

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

Evidenčné číslo 2122901

**VÝSKYT *PENICILLIUM SP.* V ZRNÁCH
POTRAVINÁRSKEJ PŠENICE DOPESTOVANEJ
V REGIÓNOCH STREDNÉHO A VÝCHODNÉHO
SLOVENSKA**

2011

Veronika Spišiaková, Bc.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

**VÝSKYT *PENICILLIUM SP.* V ZRNÁCH
POTRAVINÁRSKEJ PŠENICE DOPESTOVANEJ
V REGIÓNOCH STREDNÉHO A VÝCHODNÉHO
SLOVENSKA**

Diplomová práca

Študijný program:	Výživa ľudí
Študijný odbor:	4188800 Výživa
Školiace pracovisko:	Katedra mikrobiológie
Školiteľ:	Ing. Soňa Felšöciová, PhD.

Nitra 2011

Veronika Spišiaková, Bc.

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Veronika Spišiaková vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Výskyt *Penicillium sp.* v zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej v regiónoch stredného a východného Slovenska” vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov, ak vyššie uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 17. apríla 2011

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcej diplomovej práce Ing. Soni Felšöciovej, PhD., za pomoc, cenné rady, pripomienky a usmernenie pri spracovaní diplomovej práce. Diplomová práca vznikla s podporou projektu GA SPU 739/05330.

Abstrakt

Diplomová práca poskytuje súhrnný prehľad o rode *Penicillium*, pričom sa zameriava na výskyt a toxinogenitu produkovaných mykotoxínov. Cieľom diplomovej práce bolo sledovanie mykotickej kontaminácie pšenice potravinárskej (*Triticum aestivum* L.) slovenského pôvodu dopestovanej v sezóne 2008, odobratej z regiónov stredného (5 vzoriek) a východného (6 vzoriek) Slovenska. Z celkovo 11 povrchovo sterilizovaných vzoriek pšenice a oplachu bolo vyizolovaných a identifikovaných 20 druhov penicilií na pôdach DRBC, DYSG a sladine. Najvyššie druhové spektrum (11) bolo dokázané v pšenici z Banskobystrického a Prešovského kraja a najvyššia početnosť jednotlivých analyzovaných penicilií v pšenici z Košického kraja (667). Z celkového počtu 902 izolátov sa v najvyššej miere vyskytoval druh *P. aurantiogriseum* (581), ktorý tvoril 64 % podiel izolátov a *P. chrysogenum* (131) s 15 % podielom izolátov. Zistená endomykocenóza a oplach reprezentovaná druhmi *P. carneum*, *P. citrinum*, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* a *P. verrucosum* je nepochybne významná z toxikologického hľadiska, nakoľko ide o potenciálnych producentov mykotoxínov. Takmer všetky uvedené kmene s výnimkou *P. chrysogenum* z endomykocenózy a *P. hordei* a *P. verrucosum* z oplachu produkovali aspoň jeden mykotoxín v podmienkach *in vitro* pomocou tenkovrstvovej chromatografie.

Kľúčové slová: mykotická kontaminácia, mykotoxíny, toxinogenita, tenkovrstvová chromatografia

Abstract

The thesis provides an overview of the *Penicillium* genus, it focuses on occurrence and toxigenity of produced mycotoxins. The aim of this work was to search the fungal contamination of wheat (*Triticum aestivum* L.) of Slovak origin which was produced in the 2008 season and taken from Slovakia regions of middle (5 samples) and eastern (6 samples). From a total 11 surface sterilized samples of wheat and rinsing were isolated and identified 20 kinds of penicillins in soils DRBC, DYSG and malt agar. The highest species variety (11) has been shown in wheat from Banská Bystrica and Prešov region and the highest frequency of individual analysed penicillins in the wheat from Košice region (667). From total 902 isolates the type *P. aurantiogriseum* had the highest frequency of occurrence (581), it formed 64 percents share of the isolates and *P. chrysogenum* (131) with 15 percents share of the isolates. The observed endomycocenocy and rinsing was represented by species *P. carneum*, *P. citrinum*, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* and *P. verrucosum* its very important from toxicological point of view as regards the potential producers of mycotoxins. Almost all the species with the exception of *P. chrysogenum* from endomycocenocy and *P. hordei* and *P. verrucosum* from rinsing produced at least one mycotoxin *in vitro* conditions by thin layer chromatography screening method.

Keywords: fungal contamination, mycotoxins, toxinogenity, thin layer chromatography screening method

Obsah

Zoznam tabuliek.....	8
Zoznam skratiek a značiek.....	10
Úvod.....	11
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky	12
1.1 Charakteristika mikroskopických húb	12
1.2 Mikroskopické huby kontaminujúce obilniny.....	12
1.2.1 Poľné huby	14
1.2.2 Skladové huby	15
1.3 História rodu <i>Penicillium</i>	16
1.4 Charakteristika rodu <i>Penicillium</i>	17
1.4.1 Taxonomické zaradenie.....	17
1.4.2 Mikromorfológia.....	18
1.4.3 Podrodové členenie.....	19
1.5 Výskyt a význam penicilií.....	20
1.6 Charakteristika najvýznamnejších mykotoxínov produkovaných penicíliami	23
1.6.1 Mykotoxíny	23
1.6.2 Citrinín	25
1.6.3 Grizeofulvín.....	26
1.6.4 Kyselina cyklopiazónová	26
1.6.5 Ochratoxín A	27
1.6.6 Patulín	29
1.6.7 Roquefortín C	31
1.7 Vplyv mykotoxínov na zdravotný stav človeka	32
1.8 Faktory vplývajúce na tvorbu mikroskopických húb z rodu <i>Penicillium</i>	33
1.8.1 Podmienky prostredia.....	35
1.8.1.1 Teplota.....	35
1.8.1.2 Aktivita vody	36
1.8.1.3 Kyslík	37
1.8.1.4 Doba skladovania.....	37
1.9 Ochrana populácie pred mykotoxínmi.....	38
1.9.1 Antifungálne prostriedky.....	40

2	Cieľ práce.....	42
3	Metodika práce a metódy skúmania	43
3.1	Odber vzoriek	43
3.2	Izolácia vzoriek	44
3.2.1	Endogénna mykocenóza vzoriek pšenice potravinárskej.....	44
3.2.2	Povrchová mykocenóza zrn pšenice potravinárskej	44
3.3	Materiál a metódy.....	45
3.4	Stanovenie rodu <i>Penicillium sp.</i>	46
3.5	Stanovenie toxinogenity mykotoxínov metódou TLC (<i>in vitro</i>).....	48
3.5.1	Vizualizácia jednotlivých mykotoxínov.....	49
4	Výsledky práce.....	50
4.1	Výsledky vzoriek z lokalít stredného Slovenska.....	50
4.1.1	Banskobystrický kraj.....	50
4.1.2	Žilinský kraj.....	53
4.1.3	Celkové mykotické zastúpenie penicilií vo vzorkách z krajov stredného Slovenska.....	56
4.2	Výsledky vzoriek z lokalít východného Slovenska.....	59
4.2.1	Košický kraj.....	59
4.2.2	Prešovský kraj.....	61
4.2.3	Celkové mykotické zastúpenie penicilií vo vzorkách z krajov východného Slovenska.....	64
4.2.4	Celkové mykotické zastúpenie penicilií vo vzorkách z regiónov stredného a východného Slovenska	67
4.3	Toxinogenita izolovaných penicilií	70
4.3.1	Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Banskobystrického kraja ..	70
4.3.2	Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Žilinského kraja	71
4.3.3	Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Košického kraja	71
4.3.4	Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Prešovského kraja	72
4.3.5	Toxinogenita izolovaných penicilií z regiónov stredného a východného Slovenska.....	73
5	Diskusia	75
6	Návrh na využitie výsledkov.....	78
7	Záver.....	79
8	Zoznam použitej literatúry.....	81

Zoznam tabuliek

Tab. č. 1	Taxonomická schéma rodu <i>Penicillium</i>	17
Tab. č. 2	Výskyt penicilií v rôznych komoditách.....	21
Tab. č. 3	Potravinársky dôležité druhy rodu <i>Penicillium</i>	22
Tab. č. 4	Najvyššie prípustné množstvá OTA.....	28
Tab. č. 5	Najvyššie prípustné množstvá patulínu.....	30
Tab. č. 6	Ochorenia u človeka vyvolané mykotoxínmi	33
Tab. č. 7	Minimálne hodnoty teplôt a aktivity vody (a_w) pre vybrané druhy penicilií	36
Tab. č. 8	Vybrané regióny, kraje a lokality odberu vzoriek pšenice potravinárskej v roku 2008	43
Tab. č. 9	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Banskobystrického kraja v sezóne 2008	51
Tab. č. 10	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 2 vzoriek pšenice zo Žilinského kraja v sezóne 2008.....	54
Tab. č. 11	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z oboch krajov stredného Slovenska v sezóne 2008	57
Tab. č. 12	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Košického kraja v sezóne 2008.....	60
Tab. č. 13	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Prešovského kraja v sezóne 2008...	62
Tab. č. 14	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z oboch krajov východného Slovenska v sezóne 2008	65
Tab. č. 15	Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z regiónov stredného a východného Slovenska v sezóne 2008.....	68
Tab. č. 16	Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (<i>in vitro</i>) zo vzoriek pšeničných zrn z Banskobystrického kraja v sezóne 2008	70

Tab. č. 17	Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (<i>in vitro</i>) zo vzoriek pšeničných zrn zo Žilinského kraja v sezóne 2008	71
Tab. č. 18	Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (<i>in vitro</i>) zo vzoriek pšeničných zrn z Košického kraja v sezóne 2008	72
Tab. č. 19	Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (<i>in vitro</i>) zo vzoriek pšeničných zrn z Prešovského kraja v sezóne 2008	73
Tab. č. 20	Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (<i>in vitro</i>) zo vzoriek pšeničných zrn z oboch regiónov stredného a východného Slovenska v sezóne 2008.....	74

Zoznam skratiek a značiek

A.	<i>Aspergillus</i>
a _w	aktivita vody
C	citrinín
CPK	kyselina cyklopiazónová
CREA	agar s kreatínom a sacharózou
CYA	Czapkov agar s kvasničným extraktom
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRBC	agar s dichlóranom, chlórarnfenikolom a Bengálskou červeňou
DYSG	agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom
FAO	Food and Agriculture Organisation, (Svetová organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo)
G	grizeofulvín
GAC	granulovaný aktivovaný uhlík
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point (analýza rizík kritických kontrolných bodov)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, (vysokotlaková kvapalinová chromatografia)
KTJ	kolóniu tvoriaca jednotka
MBTH	3-metyl-2-benzotiazolióňhydrazón-hydrochlorid
MEA	agar so sladivým extraktom
OTA	ochratoxín A
P	patulín
P.	<i>Penicillium</i>
P. sp.	<i>Penicillium species</i>
RC	roquefortín C
RNA	ribonukleová kyselina
RÚVZ	Regionálny úrad verejného zdravotníctva
TEF	vyvíjacia sústava toluén, etylacetát, kyselina mravčia
TLC	Thin Layer Chromatography, (tenkovrstvová chromatografia)
YES	agar s kvasničným extraktom so sacharózou

Úvod

Obilniny sú neoddeliteľnou súčasťou vyváženej a plnohodnotnej výživy. Majú dominantné postavenie, pretože zabezpečujú hlavný podiel denného energetického príjmu. Celosvetovo najviac využívanou obilninou na svete je pšenica letná forma ozimná (*Triticum aestivum L.*), považovaná za základ výživy, najmä ak sa vyskytuje v celozrnej podobe. Pšeničné zrná využívané na produkciu potravín sú možným zdrojom biologických kontaminantov, pričom medzi prvých kolonizátorov patria aj vláknité mikroskopické huby - mikromycéty.

V súčasnosti sa do popredia dostáva problematika kontaminácie obilnín, keďže zložením predstavujú ideálny substrát pre rast a množenie mikroskopických húb. Ku kontaminácii obilných komodít často dochádza v skladových priestoroch, čo má za následok nedodržanie vhodných skladovacích podmienok (neprimeraná vlhkosť, teplota, pH, doba skladovania a i.). Medzi najvýznamnejšie skladové mikromycéty patria druhy rodov *Aspergillus* a *Penicillium*, pričom predkladaná diplomová práca sa zaoberá problematikou kontaminácie rodom *Penicillium sp.*

Okrem priameho znehodnotenia pšeničných zrn peniciliami, čo sa prejavuje vizuálnymi zmenami alebo potuchnutím, produkujú peniciliá toxické sekundárne metabolity – mykotoxíny. Sú to stabilné, ťažko degradovateľné toxické látky, ktoré prenikajú do ľudského organizmu a vyvolávajú vážne akútne, resp. chronické poruchy zdravotného stavu.

Výskyt mikroskopických húb neznamena automaticky produkciu mykotoxínov, pretože schopnosť produkovať mykotoxíny je variabilná, často býva na dlhšiu dobu utlmená. Na druhej strane je nutné pripomenúť, že konkrétny druh penicilia môže produkovať súčasne aj viac druhov mykotoxínov. Mykotoxinogénna kontaminácia pšenice a iných komodít je často nepredvídateľná, preto sú v praxi potrebné pravidelné odbery a analýzy vzoriek z rôznych lokalít Slovenska s dôrazom na zisťovanie toxigenity. Najúčinnějšíou metódou na zabránenie kontaminácie obilnín je dodržiavanie prevencie počas vegetačného obdobia, ako aj po zbere.

Sľubné výsledky poskytuje v súčasnej dobe aj genetické inžinierstvo, ktoré skúma využitie antifungálnych génov, ktoré by mohli zvýšiť odolnosť odrôd voči mykotickej kontaminácii.

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Charakteristika mikroskopických húb

Agroekosystém je otvorená sústava, kde prítomnosť vláknitých mikroskopických húb je bežnou a nevyhnutnou skutočnosťou (Vaňová, 2008). Mikroskopické huby (mikromycéty) sú prítomné takmer všade, v pôde, vo vzduchu, vo vode, na rastlinách, surovinách i hotových výrobkoch. Zdrojom je najčastejšie pôda, v ktorej sa podieľajú na rozklade organických látok, na tvorbe humusu a pod. (Števlíková et al., 2007b). Mikroskopické huby sa nachádzajú na uskladnených produktoch rastlinného i živočíšneho pôvodu, ktoré môžu za nevhodných skladovacích podmienok znehodnocovať.

Mikroskopické huby zaraďujeme medzi jednobunkové alebo viacbunkové heterotrofné organizmy (Števlíková et al., 2007a). Vyznačujú sa pomerne vysokou rýchlosťou rastu a rozmnožovania, čo im umožňuje za pomerne krátku dobu osídliť rozsiahle masy substrátu (Števlíková et Kopčanová, 1994). Typická je pre nich mycéliová stavba, ktorá umožňuje vysoký stupeň kontaktu s prostredím. K šíreniu dochádza vegetatívne alebo prostredníctvom spór, ktoré sa v prostredí šíria vetrom a hmyzom (Rajčáková et Mlynár, 2005). Mikromycéty sú definované radom morfológických, genetických a fyziologických zvláštností a bohatá enzymatická výbava im umožňuje rozložiť rozmanité organické materiály vrátane kože, tkanív, papiera, syntetických farbív, niektorých druhov plastov a pod.

Mikroskopické huby sa podieľajú na ochoreniach rastlín (fytopatogénne huby), zvierat i ľudí. U ľudí prostredníctvom vdychnutia spór vyvolávajú alergie. Mikroskopické huby sú schopné prenikať cez tkanivá a vyvolať infekčné ochorenia - mykózy. V súčasnosti sa pozornosť upriamila na mikromycéty produkujúce toxické sekundárne metabolity nazývané mykotoxíny, ktoré vyvolávajú tzv. mykotoxikózy.

1.2 Mikroskopické huby kontaminujúce obilniny

V súčasnosti sa problematika kontaminácie obilnín mikroskopickými hubami, ako aj mykotoxínmi dostáva do popredia a to najmä zo strany potravinovej bezpečnosti. Obilniny sa pre mnohostranné využitie radia k najvýznamnejším druhom kultúrnych plodín

(Karabínová et al., 1997). Pšenica a produkty z nej vyrábané majú vo výžive ľudí svoje nezastupiteľné miesto. Na druhej strane je potrebné si uvedomiť, že hlavným zdrojom toxických metabolitov vo výžive ľudí sú práve kontaminované obilniny a produkty z nich vyrobené (Šudyová et al., 2005). Obilniny predstavujú vhodný substrát pre rast a rozmnožovanie vláknitých mikroskopických húb, aj v prípade nevhodných skladovacích podmienok, ako je vysoká vlhkosť a zvýšená teplota (Pitt et Hocking, 1997; Kubátová, 2000).

Mikroskopické huby kontaminujúce obilniny sa vyskytujú na povrchu obiliek vo forme spór (Tančinová et al., 2008). Dostatočná vlhkosť na povrchu zrna postačuje na klíčenie a rast spór, čo sa vizuálne prejaví farebnými zmenami zrna (Lacey et Magan, 1991).

Podľa Tančinovej et al. (2005), mikroskopické huby osídľujú aj vnútro obiliek (vo forme mycélia), pričom sa kontaminované zrno farebne nezmení. Mikroskopické huby menia kvalitu zrn, znižujú klíčivosť a nutričné vlastnosti (Ramos et al., 1998), napríklad klasy a napadnuté zrná majú zhoršenú chlebopekársku kvalitu, teda zníženú sedimentačnú schopnosť a obsah bielkovín (Šudyová et al., 2005). Najvyššie hodnoty mykotickej kontaminácie obilnín sú zaznamenávané najmä počas zberu, kedy môžu dosahovať až 10^6 KTJ mikroskopických húb v jednom grame (Tančinová et al., 2001). Riziko nastáva najmä vtedy, keď sa takto napadnuté zrná použijú ako surovina do potravinárskych výrobkov alebo krmných zmesí (Šudyová et al., 2005). Za optimálnych podmienok skladovania počet mikroskopických húb klesá (Tančinová et al., 2001).

Mykoflóra skladovanej obilnej masy sa mení v závislosti od podmienok skladovania. Napr. niektoré druhy rodu *Penicillium*, ako *Penicillium verrucosum* a *Penicillium solitum* nájdeme len v miernych klimatických podmienkach (Frisvad et Filtenborg, 1989), zatiaľ čo *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium commune* a *Penicillium echinulatum* sa bežne vyskytujú celoplošne vo svete (Frisvad et Samson, 1991).

Podľa Jesenskej (1987) sa všeobecne rozoznávajú dve najdôležitejšie ekologické skupiny mikroskopických vláknitých húb, ktoré sa vyskytujú v obilných zrnách. Sú to poľné a skladové huby.

1.2.1 Poľné huby

Za poľné huby sú pokladané mikroskopické huby, ktoré osídľujú obilné zrná už na poli (Jesenská, 1987) a prejavy napadnutia je možné na obilninách pozorovať počas celej vegetácie, no niektoré druhy môžu byť problémové aj v skladoch (Šudyová et al., 2005). Poľné huby možno zaradiť medzi hydrofilné mikroskopické huby, pretože im vyhovuje vyšší stupeň vodnej aktivity, s výnimkou fuzárií nedeštruujú zárodok zrna, nezapríčiňujú osobitné biochemické zmeny, ani samozahrievanie zrna (Jesenská, 1987). Tieto huby môžu negatívne ovplyvňovať kvalitu zrn produkciou mykotoxínov (Filtenborg et al., 2002). Belajová (2007) zdôrazňuje, že ak ku kontaminácii dochádza na poli, rast mikroskopických húb môže pokračovať aj v pozberovom období a počas skladovania, avšak skladovaním obilia pri nízkej vlhkosti, je rast a rozmnožovanie poľných húb úplne potlačený. Medzi najznámejšie rody poľných húb patria: *Alternaria*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Epicoccum* a iné.

