
Kompletní krmiva pro prasata a drůbež s výjimkou mláďat	0,02 mg/kg
Doplňková krmiva pro dojnice v laktaci, kozy v laktaci a ovce v laktaci	0,005 mg/kg
Ostatní kompletní a doplňková krmiva	0,01 mg/kg