Druhy rodu *Alternaria* sa vyskytujú ako rastlinné patogény, avšak najčastejšie napádajú obilné zrná. Kontaminácia alternáriami je podmienená aj kvalitou zrna, osídľujú prevažne kvalitnejšie zrná (Kosiak et al., 2004). Rozšírený výskyt alternárií na pšenici a ich schopnosť produkovať mykotoxíny poukazuje na možnú prítomnosť toxínov v pšenici (Mašková et al., 2011). Najvyššia úroveň rozkladu obilnín druhom *Alternaria tenuissima* bola zaznamenaná pri pH 6,8 (Fapohunda et Olajuyigbe, 2006).

Rod *Fusarium* kontaminuje prevažne zrno so zníženou kvalitou (Kosiak et al., 2004). Stupeň napadnutia fuzáriami je závislý od agroklimatických podmienok. Vyššie výskyty sú zaznamenané predovšetkým vo vlhších oblastiach alebo v rokoch s daždivým počasím (Vaňová et al., 2000). Mycélium fuzárií parazituje na povrchu obilky a preniká aj do zárodku (Šudyová et al., 2005).

Štúdie ukázali, že stres zo sucha, ktorý nasleduje po dostatočne vlhkom období má za následok rast *Fusarium moniliforme* a produkciu fumonizínov. Za jeden z dôležitých faktorov v rozširovaní inokula je obeh úrody. Poľné pokusy potvrdili, že výsledkom sezónnej výsadby v poradí kukurica - sója je menej rozsiahla tvorba fuzárií než pri poradí kukurica – kukurica (Belajová, 2007).

Ako uvádza Tančinová (2008), rast húb a produkcia mykotoxínov je v poľných podmienkach ovplyvnená viacerými faktormi:

- rezistenciou odrody
- fyziologickým stresom obilnín
- lokalitou

- počasím počas vegetácie, resp. počas žatvy
- obrábaním pôdy
- výberom správnej predplodiny
- dodržaním termínu zberu
- správnou fungicídnu ochranou

1.2.2 Skladové huby

Mikroskopické huby spôsobujú straty na obilninách i počas skladovania. Údaje o stratách obilnín počas skladovania sú veľmi rozdielne (1 až 50 %). Príčinou týchto strát sú práve vláknité mikroskopické huby, ktoré sú prítomné buď samostatne alebo spolu s hmyzom (Tančinová, 2008).

Skladové huby tvoria samostatnú skupinu mikroskopických vláknitých húb (Jesenská, 1987). Ako kontaminanty sa do skladových priestorov dostávajú na povrchu obiliek s prachovými časticami, požatvovou manipuláciou (Tančinová, 1997), rastlinnými zvyškami vo vreciach a pod. (Jesenská, 1987).

Skladové huby sú nenáročné na vlhkosť, rozmnožujú sa pri 17 – 20 % vlhkosti, pri optimálnej teplote 25 až 30 °C (Jesenská, 1987), ale za určitých okolností (prudké výkyvy teplôt) môže v uskladňovaných obilninách nastať klíčenie spór a rast skladových húb už pri 13 % vlhkosti (Rajčáková et Mlynár, 2005). Podľa Smith et Ross (1991) pri skladovaní substrátov s nízkou vlhkosťou, ako sú napr. obilniny a krmivá zvierat, xerofilné druhy rodov *Aspergillus* a *Penicillium* sú zvyčajne úplne dominantné.

Medzi skladové huby patria už spomínané kmene rodov *Aspergillus* a *Penicillium*. Z rodov *Aspergillus* sa vyskytujú najmä kmene druhov *A. candidus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. ruber*, *A. ochraceus*, *A. glaucus* a pod. Z rodu *Penicillium* sa ako skladové huby vyskytujú napr. *P. oxalicum*, *P. chrysogenum*, *P. viridicatum*, *P. palitans*, *P. spinulosum* a iné (Jesenská, 1987). Tančinová et Labuda (2006) sledovali mykotickú kontamináciu pšenice odobranú z veľkokapacitných skladov zo zberov v rokoch 2003 a 2004. Boli izolované tieto druhy penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. raistrickii* a *P. viridicatum*. Podobne aj Felšöciová et al. (2009) zo vzoriek pšenice zo západného a stredného Slovenska zberaných v rokoch 2006/2007

popisujú široký výskyt druhov *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum* a *P. viridicatum*.

1.3 História rodu *Penicillium*

História štúdia rodu *Penicillium* sa datuje do začiatku 19. storočia a je pomerne dlhá a rozsiahla. Prvotné pomenovanie *Penicillium* bolo použité ako rodové označenie v roku 1809 nemeckým mykológom Linkom pre konidiálne štádium huby. Postupne sa mykológovia 19. storočia začali sústreďovať na zástupcov tohto rodu spočiatku mikroskopickým pozorovaním na prirodzenom substráte. Neskôr nasledovalo využitie čistých kultúr penicilií vykultivovaných za štandardných podmienok, až sa začali používať umelé médiá zaisťujúce stálosť zloženia živín (Kubátová, 1995a).

Nemecký mykológ Brefeld v roku 1874 ako prvý pozoroval askospórové štádium v súvislosti s konidiálnymi štruktúrami rodu *Penicillium*. Neskôr sa zistilo, že niektoré druhy rodu *Penicillium* sú spojené s teleomorfným rodom *Talaromyces*. V roku 1901 prírodovedec Dierckx popísal 25 nových druhov rodu *Penicillium*, pričom po prvýkrát zverejnil svoj návrh rozčlenenia rodu na dva podrody: *Aspergilloides* a *Eupenicillium* (Kubátová, 1995a).

V USA sa začal štúdiu penicilií venovať anglický mykológ Thom, ktorý v roku 1903 publikoval rozsiahlu monografiu s popisom 300 druhov a tiež s kľúčom na ich určenie. Táto jedinečná monografia tvorí dovtedy prvú ucelenú klasifikáciu rodu. Thom rozdelil rod *Penicillium* do štyroch podrodov: *Monoverticillata*, *Asymmetrica*, *Biverticillata - Symmetrica*, *Polyverticillata - Symmetrica* (Kubátová, 1995a).

V ďalších rokoch obohatili históriu rodu významní mykológovia, ako napríklad Bainier, ktorý popísal viac ako 30 druhov rodu *Penicillium*, Biourge, Raper a Thom, ktorí sa podieľali na vydaní príručky na určovanie penicilií.

60. a 70. roky boli zamerané na štúdium teleomorfných rodov *Eupenicillium* a *Talaromyces*. Najväčšie zásluhy na týchto štúdiách majú Stolková a Samson (Stolk et Samson, 1972).

V 80. a 90. rokoch obohatili históriu rodu *Penicillium* austrálsky bádateľ Pitt a španielsky mykológ Ramirez. Pitt pomocou fyziologických štúdií objavil ďalších 97 nových druhov rodu *Penicillium* a 53 nových druhov uvádza v súvislosti s teleomorfnými rodmi *Talaromyces* a *Eupenicillium*. Na základe vetvenia konidiofórov zaradil rod

Penicillium do štyroch základných podrodov: *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* a *Penicillium*, pričom toto členenie pretrváva nezmenené dodnes. Ramirez sa vo svojej monografii, ktorú obohatil aj farebnou obrazovou prílohou, zameril na druhy rodu *Penicillium* bez teleomorfných štádií.

Využitím sekundárnych metabolitov v taxonómii sa začiatkom 80. rokov začali venovať Filtenborg a Frisvad. Podieľali sa na zjednodušení metódy tenkovrstvovej chromatografie (TLC), pričom došlo k zdokonaleniu metód vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s detekciou ultrafialových spektier (Frisvad et Thrane, 1987). Ďalšie pokrokové metódy využívané v taxonómii penicilií sú gélová elektroforéza izoenzymov (Pitt et Cruickshank, 1990) a implementácia molekulových metód (Skouboe et al., 2000).

V súčasnosti sa pozornosť zameriava najmä na štúdium penicilií, ktoré sú potenciálnymi producentmi mykotoxínov. Dôležitá je najmä medzinárodná spolupráca v oblasti taxonómie druhov rodu *Penicillium*, čo prispeje k zjednoteniu a lepšiemu pochopeniu problematiky.

1.4 Charakteristika rodu *Penicillium*

1.4.1 Taxonomické zaradenie

Tab. č. 1: Taxonomická schéma rodu *Penicillium* (de Hoog et al., 2000)

Doména :	<i>Eukaria</i>
Oddelenie:	<i>Ascomycota</i> (vreckaté huby)
Trieda:	<i>Euascomycetes</i>
Rad:	<i>Eurotiales</i> (paplesňotvaré)
Čeľaď:	<i>Trichocomaceae</i>
Rod:	<i>Penicillium</i>
Podrody:	<i>Aspergilloides</i> , <i>Biverticillium</i> , <i>Furcatum</i> , <i>Penicillium</i>

Definícia rodu

Rod *Penicillium* sa definuje ako rod mikromycét s produkciou konídií, ktoré sa vytvárajú z praslenu fialíd. Konídie sa vyskytujú v rôznych odtieňoch zelenej farby. Fialidy bývajú zakončené krátkymi rovnými krčkami, steny fialíd sú zväčša hladké, tvorené zo stopky, alebo postupne z metuly (Pitt, 2000).

1.4.2 Mikromorfológia

Konídiofór je fruktifikačný orgán penicilií, vyrastajúci z fertilnej hýfy. Je tvorený stopkou a vetvenou časťou nazývanou *penicillus*.

Stopka (stipes) predstavuje časť konídiofóru, ktorá vyrastá z fertilnej hýfy, nesúca *penicillus*. Stopka môže byť terminálne ukončená rozšírenou časťou, tzv. vezikulou. Stopka je považovaná za vezikulárnu, ak priemer terminálneho rozšírenia prekročí dvojnásobný priemer hrúbky stopky. Steny stopky môžu byť hladké, drsné, prípadne bradavičnaté.

Vetvy môžeme definovať ako všetky bunky nachádzajúce sa medzi stopkou a metulami (Ramirez, 1982). V závislosti od stupňa vetvenia rozoznáva Pitt (1979, 1985) *ramy* a *ramuly*.

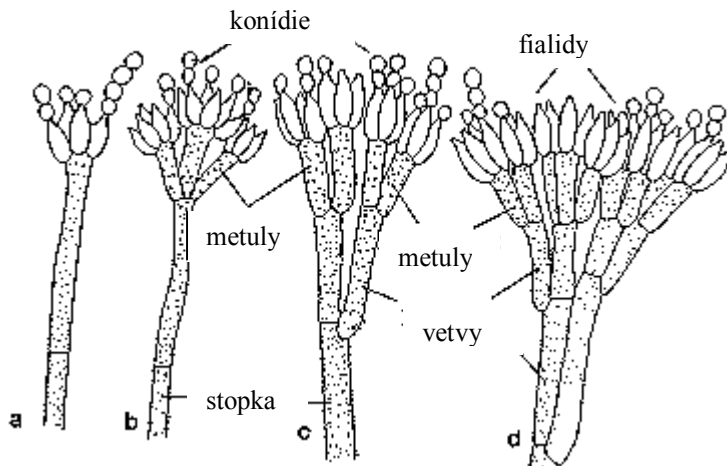
Metuly sú valcovité bunky vyrastajúce v praslenoch priamo zo stopky, alebo na jednej až viacerých vetvách.

Fialidy (sterigmy) (Raper et Thom, 1949) sú reprodukčné orgány produkujúce konídie. Fialidy vyrastajú z metúl, alebo priamo zo stopky. Tvar fialíd je významným taxonickým znakom. Rozoznávame dva tvary fialíd a to *ampuliformný* (fľaškovitý) a *acerózny* (ihlicovitý). Terminálna časť fialidy – krček - *collula* je dôležitý z hľadiska taxonómie, u niektorých druhov je typicky dlhý alebo krátky (Ramirez, 1982). Fialidy na konídiofóre vytvárajú tvar štetín. Štetce penicilií majú typický vejárovitý tvar (Marvanová, 1995).

Konídie sú jednobunkové štruktúry, slúžia na nepohlavné rozmnožovanie. Tvoria sa v retiazkach, vytvárajú stĺpce alebo rozbiehavé útvary (Pitt, 2000). Dôležitý znakom je tvar,

povrch a veľkosť konídií. Konídie môžu byť globózne (guľovité), ovoidné (vajcovité), elipsovité, hladké alebo rôzne drsné.

Obr. č. 1: Morfológická štruktúra rodu *Penicillium* s jednotlivými typmi konídiofórov (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/penic3>).



- a- konídiofór monoverticilátny
- b- konídiofór symetrický biverticilátny
- c- konídiofór asymetricky vetvený terverticilátny
- d- konídiofór divarikátny

1.4.3 Podrodové členenie (Pitt, 1979):

1. Podrod *Aspergilloides* tvoria monoverticilátne druhy. Fialidy v tomto podrode sú *ampuliformného* (fľaškovitého) tvaru.
2. Podrod *Biverticillium* zahŕňa biverticilátne druhy s úzkymi fialidami *acerózneho* tvaru. Druhy produkujú elipsovité alebo hruškovité konídie.
3. Podrod *Furcatum* zahŕňa druhy produkujúce dva typy biverticilátnych penicilov.
 - Prvý typ pozostáva z vrcholového praslenu 2 - 5 metúl, je morfológicky podobný podrodu *Biverticillium*, pričom sa odlišuje fialidami *ampuliformného* tvaru.
 - Druhý typ možno definovať ako nepravidelný. Niektoré druhy tohto podrodu sú spojené s monoverticilátnymi formami, iné produkujú vetvy, ktoré sú divergentné a vyrastajú subterminálne.

4. Podrod *Penicillium* je charakteristický terverticilátnymi druhmi, menej často sa vyskytujú kvaterverticilátne druhy penicilií. Najmenší podiel tvoria biverticilátne peniciliá. Tvar fialíd je takmer vždy *ampuliformný*.

1.5 Výskyt a význam penicilií

Peniciliá patria medzi najbohatšie konidiálne rody s celosvetovým rozšírením. Sú to prevažne saprofytické huby, ktoré sa podieľajú na degradácii organického materiálu. Peniciliá sa vyskytujú ubikvitárne v pôde, ovzduší, vo vode, na rastlinnom aj živočíšnom substráte, na povrchu živých organizmov, taktiež v tráviacom trakte, na rôznych surovinách a výrobkoch (Kubátová, 1995b).

Rod *Penicillium* patrí k tzv. *vzdušným hubám* (air - borne fungi), ktoré sa vyskytujú celosvetovo v atmosférickom vzduchu a následne sa prostredníctvom vdychovania objavujú aj na sliznici človeka. Prevládajúcim druhom je *Penicillium decumbens*, spôsobujúci respiračné ochorenia, ako napr. asthma bronchiale. Účasť penicilií v patogeneze respiračných ochorení je potvrdená imunologickou reakciou pacientov. Ďalším striktným patogénom z rodu *Penicillium* je *Penicillium marneffeii*, ktorý sa endemicky vyskytuje najmä v juhovýchodnej Ázii. Nákaza sa šíri inhaláciou spór, pričom jediným zdrojom infekcie je pôda, ako prirodzené prostredie tohto druhu penicilia (Tomšíková, 1995; de Hoog et al., 2000). Mnohé z druhov rodu *Penicillium* už nemožno považovať za neškodné saprofyty, ako sa to predpokladalo v minulosti a mali by byť zahrnuté medzi podmienené patogény (Tomšíková, 1995). Medzi najviac uvádzané druhy patria *P. chrysogenum*, *P. aurantiogriseum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. purpurogenum*, *P. variabile* a *P. janthinellum*.

Peniciliá sa často vyskytujú ako kontaminanty poľnohospodárskych produktov. Vo všeobecnosti sa považujú za skladové huby (Betina, 1990), tým že napádajú mechanicky poškodené zrná obilnín. K najbežnejším druhom na skladovaných obilninách na celom svete patria *P. aurantiogriseum* a príbuzné druhy *P. aurantiovirens*, *P. cyclopium*, *P. melanoconidium*, *P. neoehinulatum*, *P. polonicum*, *P. tricolor*, *P. viridicatum* (Lund et Frisvad, 1994).

Ako patogény kukurice uvádza Malíř et al. (2003) druhy *P. citrinum*, *P. commune*, *P. digitatum*, *P. oxalicum*, *P. purpurogenum*.

Peniciliá okrem obilnín pôsobia ako deštruktívne patogény aj na jablká, exotické ovocie, sladké zemiaky, cesnak, džúsy, korenie, mäsové výrobky a pod. Spojitosť medzi určitou komoditou a konkrétnym druhom penicilia vyjadruje tabuľka č. 2. napr. *Penicillium digitatum* spôsobuje zelenú hnilobu citrónov, *Penicillium expansum* hnedú hnilobu jablák.

Tab. č. 2: Výskyt penicilií v rôznych komoditách (Filtenborg et al., 2002).

Komodita	Druh
citrusové ovocie	<i>P. digitatum, P. italicum, P. ulaisens</i>
cesnak a cibuľa	<i>P. allii, P. albocoremium, P. glabrum</i>
rajčiny	<i>P. olsonii</i>
sladké zemiaky	<i>P. sclerotigenum</i>
pšeničné a ražné zrno (skladovacie podmienky)	<i>P. auratiocandidum, P. cyclopium, P. freii, P. hordei, P. melanoconidium, P. polonicum, P. verrucosum, P. viridicatum</i>
ražný chlieb	<i>P. roqueforti, P. paneum, P. carneum, P. corylophilum</i>
koreniny	<i>P. islandicum, P. neopurpurogenum, P. citrinum</i>
orechy, škrupinové ovocie	<i>P. commune, P. crustosum, P. discolor, P. solitum, P. funiculosum, P. oxalicum, P. citrinum</i>
syry	<i>P. commune, P. nalgiovense, P. atramentosum, P. nordicum</i>
tuky, margaríny	<i>P. echinulatum, P. commune, P. solitum, P. spinulosum</i>
fermentované klobásy	<i>P. nalgiovense, P. olsonii, P. chrysogenum, P. nordicum, P. oxalicum, P. commune</i>

Niektoré peniciliá sú viazané na určitý druh substrátu, zriedkavo osídľujú aj netradičné substráty, ako napríklad krovky hmyzu, perie vtákov, srst', vnútorné orgány cicavcov, omietky domov, prostredie archívov, šatní, spíčov (Fassatiová, 1995). V roku 2007 identifikovali pracovníci RÚVZ v bandaskách športovcov druhu *P. corylophilum*, *P. chrysogenum* a *P. waksmanii* (Výročná správa RÚVZ v Martine, 2007).

Existujú aj vzácne druhy penicilií, ktorých určenie je pomerne náročné. Medzi ne možno zaradiť druh *Penicillium aculeatum*, izolovaný v roku 2004 Labudom et Labudovou z lesnej smrekovej pôdy v Arboréte Tesárske Mlyňany, *Penicillium inflatum*, izolovaný z lesnej pôdy severne od Brna (Marvanová, 1995) a iné.

Prítomnosť a pôsobenie penicilií možno hodnotiť aj z pozitívnej stránky. Peniciliá majú dôležité postavenie v potravinárskom priemysle, farmácii a výskume.

Penicillium chrysogenum je známy ako prvý druh produkujúci antibiotikum penicilín. Kmene tohto druhu sa využívajú v potravinárstve pri príprave chlebových zmesí, alebo k zachovaniu farby u mliečnych výrobkov. Pre svoju historickú a ekonomickú hodnotu sa mykológovia zhodli na zjednotení pomenovaní u tohto druhu penicilia, ide o tzv. nomen conservandum, čiže zachovanie názvu, keďže tento významný druh má niekoľko synonym, napr. *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium rubens* a pod. (Fassatiová, 1995).

Penicillium roqueforti je neoddeliteľnou súčasťou výroby syrov roquefortského typu, vytvára zamatovo zelené formy, ktoré kolonizujú v dutinách a trhlínach syra. Spóry tohto druhu sa pridávajú do štartéra alebo čerstvého tvarohu, pričom sa produkujú proteolytické enzýmy, ktoré dodávajú syru typickú chuť (Boysen et al., 2000).

Tab. č. 3: Potravinársky dôležité druhy rodu *Penicillium* (Nout, 2002).

Druh	Substrát	Produkt	Využitie
<i>P. roqueforti</i>	čerstvý tvaroh	syry roquefortského typu	ochutené proteínové potraviny
<i>P. camemberti</i>	čerstvý tvaroh	syry camembertskeho typu	ochutené proteínové potraviny
<i>P. nalgiovense</i> <i>P. chrysogenum</i>	klobása, mäso	saláma	proteínové potraviny

1.6 Charakteristika najvýznamnejších mykotoxínov produkovaných peniciliami

1.6.1 Mykotoxíny

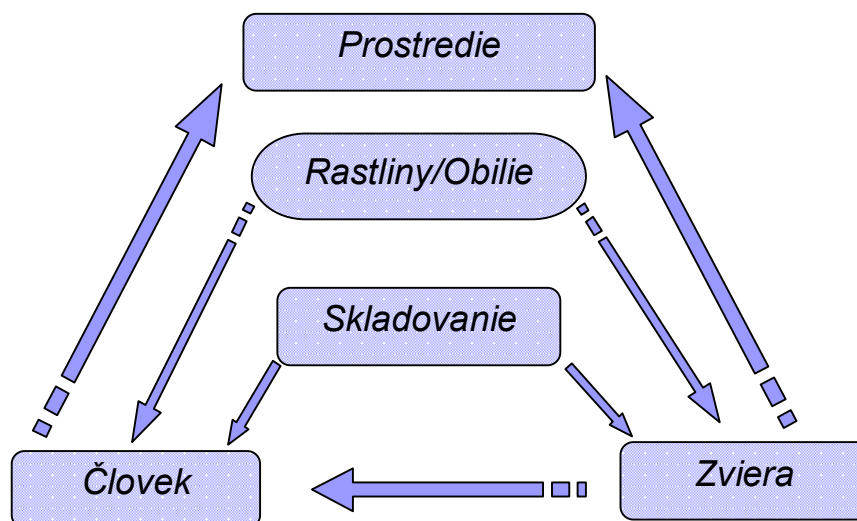
Pomenovanie *mykotoxín* je odvodené od gréckeho slova *mycos*, čo znamená *huba* a od latinského slova *toxicum*, čo znamená *jed* (Quillien, 2002). Mykotoxíny sú toxické sekundárne metabolity (Belajová, 2007), ktoré vznikajú ako produkty látkovej premeny mikroskopických húb (Šalgovičová, 2007). Sú to stabilné zlúčeniny s rozmanitou chemickou štruktúrou a keďže nemajú jednotný mechanizmus účinku, ťažko sa degradujú. Kontaminácia mykotoxínmi je v prírode veľmi heterogénna, je nepredvídateľná a vyžaduje si veľkú pozornosť (Belajová, 2007). V súčasnosti je po chemickej a biologickej stránke definovaných približne 400 mykotoxínov (Rajčáková et Mlynár, 2005).

Mykotoxíny sú prírodné kontaminanty cereálií, preto ich bežne môžeme nájsť v malých množstvách na úrode obilnín. Objavujú sa na zrnách cereálií na poliach alebo počas skladovania a pre ich vysokú stabilitu ich možno nájsť aj v opracovaných potravinárskych výrobkoch, čím predstavujú potenciálne riziko pre zdravie ľudí (Quillien, 2002). Nepredstavujú však riziko infekčnej povahy, ale môžu sa vyskytovať vo veľkom rozsahu v poľnohospodárskych plodinách, prevažne v obilninách, olejninách a výrobkov z nich (Beardall et Miller, 1994).

Obilniny môžu byť súčasne kontaminované aj viacerými mykotoxínmi, ktoré môžu byť produkované viacerými, ale i jediným producentom. Prítomnosť potenciálneho producenta mykotoxínov ešte neznamená prítomnosť mykotoxínu v danej komodite. Upozorňuje však na riziko jeho možnej prítomnosti, resp. produkcie (Tančinová, 2008).

Sekundárne môžu mykotoxíny prenikať do potravinového reťazca aj z potravín živočíšneho pôvodu. V tele hospodárskych zvierat sa kumulujú toxíny do vnútorností (pečeň, obličky), ale určité množstvo sa môže dostať aj do svaloviny, mlieka alebo vajec (Šudyová et al., 2005). Takýmto spôsobom dochádza k tzv. kolobehu mykotoxínov (obr. č. 2) (Stareková, 2001).

Obr. č. 2: Kolobeh mykotoxínov (Stareková, 2001).



Takmer všetky vláknité mikroskopické huby vyskytujúce sa v potravinách a krmivách sú schopné produkovať mykotoxíny v čistých kultúrach za laboratórnych podmienok (Frisvad et Thrane, 2002). Z hľadiska kontaminácie a produkcie mykotoxínov v potravinách a krmivách považujú Pitt et Hocking (1997) za dôležité viac ako 75 druhov z rodu *Penicillium*.

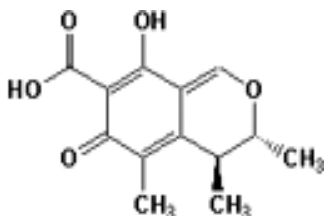
Stanovením sekundárnych metabolitov – mykotoxínov sa môže doceliť klasifikácia jednotlivých druhov penicilií, keďže dnes je známych viac ako 300 druhov penicilií, ktoré sa morfológicky veľmi ťažko určujú. Pozitívum spočíva v dobre prepracovaných metodikách stanovenia mykotoxínov. Schopnosť mikromycéta syntetizovať mykotoxín patrí v praxi medzi najdôležitejšie vlastnosti. Za nevýhodu možno pokladať skutočnosť, že nie každý izolát rovnakého druhu penicilia produkuje mykotoxíny (Veselá et Veselý, 1995).

V čoraz väčšej miere sa na kontaminácii podieľajú aj nové typy mykotoxínov. Informácie o toxicite, stabilite a rozsahu výskytu sú pri niektorých mykotoxínoch obmedzené. Navyše bolo zistené, že mykotoxíny pri kontaminácii spolupôsobia, napr. citrinín a ochratoxín A (Belajová, 2007).

Medzi najvýznamnejšie mykotoxíny produkované rodom *Penicillium* možno zaradiť (podľa abecedného poradia) citreoviridín, citrinín, erytroskyrín, grizeofulvín, islanditoxín, kyselinu cyklopiazónovú, kyselinu penicilovú, ochratoxín A, patulín, roquefortín C (Pitt et Leistner, 1991). Podrobnejší popis uvádzam len u tých mykotoxínov, ktoré sa určujú na Katedre mikrobiológie.

1.6.2 CITRINÍN

Sumárny vzorec: C₁₃H₁₄O₅



Systematický názov: (3*R*-trans)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimetyl-6-oxo-3*H*-2-benzopyrán-7-kyseliny karboxylovej.

Charakteristika

Citrinín bol pôvodne objavený a používaný ako antibiotikum, ale pre značnú nefrotoxicitu bol vyradený (Golian, 1998). Je silne nefrotoxický s karcinogénnymi, teratogénnymi a mutagénnymi účinkami.

Chemickou štruktúrou patrí citrinín medzi kyslé mykotoxíny, za alkalickej reakcie prechádza do roztoku a v silne alkalickej prostredí dochádza k deštrukcii. Je stanoviteľný pomocou ultrafialového svetla s vlnovou dĺžkou 365 nm.

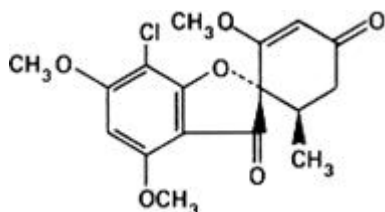
Vyskytuje sa väčšinou spoločne s ochratoxínom A, pričom sa predpokladá, že ide o prekursor ochratoxínu A. Podľa Šimůnka (1995) je predpoklad, že ochratoxín a citrinín sa podieľajú na pulmonálnej mykotoxikóze. Prítomnosť viacerých typov mykotoxínov v tom istom systéme je dôvodom zvýšeného záujmu. Pri strave, ktorá sa konzumuje dlhší čas, môže byť expozícia viacnásobne vyššia aj pri nízkej koncentrácii prijímaných toxínov (Belajová, 2007).

Citrinín sa podieľa na kontaminácii obilnín (Tančinová et Labuda, 2006), orechov, sóje (Pitt et Hocking, 1997) ako kontaminant bol izolovaný z ovsu, raže, kukurice, jačmeňa, ryže (Abramson et al., 2001; Golian et Zeleňáková, 2010) a pšenice (Felšöciová et al., 2009).

Medzi hlavných producentov citrinínu zaraďujú Frisvad et al. (2007) *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. verrucosum*, *P. chrzaczszii*, *P. manginii*, *P. odoratum*, *P. radicola*, *P. westlingii*.

1.6.3 GRIZEOFULVÍN

Sumárny vzorec: C₁₇H₁₇ClO₆



Systematický názov: 7-Chloro-2',4,6-trimetyl-oxo-6' β -metylspiro[benzofurán-2(3*H*),1'-cyklohex-2'-én]-3,4'-dión.

Charakteristika

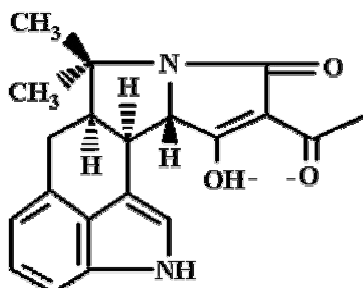
Grizeofulvín je dobre rozpustný v acetóne, etylacetáte a chloroforme (Cole et Cox, 1981). V minulosti sa využíval ako antibiotikum a tiež pri kutánnych infekciách zvierat a človeka, spôsobených dermatofytickými hubami. Je však preukázaná toxicita grizeofulvínu. Ako mitotický inhibítor deliacich sa buniek pôsobí toxicky v kostnej dreni, črevnom epiteli a tumoroch (Pitt et Leistner, 1991). Embryotoxicitu tohto mykotoxínu na kuracích embryách popísali Veselý et Veselá (1991).

Grizeofulvín bol izolovaný zo pšenice slovenského pôvodu vo viacerých sezónach (Tančinová et Labuda, 2006; Felšöciová et al., 2009; Barboráková et al. 2010)

Medzi producentov grizeofulvínu zaraďujeme *P. griseofulvum*, *P. dipodomyicola*, *P. concentricum*, *P. aethiopicum*, *P. janczewskii*, *P. raistrickii*, *P. canescens*, *P. jensenii*, *Eupenicillium javanicum* (Frisvad, 1989; Pitt et Hocking, 1997; Samson et al., 2002).

1.6.4 KYSELINA CYKLOPIAZÓNOVÁ /CPK/

Sumárny vzorec: C₂₀H₂₀N₂O₃



Systematický názov: (α , 11 β , 11 α)-10-acetyl-2,6,6 α ,7,11b-hexahydro-11-hydroxy-7,7-dimetyl-9*H*-pyrolo[1',2'':2,3]izoindolo[4,5,6-cd]indol-9-ón.

Charakteristika

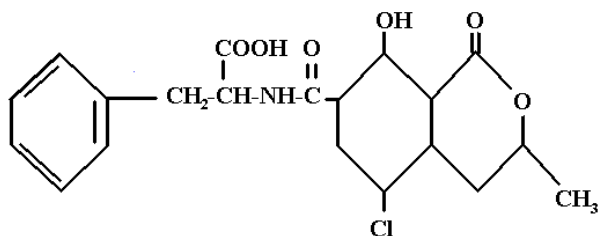
Kyselina cyklopiazónová patrí medzi organické kyseliny indolovej povahy. Pri podaní CPK per-os dochádza predovšetkým k poškodeniu tráviacej sústavy a pečene. Podávaním tohto mykotoxínu mimo črevnej bariéry boli zaznamenané u laboratórnych a hospodárskych zvierat krčové stavy s cyanózou. Zmeny nastali v transporte vápnikových iónov, čo viedlo k osmotickej deštrukcii buniek (Šimůnek, 2003). Neurotoxita tohto mykotoxínu je preukázaná za predpokladu, že prekoná črevnú bariéru (Šimůnek, 1995). Kyselina cyklopiazónová spôsobuje pri požití s potravou zápal až nekrózy tých častí tráviacej sústavy, kde sa natrávená potrava dostáva do alkalického prostredia (Golian, 1998).

Medzi rizikové komodity patria najmä obilniny, podzemnica olejná, hydínové mäso. V malých množstvách sa vyskytuje aj na povrchu plesňových syrov camembertskeho typu a v tavených syroch. V niektorých syroch Camembert boli zistené až trojnásobne prevyšujúce koncentrácie kyseliny cyklopiazónovej (Šimůnek, 2003).

Kyselinu cyklopiazónovú produkujú druhy *P. camemberti*, *P. commune*, *P. griseofulvum*, *P. dipodomyicola*, *P. palitans* (Frisvad et al., 2007).

1.6.5 OCHRATOXÍN A /OTA/

Sumárny vzorec: C₂₀H₁₈O₆NCl



Systematický názov: (*R*)-*N*-[(5-Chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-metyl-oxo-1*H*-2-benzopyrán-7-yl)-karbonyl]-*L*-fenylalanín.

Charakteristika

Ochratoxín A je zo skupiny ochratoxínov považovaný za najtoxickejší mykotoxín (Abarca et al., 2003). Toxicitou sa OTA zaraďuje do skupiny nefrotoxínov, pričom toxicita u človeka stúpa s predlžujúcim sa časom eliminácie (Creppy, 1999). Boli popísané nefrotoxické, karcinogénne, imunotoxické, genotoxické a teratogénne účinky ochratoxínu A (Ostrý et al., 2002). U väčších cicavcov boli pozorované vrodené poruchy alebo negatívny vplyv na reprodukčný systém (Quillien, 2002).

Hlavným zdrojom OTA je obilie. V obilných produktoch je rozloženie OTA nerovnomerné. Najvyššie množstvá sa nachádzajú v cereálnych otrubách a v jemne zomletých klíčkoch, najmenej ochratoxínu je v bielej múke (Scundamore et al., 2003).

Ďalším významným zdrojom OTA sú mäsové výrobky. Bola popísaná produkcia ochratoxínu A ušľachtilými mikromycétmi, ktoré sa používajú k finalizácii niektorých údenárskych výrobkov. Zdrojom OTA je aj bravčová krv, v ktorej je ochratoxín viazaný na albumín. OTA sa nachádza aj v káve. Toto zistenie súvisí s nálezmi toxikologicky významných koncentrácií OTA v ľudskej krvi (Šimůnek, 2003).

Medzi hlavných producentov OTA z rodu *Penicillium* patria: *Penicillium verrucosum* a *Penicillium nordicum* (Samson et al., 2002). *Penicillium verrucosum* považujú Lund et Frisvad (2003) za hlavného producenta OTA v obilninách pochádzajúcich z Európy, pričom kontaminácia zrn druhom *Penicillium verrucosum* nad 7 % indikuje prítomnosť ochratoxínu A.

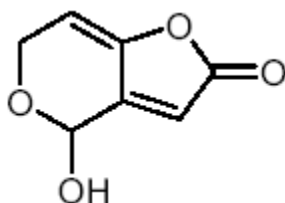
Najvyššie prípustné množstvá OTA sú stanovené Európskou úniou, na Slovensku sú určené v Potravinovom kódexe (tab. č. 4).

Tab. č. 4: Najvyššie prípustné množstvá OTA (<http://www.svssr.sk/sk/legislativa/>).

Mykotoxín	Najvyššie prípustné množstvo (mg.kg ⁻¹)	Komodita
Ochratoxín A	0,005	obilie, vrátane ryže a pohánky
	0,003	výrobky z obilia, vrátane výrobkov z obilných zrn určených na priamu ľudskú spotrebu
	0,010	sušené strapcovité bobuľovité ovocie (ríbezle, hrozienka, sultaniny)

1.6.6 PATULÍN

Sumárny vzorec: C₇H₆O₅



Systematický názov: 4-hydroxy-4*H*-furo[3,2-*c*]pyrán-2(6*H*)-ón.

Charakteristika

Patulín je bezfarebná kryštalická látka, opticky inaktívna. Je rozpustný vo vode, etanole, acetóne a chloroforme, nerozpúšťa sa v benzéne a petroléteri. V kyslom prostredí je pomerne stály, aktivitu stráca v alkalickom prostredí (Betina, 1990). Toxický účinok patulínu je objasňovaný jeho schopnosťou viazať sa na sulfhydrylové skupiny bielkovín. V konečnom dôsledku dochádza k narušeniu permeability bunkových membrán, aktivity enzýmov a k narušeniu procesu dýchania. Patulín nie je priamy mutagén. Je upodozrievaný z poškodenia DNA, inhibuje RNA, ale karcinogenita pre človeka nebola doposiaľ preukázaná (Ruprich, 2002).

Patulín je mykotoxín s bakteriostatickými a baktericídnymi účinkami (Golian, 1998). Pôvodne bol patulín v 40. rokoch popísaný ako antibiotikum a krátku dobu bol aj liečebne využívaný. Po objavení karcinogenity u zvierat bol stiahnutý z predaja a dnes je považovaný za významný mykotoxín. Limitné množstvá patulínu sú stanovené z hľadiska možnej karcinogenity, pričom u niektorých pokusných zvierat sa patulín zistil ako preukázaný karcinogén. U dobytky sa prejavili akútne otravy s prevládajúcim edémom pľúc (Šimůnek, 2003).

Jablká predstavujú komoditu, ktorá je najčastejšie kontaminovaná patulínom. Niektoré európske štúdie zistili, že ekologicky produkované jablká a následne aj z nich vyrobené šťavy obsahujú viac patulínu ako konvenčné (Šinková, 2007). Vyskytli sa prípady výskytu patulínu v detskej výžive po spracovaní netriedených jabĺk (Golian, 1998), pretože v ovocí sa vyskytujú ochranné látky (napr. vitamín C), ktoré zabraňujú rozkladu patulínu pri tepelnom opracovaní kompótov, drení a muštov (Šimůnek, 2003).

V laboratórnych podmienkach je známa produkcia patulínu nielen na ovocí, ale i na syroch a masných výrobkoch. V zrninách sa prirodzene nevyskytuje (Ruprich, 2002),

i keď vo vzorkách pšenice slovenského pôvodu z úrody roku 2006/2007 bol potvrdený Felšöciovou et al. (2008).

Patulín patrí medzi jeden z mála ľahko odbúrateľných mykotoxínov. Podstatou detoxikácie je reakcia patulínu s –SH skupinami. Rozklad patulínu bol preukázaný počas alkoholického kvasenia (Šimůnek, 2003).

Medzi producentov patulínu z rodu *Penicillium* patria *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomycicola*, *P. expansum*, *P. gladioli*, *P. glandicola*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum*, *P. vulpinum* (Frisvad et al., 2007).

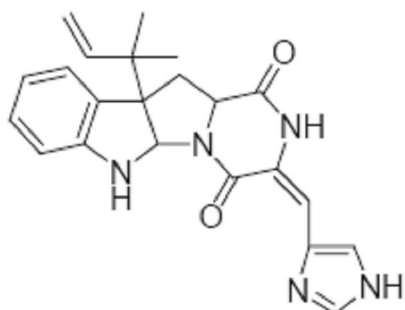
V Slovenskej republike sú prípustné množstvá patulínu stanovené potravinovým kódexom (tab. č. 5).

Tab. č. 5: Najvyššie prípustné množstvá patulín (<http://www.svssr.sk/sk/legislativa/kodex/>)

Mykotoxín	Najvyššie prípustné množstvo (mg.kg ⁻¹)	Potravina
Patulín	0,05	ovocné šťavy a ovocné nektáre, najmä jablková šťava, zložky ovocnej šťavy v iných nápojoch, koncentrované ovocné šťavy po nariadení podľa návodu výrobcu, liehoviny, fermentované nápoje získané z jabĺk alebo obsahujúce jablkovú šťavu
	0,025	tuhé jablkové výrobky, vrátane jablkového kompótu a jablkového pyré určené na priamu spotrebu
	0,01	jablková šťava a tuhé jablkové výrobky vrátane jablkového kompótu a jablkového pyré, pre dojčatá a malé deti, ktoré sú označené a predávané ako potraviny pre dojčatá a malé deti, ostatné potraviny na výživu dojčiat a malých detí

1.6.7 ROQUEFORTÍN C

Sumárny vzorec: C₂₂H₂₃N₅O₂



Systematický názov: (10 β -(1,1-dimetyl-2-propenyl)-3-(imidazol-4-ylmetylen)-5 α ,10 β ,11,11 α -tetrahydro-2H-pyrazino [1',2':1,5] pyrolo [2,3-b] indol-1,4-(3H, 6H)- dión.

Charakteristika

Z chemického hľadiska možno roquefortín zaradiť medzi cyklické dipeptidy (Golian, 1998). Tvorí bezfarebné ihličky, je rozpustný v chloroforme. Teplota topenia u tohto mykotoxínu je 195 až 200 °C (Cole et Cox, 1981).

Roquefortín C bol izolovaný z divokého kmeňa *Penicillium roqueforti* Thom ako jeden z niekoľkých alkaloidov v Japonsku. Mykotoxín bol primárne nájdený v mycéliu pestovanej kultúry *Penicillium roqueforti*. Francúzski mykológovia zistili produkciu roquefortínu na kvasnicovom substráte, avšak prítomnosť nízkych koncentrácií roquefortínu C bola zaznamenaná aj v syroch typu Niva (Hägglom, 1990). Felšöciová et al. (2009) izolovali roquefortín C z kmeňov *P. crustosum*, *P. expansum* a *P. griseofulvum* pochádzajúcich z endogénnej mykocenózy pšenice letnej.

V porovnaní s PR - toxínom je roquefortín C pomerne stabilný v syroch roquefortského typu, pričom vykazuje nízku toxicitu (Pitt et Leistner, 1991; Pitt et Hocking, 1997).

Lowes et al. (1992) popísali klinické príznaky otravy roquefortínom u psa, ktoré sa prejavovali vracaním, dychčaním, hypertenziou a záchvatmi. Intoxikácia závisela od doby, za akú bol mykotoxín odstránený zo žalúdka. Hägglom (1990) uvádza u zvierat, ktoré boli kŕmené plesnivým krmivom, klinické príznaky ako nechutenstvo, ketózy, mastitídy,

ochrnutie až potraty. V prípade, ak by toxín ostal v žalúdku, mohlo by dôjsť k usmrteniu zvierat'a.

Medzi hlavných producentov roquefortínu C patria: *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *P. expansum*, *P. hirsutum*, *P. albocoremium*, *P. allii*, *P. hordei*, *P. oxalicum*, *P. sclerotigenum*, *P. venetum* a *P. tulipae* (Frisvad et al., 2007).

1.7 Vplyv mykotoxínov na zdravotný stav človeka

Keďže obilniny predstavujú hlavnú energetickú zložku výživy, predstavujú aj najrizikovejšiu komoditu z hľadiska výskytu mykotoxínov. Nebezpečnosť sa prejaví v momente, keď sú napadnuté zrná použité ako surovina potravinárskych výrobkov a dostávajú sa do potravinového reťazca. Z pohľadu konzumenta je dôležité, akým spôsobom sa mykotoxíny môžu dostať do jeho organizmu (Šudyová et al., 2005). Mykotoxíny do organizmu prenikajú vdýchnutím, pokožkou, potravou a pod. (Bennett et Klich, 2003). Významnou príležitosťou ku kontaminácii organizmu mykotoxínmi je pracovný proces. Vážny problém predstavuje výroba krmív a manipulácia s nimi (Golian, 1998). Spóry mikroskopických húb sa vdychovaním dostávajú do respiračného systému a často spôsobujú vážne respiračné problémy, ako napr. alergie, astmu a pod.

Účinok mykotoxínov môže byť v závislosti od druhu a dávky akútny alebo chronický. Medzi hlavné toxické účinky mykotoxínov patria hepato-, nefro-, imuno-, embryotoxicita, poruchy krvotvorby, teratogenita a predovšetkým karcinogenita (Creppy, 2002).

Ochorenia spôsobené toxickými metabolitmi húb sa súhrnne nazývajú mykotoxikózy (Bennett et Klich, 2003). Toxíny rodu *Penicillium* sa s istotou podieľajú na akútnej kardiálnej beri-beri (Šimůnek, 1995). Vyvolávajúcim toxínom tohto ochorenia je citreoviridín, ktorý je produkovaný druhom *P. citroviridae* z ryže (Golian et Zeleňáková, 2010).

Často dochádza k synergickému pôsobeniu viacerých mykotoxínov, čím sa zvyšuje ich toxicita. Takéto spolupôsobenie niekoľkých mykotoxínov sa podieľa na tzv. multifaktoriálnych ochoreniach. Význam mykotoxínov produkovaných penicíliami pri prejavoch pľúcnej mykotoxikózy, balkánskej endemickej nefropatie, dánskej nefropatie je pravdepodobný, ale nepreukázaný. Podobne nejasná úloha je u preukázateľne

karcinogénnych mykotoxínov produkovaných druhmi rodu *Penicillium* v etiológii nádorových ochorení (Šimůnek, 1995). Mykotoxíny produkované penicíliami majú rozdielny podiel na ochoreniach (tab. č. 6).

Tab. č. 6: Ochorenia u človeka vyvolané mykotoxínmi (Šimůnek, 1995).

Podiel toxínov rodu <i>Penicillium</i>	Ochorenie
dokázaný	ergotizmus akútna kardiálna beri-beri alimentárna toxická aleukia (ATA)
multifaktoriálny (mykotoxín je jeden z možných činiteľov)	toxická hepatitída primárny hepatóm Reyov syndróm pulmonálna mykotoxikóza kwashiorkor hyperestrogenizmus
neistý alebo nedostatočne preukázaný	Kešanská kardiomyopatia pelagra karcinóm balkánska endemická nefropatia dánska nefropatia

1.8 Faktory vplývajúce na tvorbu mikroskopických húb z rodu *Penicillium*

Mikroskopické huby produkujúce mykotoxíny sú extrémne časté a môžu rásť na mnohých substrátoch za veľmi rôznorodých podmienok prostredia (Tančinová, 2008). Kvalita obilnín po zbere je ovplyvnená radou abiotických a biotických faktorov, ktoré vytvárajú ekosystém skladovaných zrn.

Kľúčové environmentálne faktory, ktoré ovplyvňujú rast mikroskopických húb a produkciu mykotoxínov počas skladovania sú: teplota, dostupnosť vody - vodná aktivita (*aw*), relatívna vlhkosť, prítomnosť kyslíka a zloženie ovzdušia (Al-Yahya, 1999; Tančinová, 2008). Interakcie medzi týmito faktormi ovplyvňujú dominanciu húb, zvlášť

mykotoxinogénnych druhov (Lee et Magan, 1999; Magan et al., 2003). Kombináciou týchto faktorov dochádza k aktivácii, resp. inhibícii niektorých metabolických procesov. Riziko mykotickej kontaminácie a následnej produkcie mykotoxínov v poľnohospodárskych produktoch sa každoročne mení podľa vyššie uvedených faktorov.

Görner et Valík (2004) rozdeľujú základné členenie faktorov na:

- a) vnútorné faktory,
- b) vonkajšie faktory,
- c) nepriame faktory.

Vnútorné faktory definujú zmeny, ktoré vznikajú činnosťou mikromycét v jednotlivých komoditách a závisia od fyzikálnych a chemických vlastností substrátu, ako sú:

- prístupnosť živín,
- aktivita vody a_w ,
- koncentrácia vodíkových iónov (pH),
- redoxný potenciál (Eh),
- textúra,
- antimikrobiálne látky.

Vonkajšie faktory vplyvajú na samotné vlastnosti surovín, potravín a krmív a predstavujú podmienky skladovania a uchovávanía:

- teplota prostredia,
- relatívna vlhkosť vzduchu,
- kyslík,
- doba skladovania,
- spôsoby spracovania a konzervovania (Görner et Valík, 2004).

Nepriame faktory sú výsledkom rozvoja mikroorganizmov, ktoré majú vplyv na mikrobiálnu aktivitu ostatných mikroorganizmov. Zahŕňajú vzájomné synergické alebo antagonické pôsobenie medzi vyselektovanými organizmami (Lacey, 1989).

Selekcia vedie k postupnému vylúčeniu jedincov s menej výhodnými vlastnosťami. Lepší konkurent je vitálnejší, tolerantnejší voči abiotickým faktorom prostredia (Števlíková et Kopčanová, 1994). Z abiotických faktorov má najväčší vplyv na výskyt a

dynamiku populácie vlhkosť pôdy. Okrem abiotických faktorov na populáciu značne vplývajú aj prirodzení nepriatelia (Tancik, 2009).

Antagonizmus zahŕňa kompetíciu, čiže súťaženie o esenciálne živiny, zmeny pH alebo redoxného potenciálu a tvorbu antimikrobiálnych látok (Kim, 1993; Huis in't Veld, 1996). Tvorba akejkoľvek antimikrobiálnej látky spomaľuje rýchlosť rastu, ničí bunky iného druhu, čím sa obmedzuje medzidruhová konkurencia o živiny a iné faktory nevyhnutné pre život (Števlíková et Kopčanová, 1994).

1.8.1 Podmienky prostredia

Rast húb i produkciu mykotoxínov ovplyvňujú podmienky prostredia, limity pre tvorbu mykotoxínov sú zvyčajne užšie ako pre rast samotnej huby (Frisvad et Samson, 1991; Samson et al., 2002).

Štruktúra populácie závisí od poľných klimatických podmienok, ako aj od podmienok počas zberu. Uskladňované zrná prinášajú so sebou obrovské množstvo mikroorganizmov, ako sú baktérie, kvasinky, vláknité mikroskopické huby (Lacey et Magan, 1991). Ktoré mikroorganizmy sa budú rozvíjať, alebo ktoré chemické reakcie vyvolajú závisí od druhu potraviny a vonkajších podmienok (Huis in't Veld, 1996). Najvyššie riziko produkcie mykotoxínov sa vyskytuje pri pšenici, najnižšie pri ovse (Mills, 1990).

1.8.1.1 Teplota

Teplota prostredia je hlavným z faktorov, ktoré urýchľujú rozmnožovanie mikroskopických vláknitých húb. Mikroskopické huby dokážu prežiť, rásť a rozmnožovať sa v širokom teplotnom spektre. Optimálna rastová krivka je pre každý druh mikroskopických húb špecifická. Pre väčšinu mikroskopických húb sú najideálnejšie teploty okolo 25 °C. Nárast teploty v skladovanom obilí často spôsobujú metabolické aktivity hmyzu a roztočov (<http://www.vetagro.sk/>).

Peniciliá rýchlo kolonizujú substrát, preto sú pre nich teplota a vlhkosť dôležitými faktormi. Rod *Penicillium* má široké teplotné spektrum s teplotným optimom 19 až 33 °C (<http://www.vetagro.sk/>), maximálna teplota je 28 až 35 °C (Filtenborg, 2002). Peniciliá sú schopné rásť aj pri nízkych teplotách, niektoré druhy ako napr.: *P. aurantiogriseum*, *P.*

camemberti, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum* rastú už pri teplotách pod 5 °C (Frisvad et Samson, 1991).

Podobne aj produkcia mykotoxínov taktiež prebieha u penicilií rastúcich pri nízkych teplotách. Frisvad et Samson (1991) uvádzajú produkciu ochratoxínu A druhom *P. verrucosum* už pri teplote 4 °C. Produkcia patulínu druhmi *P. expansum*, *P. griseofulvum* a *P. vulpinum* bola zaznamenaná pri teplote 7,2 °C.

1.8.1.2 Aktivita vody (a_w)

Aktivita vody je definovaná ako podiel tlaku vodných pár nad daným roztokom (komoditou) k tlaku pár nad hladinou destilovanej vody za rovnakých podmienok.

Vzťah vodnej aktivity ku koncentrácii rozpustnej látky možno vyjadriť vzorcom:

$$a_w = \frac{N_w}{N_w + N_s}$$

pričom N_w je počet mólov vody a N_s počet mólov rozpustenej látky (Števlíková et al., 2007).

Rast a vývoj mikroskopických húb koreluje s vlhkosťou daného prostredia. Ak je vlhkosť obilnín nižšia ako 12 %, detekcia rastu mikromycét je obtiažna, avšak spóry môžu byť stále prítomné, ale neaktívne. Naopak vyššia vlhkosť stimuluje klíčenie spór, ďalší rast mycélií a následne opäť tvorbu nových spór (<http://www.vetagro.sk/>).

Všeobecne, ak sa zabezpečí vlhkosť skladovaného obilia ekvivalentná hodnote vodnej aktivity < 0,70 (Tančinová, 2008), rast mikroskopických húb v obilninách bude potlačený. Najčastejší rast penicilií uvádza Moss (1991) pri $a_w > 0,95$. Minimálna a_w pre *Penicillium chrysogenum* môže dosiahnuť hodnotu 0,78, pre *Penicillium aurantiogriseum* 0,81 a pre *Penicillium purpurogenum* 0,84. Každý druh rodu *Penicillium* sa vyznačuje iným teplotným minimom a aktivitou vody, pri ktorej je schopné rastu (tab. č. 7).

Tab. č. 7: Minimálne hodnoty teplôt a aktivity vody (a_w) pre vybrané druhy penicilií (Samson et al., 2002).

Druh	Teplota (°C)	Aktivita vody (a_w)
<i>P. aurantiogriseum</i>	0	0,84
<i>P. brevicompactum</i>	-2	0,81

<i>P. chrysogenum</i>	4	0,84
<i>P. citrinum</i>	12	0,80
<i>P. expansum</i>	0	0,85
<i>P. griseofulvum</i>	0	0,83
<i>P. verrucosum</i>	0	0,83

1.8.1.3 Kyslík

Rast mikromycét je do istej miery ovplyvnený aj množstvom kyslíka, oxidu uhličitého a dusíka. Mikromycéty sú spravidla prísne aeróbne mikroorganizmy a preto je ich vyšší výskyt zaznamenávaný spravidla vždy v povrchových vrstvách siláže, avšak na druhej strane patria k vysoko adaptovateľným mikroorganizmom, ktoré môžu prekonávať rôzne adaptačné faktory (Doležal et Zeman, 2006). Peniciliá patria medzi mikroaerofilné druhy, čiže sú zvlášť tolerantné k nízkym koncentráciám kyslíka (Lacey, 1989). Kyslík je dôležitým faktorom aj pre produkciu mykotoxínov (Bullerman, 1995).

Vzhľadom na požiadavky mikromycét na kyslík sa všeobecne uvádza, že základnou podmienkou prevencie ich výskytu je dôkladné utlačenie a rýchle anaeróbne uzavretie sila. Pri prevencii produkcie mykotoxínov v obilninách je účinná metóda hermetického uskladňovania v kontajneroch s vysokou hladinou CO₂ a nízkou hladinou O₂ (Loučka et Macháčová, 1997), avšak produkcia oxidu uhličitého má iba inhibičný, nie devitalizačný efekt (Doležal et Zeman, 2006).

1.8.1.4 Doba skladovania

Nezanedbateľný vplyv na rast mikroskopických húb a na následnú produkciu mykotoxínov v substráte má faktor času. Pri uskladnení potravín treba brať do úvahy, že absencia rastu mikroskopických húb za jeden mesiac nie vždy značí bezpečné skladovanie neobmedzene dlhý čas (Filtenborg et al., 2002).

U skladovaného obilia je známy tzv. fenomén migrácie vlhkosti, čo znamená, že v zimnom období má uskladnená surovina vyššiu teplotu v strednej časti sila, spôsobujúcu migráciu vlhkosti do vrchných častí. Naopak v letnom období býva vlhkosť vyššia v strednej časti sila a migruje do spodnej časti. Dôsledkom hromadenia vlhkosti dochádza k znehodnoteniu skladovaného zrna a keďže mikromycéty dokážu obnoviť svoj rast do 30

minút od rehydratácie, skrakuje sa čas jeho bezpečného uskladnenia (<http://www.vetagro.sk/>).

1.9 Ochrana populácie pred mykotoxínmi

Pri prevencii výskytu mikroskopických húb, ktoré sú pôvodcami mykotoxínov napomáha správna poľnohospodárska prax. U menej skúsených agronómov, ktorí túto prax zanedbávajú, však môže dôjsť vo vlhkých klimatických podmienkach ku zvýšenej kontaminácii obilnín mykotoxínmi (Šinková, 2007).

Podľa zásad správnej poľnohospodárskej praxe sú poľnohospodári povinní produkovať zdravotne neškodné suroviny pre potravinárske a kŕmne účely. Naplnenie tejto požiadavky je závislé od dôslednej kontroly a od zabezpečenia optimálnych podmienok, ktoré vylučujú prípadné hromadenie zdraviu škodlivých látok v surovinách určených na výrobu potravín, či krmív (Vaňová, 2008).

Dodržiavanie prevencie v predzberovom období je prvým stupňom zabezpečenia neškodnosti finálneho produktu a zároveň najúčinnjšou metódou na kontrolu kontaminácie. Ak sa v produkte určenom na výživu ľudí a zvierat kontaminácia nevyskytne, riziká spojené s výskytom toxínov sa musia sledovať následnými postupmi aj po zbere produktov. Riziko by sa malo minimalizovať v každej produkčnej fáze (Belajová, 2007). Z hľadiska prevencie je dôležité pochopiť základné faktory umožňujúce účinnú kontrolu vzniku a šírenia mykotickej a mykotoxinogénnej kontaminácie a to v poľných, ako aj v skladových podmienkach (Tančinová, 2008).

Riziko napadnutia v značnej miere znižuje včasná a kvalitná agrotechnika, geneticky odolnejšie odrody, vhodné oševné postupy, ako aj vyvážené hnojenie (Loučka et Macháčová, 1997). V niektorých zemepisných oblastiach sa doba siatia musí plánovať najmä vzhľadom na obdobie zvýšených dažďových zrážok. Načasovanie zberu podstatne ovplyvňuje tvorbu mykotoxínov. Počas zberu je dôležité kontrolovať faktory, ako je včasnosť čistenia a sušenia produktov (Belajová, 2007).

Ako uvádza Zimolka et al. (2005), po zbere sa zrno dostáva do katabolickej fázy, ktorá je charakteristická látkovými premenami. Za optimálnych klimatických podmienok zberu možno zberať zrno v stave vhodnom na skladovanie (relatívna vlhkosť zrna ≤ 13 až 15 %). Vhodnými technologickými zásahmi sa má kvalitatívna hodnota zrna zvyšovať, čo možno dosiahnuť redukciami vlhkosti a teploty zrna do oblasti hodnôt skladovacej stability.

Najlepším spôsobom ako predchádzať vplyvu mykotoxínov je minimalizovať možnosť ich vzniku, čo možno docieľiť zberom obilnín v štádiu zrelosti, s nízkym obsahom vody a v konečnom dôsledku aj správne skladovanie v suchých a chladných podmienkach (Nahm, 1995).

Základnými opatreniami pri ochrane cereálií pred plesnivením a výskytom mykotoxínov podľa Tančinovej et al. (2008) sú:

- **pri naskladňovaní obilia**
 - a) sanitácia a dezinfekcia skladov,
 - b) rýchle a účinné vysušenie naskladňovaných obilnín,
 - c) skladovanie obilia pri nízkej vlhkosti (13,5 – 14 %),
 - d) skladovanie pri nízkych teplotách,
 - e) radikálne zníženie obsahu prímiesí a nečistôt v obilí,
 - f) radikálne obmedzenie hmyzu v skladovanom obilí,
 - g) separácia vlhkého obilia od suchého,
 - h) separácia zdravého obilia od nezdravého (mechanicky narušeného, zamoreného hmyzom, plesnivého).
- **počas skladovania**
 - a) kontrola vlhkosti,
 - b) aerácia a kontrola teploty,
 - c) presun alebo prehadzovanie,
 - d) sanitácia a dezinfekcia.

Ochrana populácie pred mykotoxínmi a toxinogénnymi mikroskopickými hubami je zabezpečená kontrolným systémom pracovísk rezortov zdravotníctva a pôdohospodárstva. Je nevyhnutné vykonávať pravidelné epidemiologické, toxikologické štúdie a monitoring mykotoxínov (Golian, 2000). Na dosiahnutie bezpečných potravín je nevyhnutný komplex opatrení, ktorý sa začína produkciou bezpečných surovín (Šudyová et al., 2005).

Sľubnými spôsobmi do budúcnosti na výrazné zníženie hladiny mykotoxínov sú výskumné šľachtiteľské programy a génové inžinierstvo, ktoré sa snaží o zvýšenie rezistencie obilnín voči mikromycétom. Ako uvádza Belajová (2007), genetické inžinierstvo sa zameriava na skúmanie nadobudnutia rezistencie prostredníctvom prídavku

alebo rozšírenia antifungálnych génov. Zameranie výskumu je zacielené najmä na budúcu predzberovú kontrolu a prevenciu tvorby mykotoxínov.

1.9.1 Antifungálne prostriedky

Poslednou možnosťou ochrany substrátov pred nežiaducou činnosťou mikroskopických húb sú antifungálne prostriedky (Jesenská, 1987). Mechanizmus pôsobenia týchto prípravkov je založený na:

- deštrukcii bunkovej steny, prípadne cytoplazmatickej membrány,
- inhibícii enzýmov v mikrobiálnej bunke,
- deštrukcii genetickej štruktúry (Nielsen et de Boer, 2002).

Medzi najznámejšie antifungálne prostriedky patrí:

Kyselina propiónová má vysoký antifungicídny účinok, zabraňuje rastu mikroskopických vláknitých húb. Pred dlhodobým skladovaním býva zrno chemicky ošetrené prípravkami na báze kyseliny propiónovej. Aplikuje sa formou postrekov prostredníctvom rozprašovacích trysiek. Zrno s vlhkosťou nad 15 % sa postrekuje 0,5 % kyselinou propiónovou, pri vlhkosti približne 30 % sa používa 1,25 % roztok kyseliny (Ruprich, 1997).

Kyselina sorbová – jej antifungicídne účinky sú aktívne na väčšinu mikroskopických vláknitých húb. Je to pomerne účinný inhibítor mikromycét, kvasiniek a niektorých druhov baktérií, preto má využitie aj ako konzervant potravín. Jej konzervačné účinky sú závislé od pH (Cuhra, 2009), najvyššiu účinnosť má pri pH do 5,0. Vyššie pH má za následok nižšiu účinnosť (Roberts, 1989).

Benzoát sodný patrí medzi biologicko - chemické prípravky, ktoré podporujú fermentačný proces a zároveň obsahujú zložku, ktorá pôsobí dezinfekčne na mikroskopické huby. Patrí medzi lacnejšie prípravky, teda aj účinnosť je nižšia (Rajčáková et Mlynár, 2005).

Adsorbenty mykotoxínov sú určitým riešením v prípade vysokého obsahu spór mikroskopických húb. Ide o špeciálne aditíva určené na potlačenie výskytu mykotoxikóz, založené na absorpcii mykotoxínov (Rajčáková et Mlynár, 2005). V praxi sa používa napr. kaolín, ktorý sa pridáva do krmív, pričom sa viaže v tráviacom systéme a výrazne znižuje

toxicitu niektorých mykotoxínov. Využíva sa aj granulovaný aktivovaný uhlík (GAC), ktorý je aplikovaný na redukcii patulínu v kontaminovaných ovocných šťavách (Belajová, 2007).

2 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce je spracovanie literárneho prehľadu zameraného na výskyt mikroskopických húb z rodu *Penicillium* v obilninách, s dôrazom na popis najvýznamnejších peniciliových mykotoxínov a spôsobov prevencie a ochrany pred znehodnotením obilnín.

Hlavným cieľom experimentálnej časti diplomovej práce je sledovanie endogénnej a povrchovej kontaminácie mikroskopickými hubami z rodu *Penicillium sp.* na zrnách pšenice potravinárskej (*Triticum aestivum* L.) dopestovanej v regiónoch stredného a východného Slovenska z úrody roku 2008. Analyzovaných je 11 vzoriek, z toho 5 vzoriek z lokalít stredného Slovenska a 6 vzoriek z lokalít východného Slovenska. Ďalšou úlohou je zistiť a vyhodnotiť toxigenitu, čiže schopnosť izolátov produkovať peniciliové mykotoxíny prostredníctvom tenkovrstvovej chromatografie.

3 Metodika práce a metódy skúmania

3.1 Odber vzoriek

Vzorky pšenice potravinárskej (*Triticum aestivum* L.) boli odobraté v sezóne roku 2008 z veľkokapacitných skladov. Celkovo bolo sledovaných 11 vzoriek, z čoho 5 vzoriek pochádzalo z lokalít stredného Slovenska a 6 z lokalít východného Slovenska. Analyzované vzorky boli odobraté zo všetkých štyroch krajov stredného a východného Slovenska, ako uvádza tabuľka č. 8.

Tab. č. 8: Vybrané regióny, kraje a lokality odberu vzoriek pšenice potravinárskej v roku 2008

Región	Kraj	Lokality
SS	Banskobystrický (3)*	Banská Bystrica (1), Lučenec (1), Závada (1)
SS	Žilinský (2)	Turčianske Teplice (1), Podtureň (1)
VS	Košický (3)	Smižany (3)
VS	Prešovský (3)	Poprad - Matejovce (1), Spišské Bystré (1), Prešov (1)

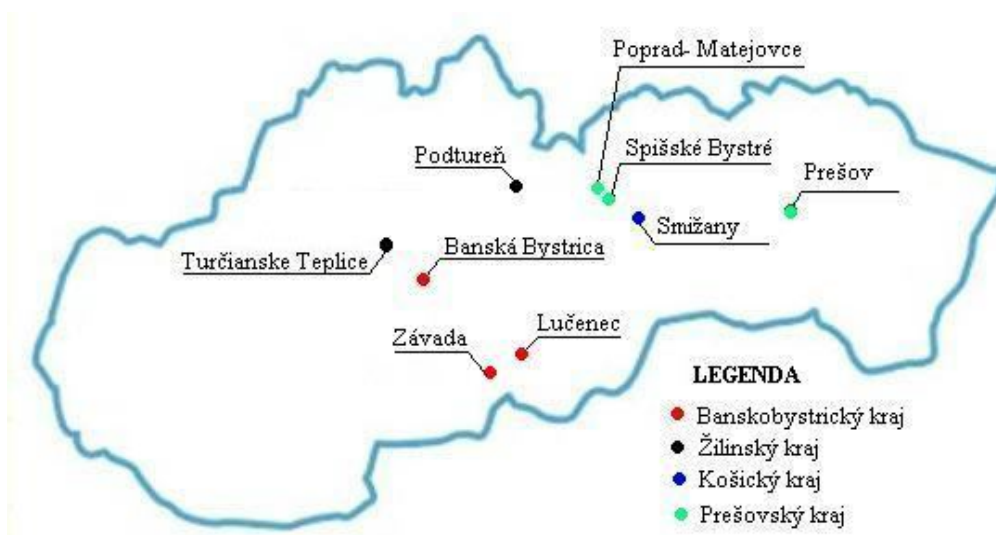
* v zátvorkách sú uvádzané počty odobratých vzoriek

SS – stredné Slovensko

VS – východné Slovensko

Zobrazenie lokalít odberu vzoriek pšenice je znázornené na obrázku č. 3.

Obr. č. 3: Lokality odberu vzoriek v regiónoch stredného a východného Slovenska



3.2 Izolácia vzoriek

3.2.1 Endogénna mykocenóza vzoriek pšenice potravinárskej

Na stanovenie endogénnej mykocenózy sme použili metódu priameho ukladania povrchovo vysterilizovaného pšeničného zrna na agarové platne. Vzorku 200 ks makroskopicky bezchybných zrn sme povrchovo sterilizovali po dobu 2 minút v 100 ml destilovanej vody spolu s 5,5 g chlóraminu, čím sme získali 0,4 % roztok. Vzorku sme následne 3 krát prepláchli sterilnou destilovanou vodou (cca 500 ml), vysušili na sterilnom filtračnom papieri a pinzetou vyžihanou plameňom sme jednotlivé zrná ukladali na platne s dvoma druhmi živných pôd. Prvých 100 zrn z každej vzorky sme uložili na platne s DRBC živnou pôdou (agar s dichlóranom, chlórarnfenikolom a Bengálskou červeňou) (Samson et al., 2002b), zvyšných 100 zrn z každej vzorky sme ukladali na platne s DYSG živnou pôdou (agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom) (Burgess et al., 1988). Vzorky sme nechali kultivovať 5 – 7 dní pri teplote 25 ± 1 °C v tme.

3.2.2 Povrchová mykocenóza zrn pšenice potravinárskej

Na zistenie povrchovej mykocenózy celého zrna sme použili platňovú zried'ovaciú metódu. Navážených 20 g zhomogenizovanej vzorky pšenice sme premiestnili do odmernej banky, do ktorej sme pridali 180 cm³ peptónovej vody obsahujúcej 0,02 % Tweenu[®] 80 (Fluka Chemie AG, Švajčiarsko). Vzorku sme nechali 30 minút trepať na horizontálnej trepačke a desiatkovým zried'ovacím systémom sme pripravili riedenia 10^{-1} až 10^{-3} . Následne sme odpipetovali 0,1 ml z každého riedenia a naočkovali sme agarové platne DRBC (agar s dichlóranom, chlórarnfenikolom a Bengálskou červeňou) a MEA (sladinový agar) (Samson et al., 2002b) v trojnásobnom opakovaní. Vzorky sme kultivovali za rovnakých podmienok ako pri stanovovaní endogénnej mykocenózy.

3.3 Materiál a metódy

Zloženie živných pôd použitých pri izolácii vzoriek:

1. **DRBC** (agar s dichlóranom, chlórarnfenikolom a Bengálskou červeňou; Merck KGaA, Nemecko; Samson et al., 2002)

peptón	5,0 g
glukóza	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
dichlóran	0,002 g
Bengálska červeň	0,025 g
chlórarnfenikol	0,1 g
agar	15 g
destilovaná voda	1000 ml
<hr/>	
pH živnej pôdy	5,6 ± 0,2

2. **DYSG** (agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom; Samson et al., 2002)

kvasničný extrakt	20,0 g
sacharóza	150,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
chlórarnfenikol	0,05 g
dichlóran	1,0 ml
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ · 7 H ₂ O	0,005 g
agar	20 g
glycerol	220 g
destilovaná voda	1000 ml
<hr/>	
chlórtetracyklín	0,05 g – bol pridaný po autoklávovaní

3. Sladinový agar (BiomarkTM laboratories, India)

sladinový extrakt	30,0 g
peptón	5,0 g
agar	15,0 g

Návažok 50 g živnej pôdy sme rozpustili v 1000 ml destilovanej vody a sterilizovali sme 15 minút pri tlaku 100 – 120 kPa a teplote 115 °C v autokláve. Po autoklávovaní sme pridali chlórarnfenikol (IMUNA; Šarišské Michaľany, Slovensko) v množstve 100 mg/ 1000 ml.

3.4 Stanovenie rodu *Penicillium* sp.

Na zistenie druhového zastúpenia rodu *Penicillium* bolo potrebné získať čisté kultúry jednotlivých kmeňov, preto peniciliá vyrastené na agaroch DRBC, DYSG a MEA sme preočkovali na identifikačné živné pôdy CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom), MEA (agar so sladinovým extraktom), YES (kvasničný extrakt so sacharózou) a CREA (agar s kreatínom a sacharózou). Čisté kmene sme kultivovali pri teplote 25 ± 1 °C bez prístupu svetla počas 5 – 7 dní podľa Samson et al. (2002). Na identifikáciu boli použité kľúče Pitt et Hocking (1997), Samson et al. (2002a), Samson et Frisvad (2004).

Zloženie živných pôd použitých pri stanovovaní rodu *Penicillium*:

1. CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom; Pitt, 1979)

Czapkov koncentrát	10,0 ml
kvasničný extrakt	5,0 g
sacharóza	30,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
agar	15,0 g
destilovaná voda	1000 ml

Príprava Czapkovho koncentráту:

NaNO ₃	30,0 g
-------------------	--------

KCl	5,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	5,0 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ . 7 H ₂ O	0,05 g
destilovaná voda	100 ml

Sterilizácia prebehla pri teplote 120 °C, 15 minút, pri tlaku 100 – 120 kPa.

2. MEA (agar so sladínovým extraktom; Pitt, 1979)

sladínový extrakt	20,0 g (DIFTO, Detroit, USA)
peptón	1,0 g (IMUNA, Šarišské Michaľany, Slovensko)
glukóza	20,0 g (LACHEMA, Brno, Česká Republika)
agar	20,0 g
destilovaná voda	1000 ml

3. YES (agar s kvasničným extraktom so sacharózou; Samson et al., 2002)

kvasničný extrakt	20,0 g
sacharóza	150,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g
agar	20,0 g
destilovaná voda	885 ml

Sterilizácia prebehla v autokláve pri teplote 120 °C počas 20 minút pri konštantnom tlaku 121 kPa.

4. CREA (agar s kreatínom a sacharózou; Frisvad, 1985)

sacharóza	30,0 g
kreatín	3,0 g (SIGMA, Steinheim, Nemecko)
minerálny roztok	10,0 ml
roztok stopových prvkov	1,0 ml
bromkrezolová červeň	0,05 g (LACHEMA, Brno, Česká Republika)
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	1,3 g

agar	15,0 g
destilovaná voda	1000 ml

Sterilizácia prebehla pri teplote 120 °C, 15 minút, pri tlaku 100 – 120 kPa.

3.5 Stanovenie toxinogenity mykotoxínov metódou TLC (*in vitro*)

Schopnosť vybraných kmeňov potenciálne produkujúcich mykotoxíny v podmienkach *in vitro* sme stanovili metódou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) podľa Samson et al. (2002 b), modifikované Labudom et Tančinovou (2006). Sledovali sme toxinogenitu tých mykotoxínov, ktorých štandardy má zakúpené Katedra mikrobiológie:

- citrinín (C)
- grizeofulvín (G)
- kyselina cyklopiazónová (CPA)
- ochratoxín A (OTA)
- patulín (P)
- penitrém A (PA)
- roquefortín C (RC)

Na stanovenie toxinogenity vybraných druhov mykotoxínov sme použili dva druhy živných pôd - CYA a YES. Zo živnej pôdy CYA sme izolovali intracelulárne mykotoxíny CPA, PA a RC. Extracelulárne mykotoxíny (C, G, OTA, P) sme získali zo živnej pôdy YES.

Na identifikáciu intracelulárnych mykotoxínov sme vykrojili agarové výseky z CYA s narastenými kolóniami penicilií s približnou veľkosťou 5 x 5 mm. Extracelulárne mykotoxíny sme identifikovali zo živnej pôdy YES pomocou agarových výsekov, ktoré neobsahovali kolónie penicilií. Výseky sme pomocou pinzety vložili do Eppendorfovej skúmavky a pridali sme 0,5 ml extrakčného činidla chloroform metanol (2 : 1). Skúmavky sme vložili do prístroja Vortex G-560E (Scientific Industries, Bohemia), kde sa obsah skúmaviek premiešaval 3 minúty. Získané extrakty sme naniesli v množstve 30 µl a štandardy jednotlivých mykotoxínov v množstve 10 µl na štart chromatografickej platne. Po vysušení sme použili vyvíjajúcu sústavu TEF (toluén, etylacetát, kyselina mravčia) v pomere 5 : 4 : 1. Po opätovnom vysušení sme jednotlivé mykotoxíny detekovali pomocou fluorescencie a retenčných hodnôt štandard.

3.5.1 Vizualizácia jednotlivých mykotoxínov

Citrinín – bol priamo pozorovateľný pod UV svetlom pri vlnovej dĺžke 365 nm ako žltozelená škvrna s chvostom.

Grizeofulvín – podobne ako citrinín bol viditeľný pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 365 nm a tvoril modrú škvrnu.

Kyselina cyklopiazónová – detekcia prebiehala pri dennom svetle po nanosení Ehrlichovho činidla. Pri pozitívnom náleze by sa vytvorila fialová škvrna, avšak prítomnosť tohto mykotoxínu v testovaných vzorkách sa nepotvrdila.

Ochratoxín A – detekcia prebiehala pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 365 nm, v prípade prítomnosti tohto mykotoxínu v testovaných vzorkách by sme pod UV svetlom pozorovali modrozelenú škvrnu, avšak OTA vo vzorkách nebol prítomný.

Patulín – bol detekovaný pri dennom svetle po nanosení 0,5 % MBTH (3-metyl-2-benzotiazolióňhydrazón-hydrochlorid) v metanole, pri zahriatí na 130 °C po dobu 8 minút, vytvoril žltoranžovú škvrnu.

Penitrém A – bol detekovaný po nanosení 20 % AlCl₃ v roztoku 60 % etanolu pri zahriatí na 130 °C po dobu 8 minút, tvoril tmavozelenú až čiernu škvrnu.

Roquefortín C – bol detekovaný po nanosení Ce(SO₄)₂ · 4H₂O ako škvrna s oranžovým sfarbením.

4 Výsledky práce

V sezóne 2008 sme sledovali mykotickú kontamináciu zrn pšenice potravinárskej (*Triticum aestivum* L.) slovenského pôvodu v regiónoch stredného a východného Slovenska. Celkovo sme odobrali 11 vzoriek pšeničných zrn zo 4 krajov, z ktorých 5 vzoriek pochádzalo z lokalít stredného Slovenska a 6 vzoriek z lokalít východného Slovenska. V izolovaných vzorkách sme zistili prítomnosť aj iných rodov vláknitých mikroskopických húb, avšak našim cieľom bolo zamerať sa len na toxínogénne druhy rodu *Penicillium*.

4.1 Výsledky vzoriek z lokalít stredného Slovenska

Z 5 analyzovaných vzoriek skladovaných pšeničných zrn sme 3 vzorky odobrali z lokalít Banskobystrického kraja (Banská Bystrica, Lučenec, Závada) a 2 vzorky zo Žilinského kraja (Turčianske Teplice, Podtureň).

4.1.1 Banskobystrický kraj

Z 3 vzoriek pšenice odobratých z oblastí Banskobystrického kraja sme celkovo izolovali 11 druhov penicilií z oboch spôsobov izolácie – endogénnej mykocenózy a oplachu (Tab. č. 9).

Druhovou identifikáciou izolovaných kmeňov sme určili 6 druhov penicilií z endogénnej mykocenózy: *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum*, *P. thomii* a *P. viridicatum*. Frekvencia výskytu všetkých izolátov z endogénnej mykocenózy bola rovnaká - 33 % (Graf č. 1). Z celkového počtu 86 izolátov predstavovali najväčšie zastúpenie z endogénnej mykocenózy *Penicillium chrysogenum* (72 izolátov), *Penicillium polonicum* (6 izolátov) a *Penicillium thomii* (5 izolátov) (Graf č. 2).

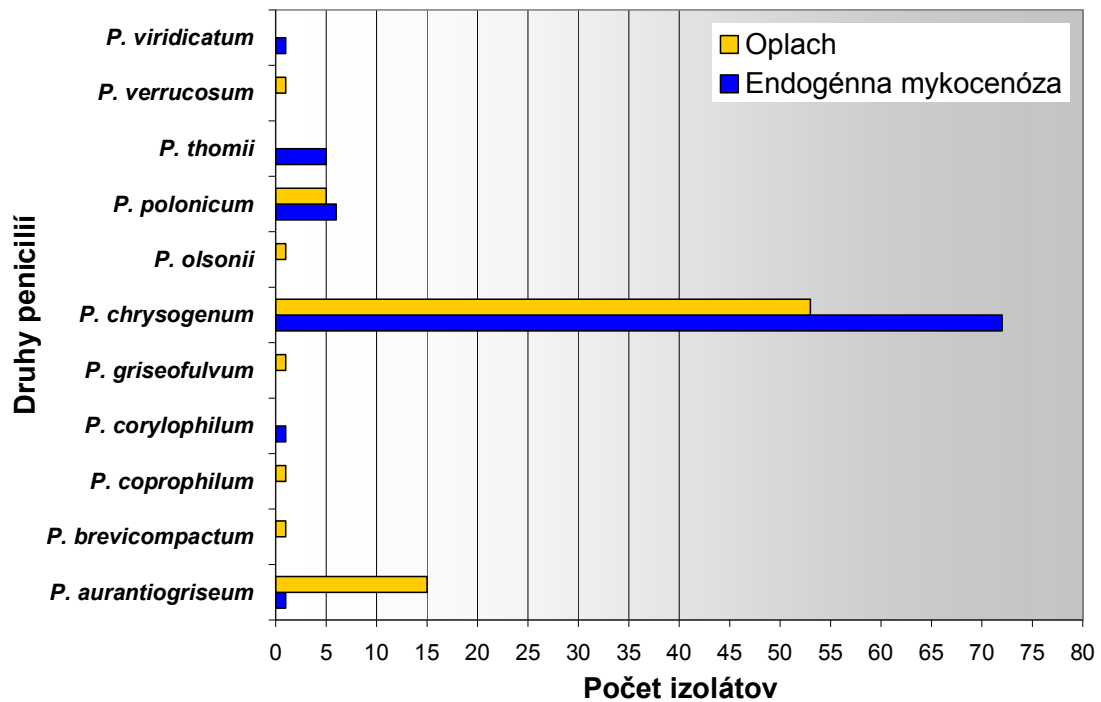
Druhým spôsobom izolácie – oplachom sme izolovali širšie druhové zastúpenie (8) i keď s nižším počtom izolátov (78): *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. coprophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. olsonii*, *P. polonicum* a *P. verrucosum*. Najvyššiu frekvenciu výskytu z oplachu sme zaznamenali pri druhoch *P. aurantiogriseum* a *P. chrysogenum* 67 % (Graf č. 1).

Najväčšie zastúpenie z hľadiska počtu izolátov z oplachu mal rovnako ako z endogénnej mykocenózy druh *P. chrysogenum* (53 izolátov), nasledovali druhy *P. aurantiogriseum* (15 izolátov) a *P. polonicum* (5 izolátov) (Graf č. 2).

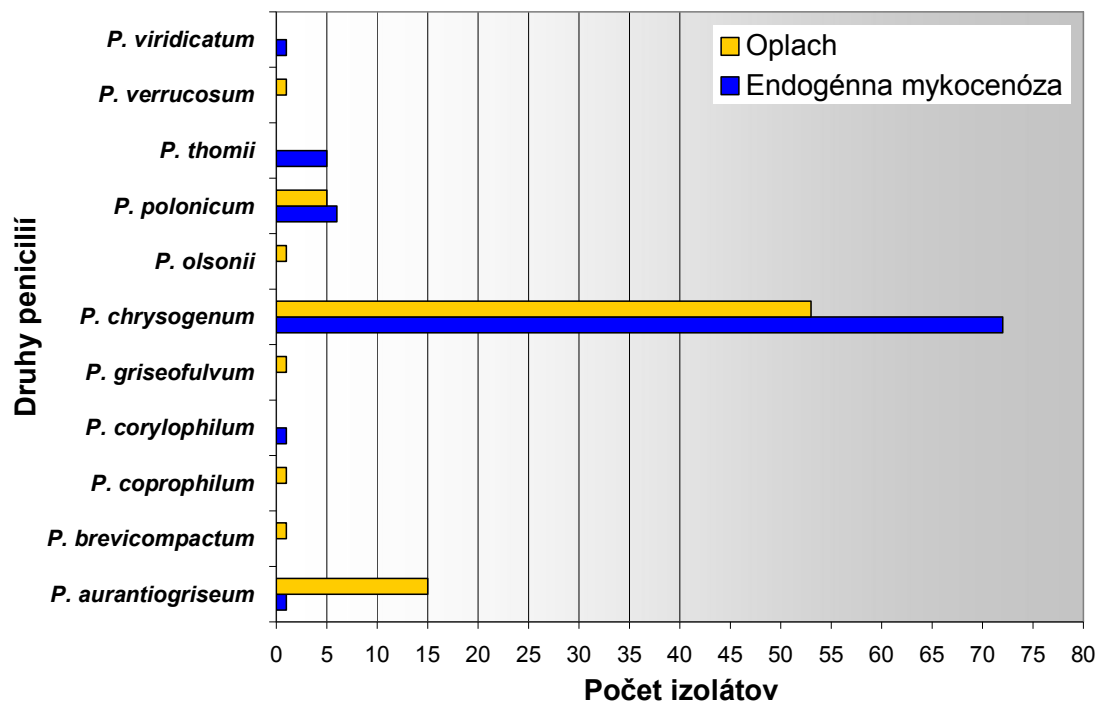
Kmene 3 druhov rodu *Penicillium* - *P. chrysogenum* (125), *P. aurantiogriseum* (16) a *P. polonicum* (11) sme vyizolovali súčasne z endogénnej mykocenózy a oplachu, čím tvorili najvyšší podiel z celkového počtu izolátov (164).

Tab. č. 9: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Banskobystrického kraja v sezóne 2008

Druhy penicilií	Banskobystrický kraj						Celkový počet izolátov
	Endogénna mykocenóza			Oplach			
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	
<i>P. aurantiogriseum</i>	1	33	1	2	67	15	16
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. coprophilum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. corylophilum</i>	1	33	1	-	-	-	1
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. chrysogenum</i>	1	33	72	2	67	53	125
<i>P. olsonii</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. polonicum</i>	1	33	6	1	33	5	11
<i>P. thomii</i>	1	33	5	-	-	-	5
<i>P. verrucosum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. viridicatum</i>	1	33	1	-	-	-	1
			Σ 86			Σ 78	Σ 164



Graf č. 1: Frekvencia výskytu penicilii (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Banskobystrického kraja v sezóne 2008



Graf č. 2: Počet izolátov penicilii z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Banskobystrického kraja v sezóne 2008

4.1.2 Žilinský kraj

Z 2 lokalít Žilinského kraja (Turčianske Teplice, Závada) sme stanovili 2 vzorky pšeničných zrn, u ktorých sme analyzovali endogénnu a povrchovú mykocenózu, ako aj potenciálnu toxicitu izolovaných druhov penicilií. Celkovo sme zo vzoriek vyizolovali 9 druhov penicilií (Tab. č. 10), pričom izoláty, ktoré sme z dôvodu kontaminácie nemohli bližšie identifikovať sme označili ako *Penicillium sp.*

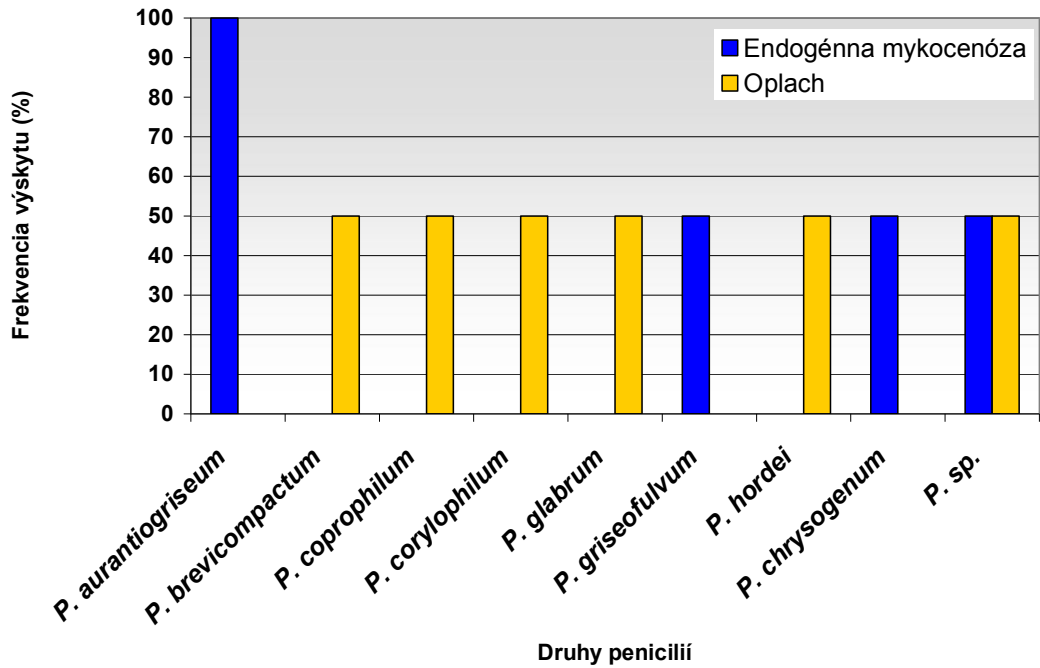
Analýzou endogénnej mykocenózy sme izolovali 4 druhy: *P. aurantiogriseum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum* a *P. sp.* Najvyššiu frekvenciu výskytu (100 %) v izolátoch endogénnej mykocenózy vykazoval ako jediný druh *P. aurantiogriseum*, všetky ostatné druhy sa vyskytovali s frekvenciou 50 % (Graf č. 3). Z celkového počtu izolátov (6) sa v endogénnej mykocenóze najčastejšie vyskytoval druh *P. aurantiogriseum* (3) (Graf č. 4).

Z oplachu sme získali širšie spektrum penicilií (6 druhov): *P. brevicompactum*, *P. coprophilum*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. hordei* a *P. sp.* Všetky izolované druhy z oplachu sa podieľali rovnakou frekvenciou výskytu (50 %) na kontaminovaní povrchu pšeničného zrna (Graf č. 3). Z 15 izolátov sa na povrchovej kontaminácii najviac podieľali druhy *P. coprophilum* (4) a *P. hordei* so štyrmi izolátmi (Graf č. 4).

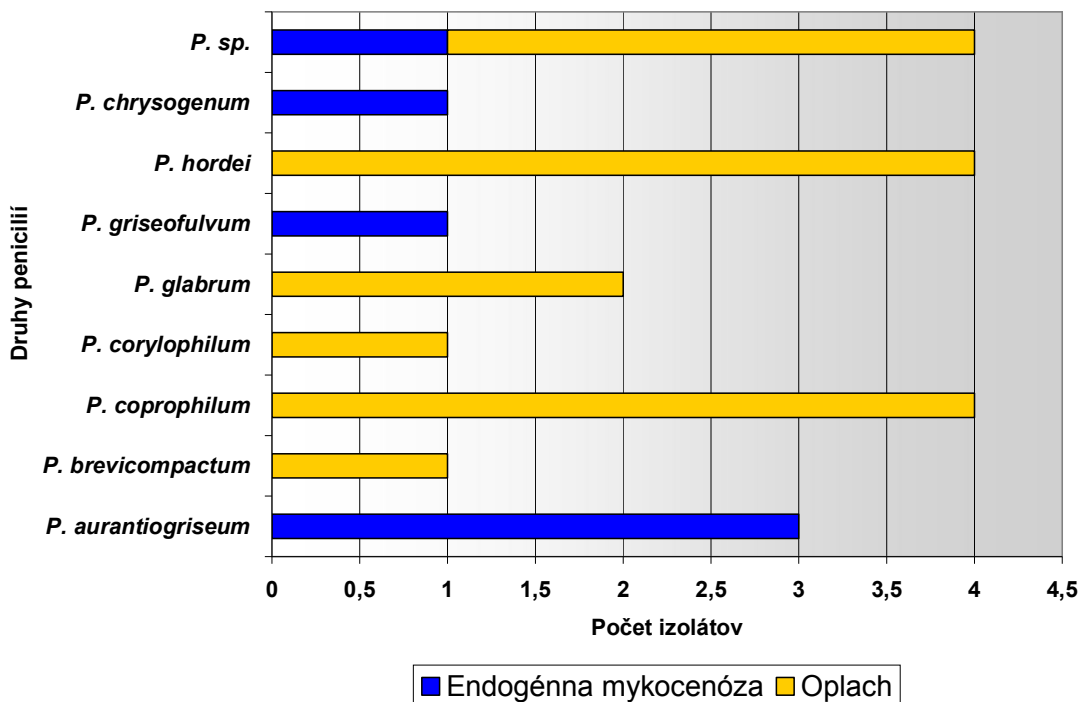
Zo všetkých izolátov (21) sa na oboch typoch kontaminácie podieľal iba druh *P. sp.* (4).

Tab. č. 10: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 2 vzoriek pšenice zo Žilinského kraja v sezóne 2008

Druhy penicilií	Žilinský kraj						Celkový počet izolátov
	Endogénna mykocenóza			Oplach			
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	
<i>P. aurantiogriseum</i>	2	100	3	-	-	-	3
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	1	50	1	1
<i>P. coprophilum</i>	-	-	-	1	50	4	4
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	1	50	1	1
<i>P. glabrum</i>	-	-	-	1	50	2	2
<i>P. griseofulvum</i>	1	50	1	-	-	-	1
<i>P. hordei</i>	-	-	-	1	50	4	4
<i>P. chrysogenum</i>	1	50	1	-	-	-	1
<i>P. sp.</i>	1	50	1	1	50	3	4
			Σ 6			Σ 15	Σ 21



Graf č. 3: Frekvencia výskytu penicilii (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu z 2 vzoriek pšenice zo Žilinského kraja v sezóne 2008



Graf č. 4: Počet izolátov penicilii z endogénnej mykocenózy a oplachu z 2 vzoriek pšenice zo Žilinského kraja v sezóne 2008

4.1.3 Celkové mykotické zastúpenie penicilií vo vzorkách pšenice z krajov stredného Slovenska

Celkovo sme z lokalít stredného Slovenska izolovali a identifikovali 14 druhov penicilií z oboch foriem izolácie v celkovom počte 185 izolátov (Tab. č. 11).

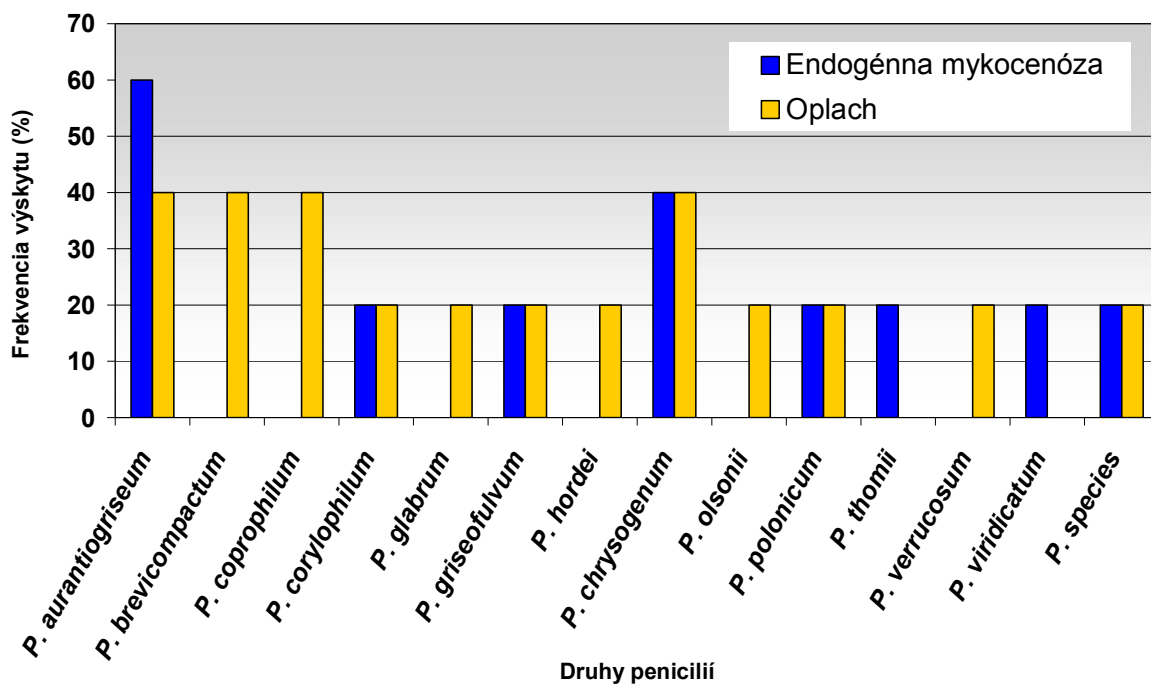
Z endogénnej mykocenózy sme izolovali 8 druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. coprophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum*, *P. thomii*, *P. viridicatum*, a *P. sp.* Najvyššiu frekvenciu výskytu (60 %) z endogénnej mykocenózy vykazoval druh *P. aurantiogriseum*, po ňom nasledoval druh *P. chrysogenum* (40 %). Ostatné uvedené druhy vykazovali 20 % frekvenciu výskytu (Graf č. 5). *P. chrysogenum* (73) predstavoval najvyššie zastúpenie z hľadiska počtu izolátov (92), ktoré sme izolovali z vnútra zrna.

Najvyššiu diverzitu druhov sme zaznamenali opäť z oplachu (12 druhov), konkrétne *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. coprophilum*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. chrysogenum*, *P. olsonii*, *P. polonicum*, *P. verrucosum* a *P. sp.* Štyridsať % frekvencia výskytu bola zaznamenaná u štyroch druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. coprophilum* a *P. chrysogenum*. Pri väčšine spomínaných druhov bola frekvencia 20 % (Graf č. 5). Celkovo sme z oplachu izolovali 93 izolátov. Najvyšší počet izolátov nielen z endogénnej mykocenózy, ale aj z oplachu tvoril druh *P. chrysogenum* (53).

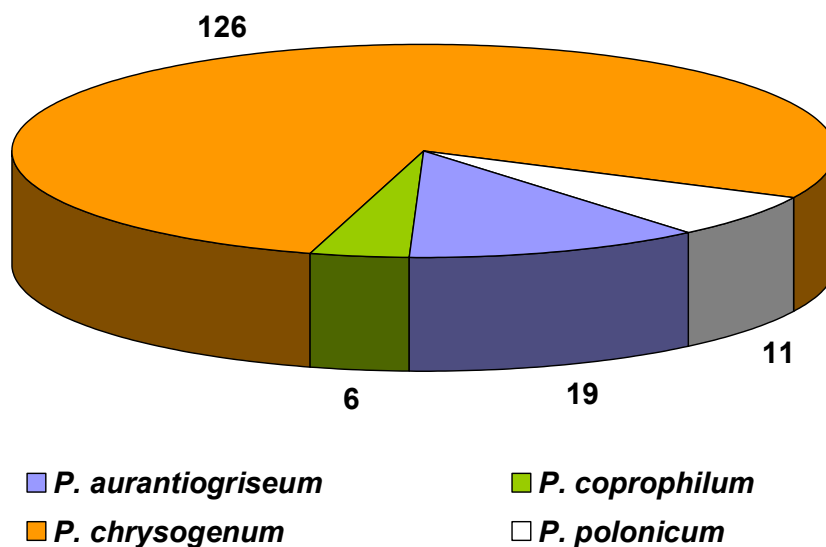
Šesť izolátov sme vyizolovali z endogénnej mykocenózy a zároveň aj oplachu, konkrétne to boli kmene: *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum* a *P. sp.* Celkovo možno podotknúť, že pšeničné zrná analyzované z oblastí stredného Slovenska boli prevažne kontaminované povrchovo s významnou prevahou druhu *P. chrysogenum* (126) zo 185 izolátov (Graf č. 6), čo predstavovalo 68 % podiel. Desiat % podielom sa na kontaminácii vzoriek pšenice podieľal druh *P. aurantiogriseum*.

Tab. č. 11: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z oboch krajov stredného Slovenska v sezóne 2008

Druhy penicilií	Stredné Slovensko						Celkový počet izolátov	% podiel izolátov
	Endogénna mykocenóza			Oplach				
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov		
<i>P. aurantiogriseum</i>	3	60	4	2	40	15	19	10
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	2	40	2	2	1
<i>P. coprophilum</i>	1	20	1	2	40	5	6	3
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	1	20	1	1	0,5
<i>P. glabrum</i>	-	-	-	1	20	2	2	1
<i>P. griseofulvum</i>	1	20	1	1	20	1	2	1
<i>P. hordei</i>	-	-	-	1	20	4	4	2
<i>P. chrysogenum</i>	2	40	73	2	40	53	126	68
<i>P. olsonii</i>	-	-	-	1	20	1	1	0,5
<i>P. polonicum</i>	1	20	6	1	20	5	11	6
<i>P. thomii</i>	1	20	5	-	-	-	5	3
<i>P. verrucosum</i>	-	-	-	1	20	1	1	0,5
<i>P. viridicatum</i>	1	20	1	-	-	-	1	0,5
<i>P. sp.</i>	1	20	1	1	20	3	4	2
			Σ 92			Σ 93	Σ 185	



Graf č. 5: Frekvencia výskytu penicilii (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z oboch krajov stredného Slovenska v sezóne 2008



Graf č. 6: Najčastejšie sa vyskytujúce penicilii vo vzorkách pšenice s celkovým počtom izolátov z krajov stredného Slovenska v sezóne 2008

4.2 Výsledky vzoriek z lokalít východného Slovenska

Šesť vzoriek pšeničných zŕn sme odobrali z Košického a Prešovského kraja východného Slovenska, pričom 3 vzorky z Košického kraja pochádzali zo Smižian a 3 z Prešovského kraja z Popradu – Matejoviec, Spišského Bystrého a Prešova. Vo vzorkách sme zisťovali stupeň endogénnej a povrchovej kontaminácie peniciliami.

4.2.1 Košický kraj

Z troch vzoriek skladovaných pšeničných zŕn sme izolovali celkovo 6 druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. coprophilum*, *P. corylophilum*, *P. italicum*, *P. rubrum* a *P. sp.* (Tab. č. 12).

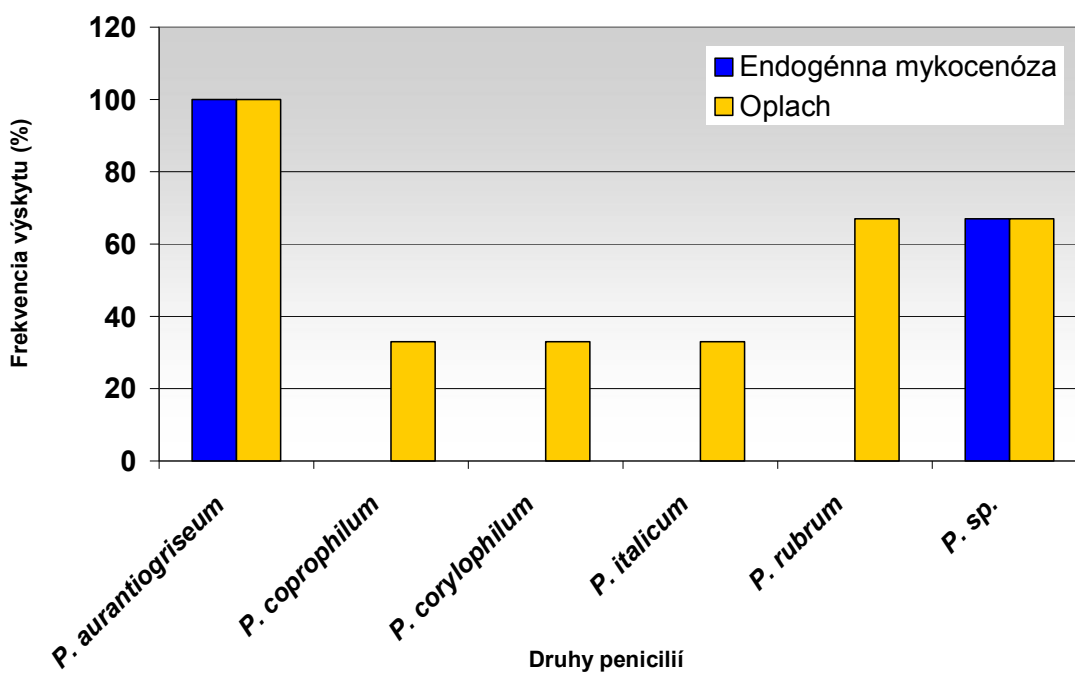
Prvým spôsobom izolácie (stanovením endogénnej mykocenózy) sme izolovali len 2 druhy, ale s vysokou frekvenciou výskytu a pomerne vysokým počtom izolátov. Ide o *P. aurantiogriseum* (100 %, 32) a *P. sp.* (67 %, 84) (Graf č. 7, Graf č. 8).

Z povrchového oplachu vzoriek pšeničných zŕn sme izolovali a identifikovali 6 druhov penicilií, s celkovým počtom izolátov 551. Najvyšší počet izolátov 519 so 100 % frekvenciou výskytu sme zistili pri druhu *P. aurantiogriseum*, potom nasledoval druh *P. rubrum* so 67 % frekvenciou výskytu s počtom 5 (Graf č. 7, Graf č. 8).

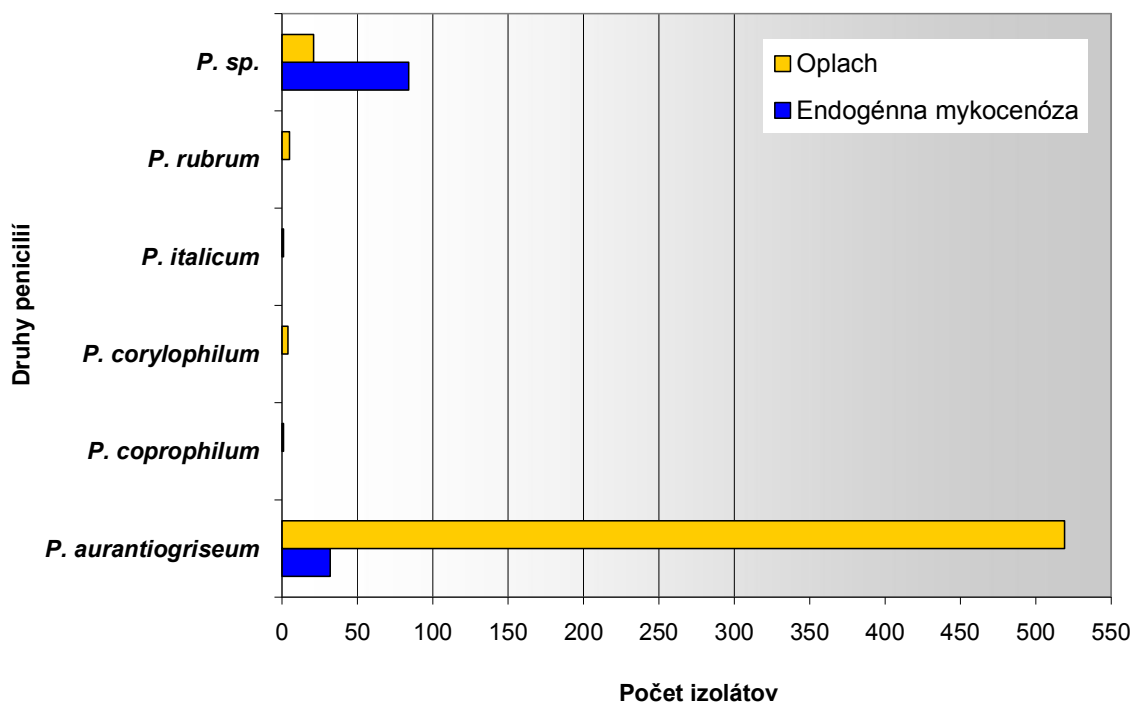
Najvyššie zastúpenie z endogénnej mykocenózy aj z oplachu sme zaznamenali pri druhu *P. aurantiogriseum* s počtom izolátov 551, potom nasledoval *P. sp.* s počtom 105.

Tab. č. 12: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Košického kraja v sezóne 2008

Druh	Košický kraj						Celkový počet izolátov
	Endogénna mykocenóza			Oplach			
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	
<i>P. aurantiogriseum</i>	3	100	32	3	100	519	551
<i>P. coprophilum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	1	33	4	4
<i>P. italicum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. rubrum</i>	-	-	-	2	67	5	5
<i>P. sp.</i>	2	67	84	2	67	21	105
			Σ 116			Σ 551	Σ 667



Graf č. 7: Frekvencia výskytu penicilií (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Košického kraja v sezóne 2008



Graf č. 8: Počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Košického kraja v sezóne 2008

4.2.2 Prešovský kraj

Z troch lokalít Prešovského kraja sme analyzovali 3 vzorky pšeničných zŕn, z ktorých sme oboma spôsobmi izolácie (endogénna mykocenóza, oplach) identifikovali celkovo 11 rôznych druhov penicilií (Tab. č. 13).

Pomocou endogénnej kontaminácie sme získali 8 druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum* a *P. sp.*. Ako znázorňuje graf č. 9, *P. aurantiogriseum* a *P. sp.* sa vyskytovali s najvyššou frekvenciou (67 %). Z celkového počtu 17 izolátov tvorili najvyšší počet druhu *P. aurantiogriseum* (4) a *P. roqueforti* (4), nasledovali druhy s dvoma izolátmi *P. citrinum*, *P. glabrum* a *P. sp.* (Graf č. 10).

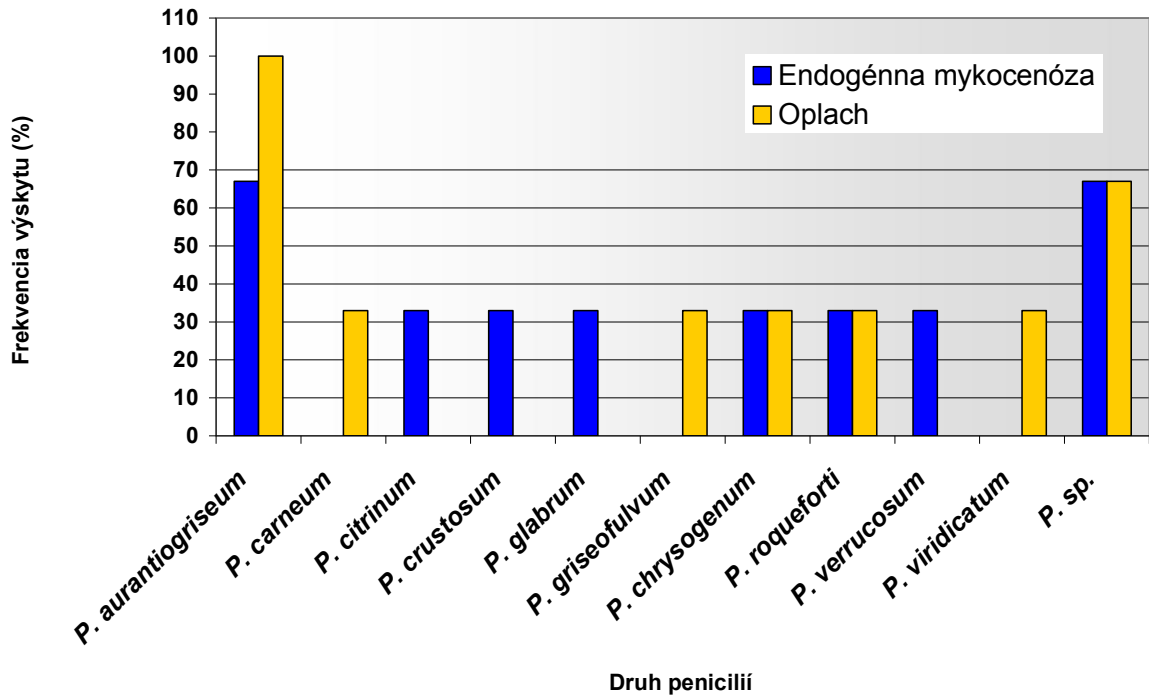
Izolovaním mykocenózy z oplachu sme analyzovali 7 druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. carneum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum* a *P. sp.* 100 % frekvencia výskytu sa nachádzala len u jediného druhu *P. aurantiogriseum*, 67 % frekvenciu výskytu vykazovali izoláty *P. sp.* (Graf č. 9).

Najvyššie zastúpenie z celkového počtu izolátov (33) z oplachu mal druh *P. sp.* (10), nasledovali peniciliá *P. roqueforti* (9), *P. aurantiogriseum* (7) a *P. chrysogenum* (4).

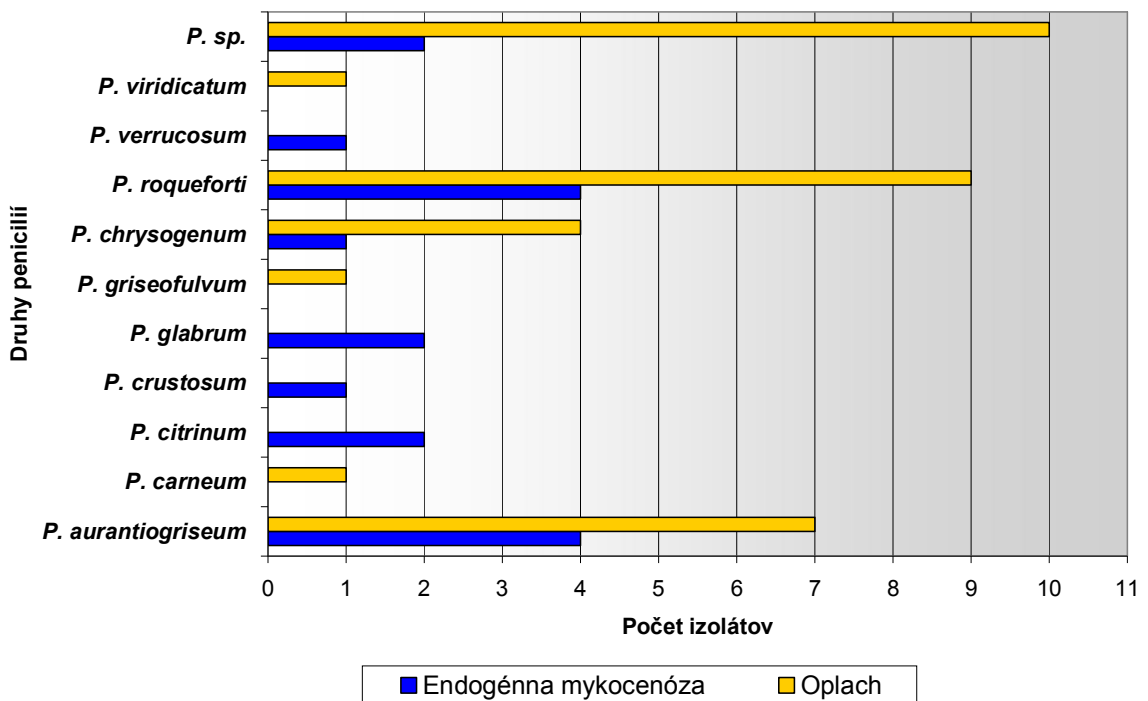
Oboma formami izolácie (endogénna mykocenóza, oplach) sme izolovali celkovo 50 izolátov penicilií. Štyri druhy penicilií *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* a *P. sp.* sa podieľali súčasne na endogénnej, ako aj na povrchovej kontaminácii sledovaných vzoriek. Najväčší počet izolátov (13) sme izolovali z druhu *P. roqueforti*, nasledovali druhy *P. sp.* (12), *P. aurantiogriseum* (11) a *P. chrysogenum* s počtom izolátov 5 (Graf č. 10).

Tab. č. 13: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Prešovského kraja v sezóne 2008

Druh	Prešovský kraj						Celkový počet izolátov
	Endogénna mykocenóza			Oplach			
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	
<i>P. aurantiogriseum</i>	2	67	4	3	100	7	11
<i>P. carneum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. citrinum</i>	1	33	2	-	-	-	2
<i>P. crustosum</i>	1	33	1	-	-	-	1
<i>P. glabrum</i>	1	33	2	-	-	-	2
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. chrysogenum</i>	1	33	1	1	33	4	5
<i>P. roqueforti</i>	1	33	4	1	33	9	13
<i>P. verrucosum</i>	1	33	1	-	-	-	1
<i>P. viridicatum</i>	-	-	-	1	33	1	1
<i>P. sp.</i>	2	67	2	2	67	10	12
			Σ 17			Σ 33	Σ 50



Graf č. 9: Frekvencia výskytu penicilií (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Prešovského kraja v sezóne 2008



Graf č. 10: Počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu z 3 vzoriek pšenice z Prešovského kraja v sezóne 2008

4.2.3 Celkové mykotické zastúpenie penicilií vo vzorkách pšenice z krajov východného Slovenska

Vzorky pšeničných zrn, ktoré sme odobrali zo 4 lokalít východného Slovenska boli značne kontaminované vo vnútri zrna, ale najmä na povrchu. Súhrnne sme izolovali 15 druhov penicilií, ktoré sme získali dvoma spôsobmi izolácie (endogénna mykocenóza, oplach), čo činilo 717 izolátov (Tab. č. 14).

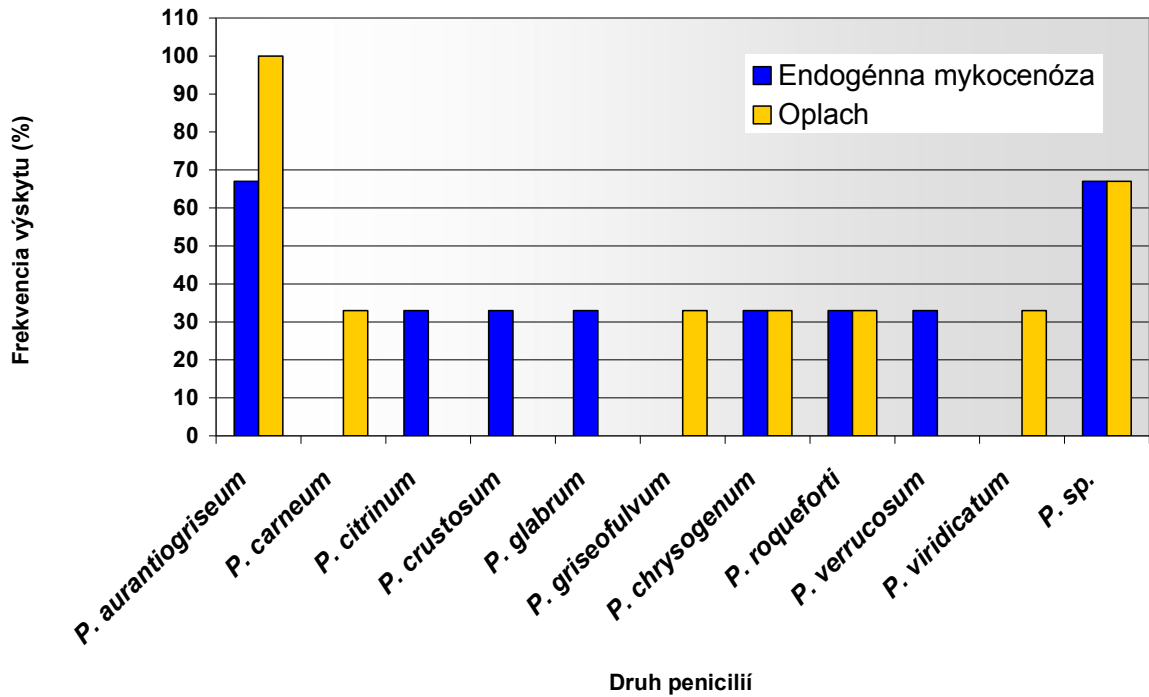
Stanovením endogénnej kontaminácie vzoriek sme určili 8 druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum* a *P. sp.* V endogénnej mykocenóze sa najčastejšie vyskytoval druh *P. aurantiogriseum* s 83 % frekvenciou výskytu, po ňom nasledovali bližšie nešpecifikované druhy penicilií označené ako *P. sp.* so 67 % frekvenciou výskytu izolátov (Graf č. 11). Zo 133 izolátov sa na endogénnej kontaminácii podieľalo vo významnej miere 86 izolátov *P. sp.* a 36 izolátov *P. aurantiogriseum*.

Oplachovou metódou sme izolovali 11 druhov penicilií, konkrétne *P. aurantiogriseum*, *P. carneum*, *P. coprophilum*, *P. corylophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. italicum*, *P. roqueforti*, *P. rubrum*, *P. viridicatum* a *P. sp.* Najvyššou frekvenciou výskytu sa na povrchovej kontaminácii podieľal druh *P. aurantiogriseum* so 100 % frekvenciou (Graf č. 11). Tento druh bol zastúpený taktiež najvyšším počtom izolátov 526 z celkového počtu 584.

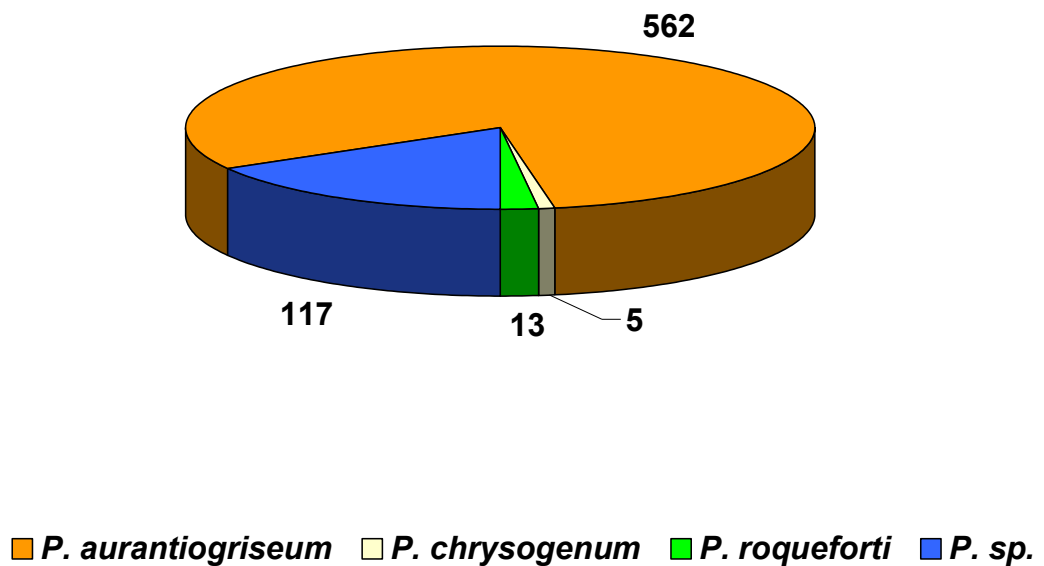
Štyri druhy penicilií *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* a *P. sp.* sme zachytili vo vnútri zrna aj na povrchu (Graf č. 12). Z celkovo izolovaných 717 izolátov sa vo vzorkách vyskytoval v prevažnej miere druh *P. aurantiogriseum* (562) so 78 % podielom izolátov, nasledoval druh *P. sp.* (117) so 16 % podielom izolátov a *P. roqueforti* (13) s 2 % podielom. Ostatné druhy penicilií sa na kontaminácii podieľali menej ako 1 %.

Tab. č. 14: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z oboch krajov východného Slovenska v sezóne 2008

Druhy penicilií	Východné Slovensko						Celkový počet izolátov	% podiel izolátov	
	Endogénna mykocenóza			Oplach					
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov			
<i>P. aurantiogriseum</i>	5	83	36	6	100	526	562	78	
<i>P. carneum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. citrinum</i>	1	17	2	-	-	-	2	0,2	
<i>P. coprophilum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. corylophilum</i>	-	-	-	1	17	4	4	0,6	
<i>P. crustosum</i>	1	17	1	-	-	-	1	0,1	
<i>P. glabrum</i>	1	17	2	-	-	-	2	0,2	
<i>P. griseofulvum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. chrysogenum</i>	1	17	1	1	17	4	5	0,7	
<i>P. italicum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. roqueforti</i>	1	17	4	1	17	9	13	2	
<i>P. rubrum</i>	-	-	-	2	33	5	5	0,7	
<i>P. verrucosum</i>	1	17	1	-	-	-	1	0,1	
<i>P. viridicatum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. sp.</i>	4	67	86	4	67	31	117	16	
	Σ 133			Σ 584			Σ 717		



Graf č. 11: Frekvencia výskytu penicilií (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z oboch krajov východného Slovenska v sezóne 2008



Graf č. 12: Najčastejšie sa vyskytujúce peniciliá vo vzorkách pšenice s celkovým počtom izolátov z oboch krajov východného Slovenska v sezóne 2008

4.2.4 Celkové mykotické zastúpenie penicilií vo vzorkách pšenice z regiónov stredného a východného Slovenska

Z 9 lokalít z regiónov stredného a východného Slovenska sme analyzovali endogénnu a povrchovú kontamináciu 11 vzoriek pšeničných zrn. Celkovo sme vyizolovali 20 druhov penicilií, čo činilo 902 izolátov (Tab. č. 15).

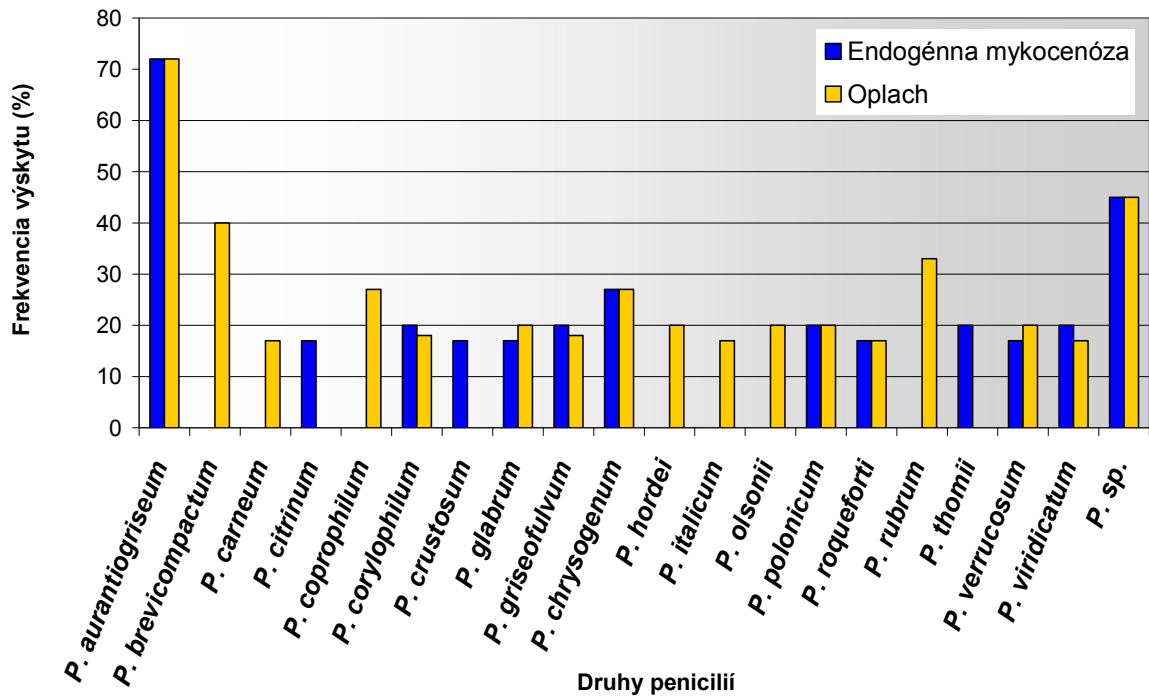
Analýzou endogénnej mykocenózy sme izolovali 13 druhov penicilií: *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum*, *P. roqueforti*, *P. thomii*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*, a *P. sp.*. Najvyššiu frekvenciu výskytu 72 % sme zaznamenali pri druhu *P. aurantiogriseum*. Po ňom nasledovali druhy *P. sp.* (45 %) a *P. chrysogenum* (27 %). Peniciliá *P. corylophilum*, *P. griseofulvum*, *P. polonicum*, *P. thomii* a *P. viridicatum* sa vyskytovali s 20 % frekvenciou (Graf č. 13). Z celkového počtu 225 izolátov, najvyššie počty izolátov vykazovali druhy *P. sp.* (87), *P. chrysogenum* (74) a *P. aurantiogriseum* (40).

Najvyššia diverzita penicilií bola zaznamenaná z oplachu (17 druhov), konkrétne *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. coprophilum*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. chrysogenum*, *P. italicum*, *P. olsonii*, *P. polonicum*, *P. roqueforti*, *P. rubrum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* a *P. sp.* Frekvencia výskytu penicilií bola rôzna, najvyššia bola zaznamenaná pri druhu *P. aurantiogriseum* (72 %), ostatné druhy vykazovali nasledovnú frekvenciu výskytu: *P. sp.* (45 %), *P. brevicompactum* (40 %), *P. rubrum* (33 %), *P. coprophilum* a *P. chrysogenum* rovnako 27 % (Graf č. 13). Zo 677 izolátov sa na povrchovej kontaminácii najviac podieľali druhy *P. aurantiogriseum* (541) a *P. chrysogenum* (57).

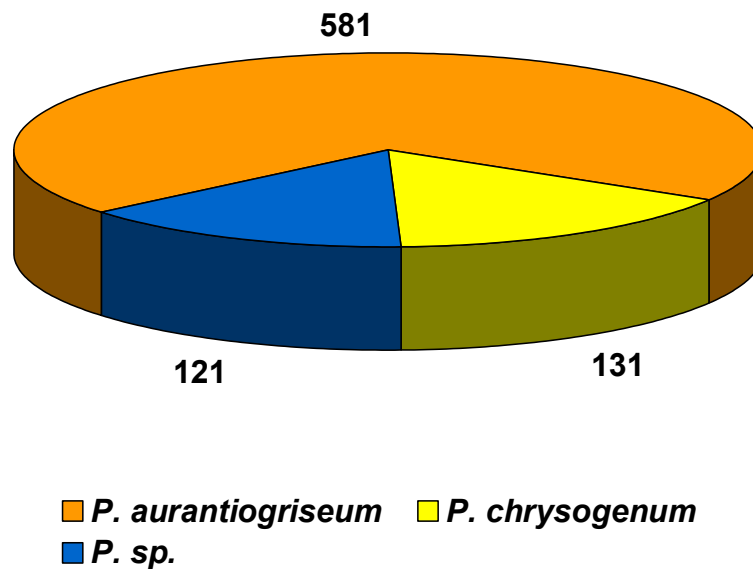
Analyzované vzorky pšenice vykazovali vysoký podiel mykotickej kontaminácie. 10 druhov izolovaných penicilií *P. aurantiogriseum*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* a *P. sp.* sa vyskytovali súčasne v endogénnej mykocenóze aj oplachu. Z celkového počtu 902 izolátov sa najčastejšie vyskytoval druh *P. aurantiogriseum* (581), so 64 % podielom izolátov, nasledovali druhy *P. chrysogenum* (131) s 15 % podielom a *P. sp.* (121) s podielom 13 % (Graf č. 14). Ostatné spomenuté druhy penicilií sa podieľali na kontaminácii menej ako 2 %.

Tab. č. 15: Frekvencia výskytu a počet izolátov penicilií z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z regiónov stredného a východného Slovenska v sezóne 2008

Druhy penicilií	Stredné a Východné Slovensko						Celkový počet izolátov	% podiel izolátov	
	Endogénna mykocenóza			Oplach					
	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov	Pozitívne vzorky	Frekvencia (%)	Počet izolátov			
<i>P. aurantiogriseum</i>	8	72	40	8	72	541	581	64	
<i>P. brevicompactum</i>	-	-	-	2	40	2	2	0,2	
<i>P. carneum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. citrinum</i>	1	17	2	-	-	-	2	0,2	
<i>P. coprophilum</i>	-	-	-	3	27	6	6	0,7	
<i>P. corylophilum</i>	1	20	1	2	18	5	6	0,7	
<i>P. crustosum</i>	1	17	1	-	-	-	1	0,1	
<i>P. glabrum</i>	1	17	2	1	20	2	4	0,4	
<i>P. griseofulvum</i>	1	20	1	2	18	2	3	0,3	
<i>P. chrysogenum</i>	3	27	74	3	27	57	131	15	
<i>P. hordei</i>	-	-	-	1	20	4	4	0,4	
<i>P. italicum</i>	-	-	-	1	17	1	1	0,1	
<i>P. olsonii</i>	-	-	-	1	20	1	1	0,1	
<i>P. polonicum</i>	1	20	6	1	20	5	11	1,2	
<i>P. roqueforti</i>	1	17	4	1	17	9	13	1,4	
<i>P. rubrum</i>	-	-	-	2	33	5	5	0,6	
<i>P. thomii</i>	1	20	5	-	-	-	5	0,6	
<i>P. verrucosum</i>	1	17	1	1	20	1	2	0,2	
<i>P. viridicatum</i>	1	20	1	1	17	1	2	0,2	
<i>P. sp.</i>	5	45	87	5	45	34	121	13	
	Σ 225			Σ 677			Σ 902		



Graf č. 13: Frekvencia výskytu penicilii (%) z endogénnej mykocenózy a oplachu zo vzoriek pšenice z regiónov stredného a východného Slovenska v sezóne 2008



Graf č. 14: Najčastejšie sa vyskytujúce peniciliá vo vzorkách pšenice s celkovým počtom izolátov z oboch regiónov stredného a východného Slovenska v sezóne 2008

4.3 Toxinogenita izolovaných penicilií

Pšeničné zrná sú najčastejším substrátom pre produkciu mykotoxínov, preto sme u testovaných vzoriek analyzovali aj potenciálne toxické druhy penicilií a ich následnú produkciu jednotlivých mykotoxínov metódou tenkovrstvovej chromatografie (TLC). Zamerali sme sa na toxinogenitu siedmich mykotoxínov: citrinínu (C), grizeofulvínu (G), kyseliny cyklopiazónovej (CPA), ochratoxínu A (OTA), patulínu (P), penitrému A (PA) a roquefortínu C (RC).

4.3.1 Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Banskobystrického kraja

Z troch vzoriek pšeničných zŕn odobratých z 3 lokalít Banskobystrického kraja sme testovali 11 kmeňov štyroch potencionálne toxinogénnych druhov: *P. coprophilum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum* (Tab. č. 16).

Žiaden z 5 kmeňov *P. chrysogenum* z endogénnej mykocenózy neprodukoval roquefortín C.

Z oplachu bolo skriningovaných 7 kmeňov, pričom 1 kmeň *P. chrysogenum* zo štyroch produkoval roquefortín C, *P. griseofulvum* produkoval všetky sledované mykotoxíny s výnimkou kyseliny cyklopiazónovej, *P. coprophilum* produkoval roquefortín C, ale neprodukoval grizeofulvín. Toxinogenita citrinínu a ochratoxínu A pri kmeni *P. verrucosum* nebola potvrdená.

Tab. č. 16: Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (*in vitro*) zo vzoriek pšeničných zŕn z Banskobystrického kraja v sezóne 2008

Testované druhy penicilií	Banskobystrický kraj						
	Endogénna mykocenóza	Oplach					
		RC	C	CPA	G	OTA	P
<i>P. coprophilum</i>				0/1			1/1
<i>P. griseofulvum</i>			0/1	1/1		1/1	1/1
<i>P. chrysogenum</i>	0*/5**						1/4
<i>P. verrucosum</i>		0/1			0/1		

Použité skratky:

C – citrinín, **CPA** – kyselina cyklopiazónová, **G** – grizeofulvín, **OTA** – ochratoxín A, **P** – patulín, **RC** – roquefortín C

* - počet pozitívnych kmeňov ** - počet testovaných kmeňov

4.3.2 Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Žilinského kraja

Z dvoch vzoriek zrn pšenice potravinárskej pochádzajúcich z dvoch lokalít Žilinského kraja sme testovali 6 kmeňov dvoch zástupcov penicilií: *P. coprophilum* a *P. hordei* (Tab. č. 17).

Z dvoch potencionálne toxinogénnych kmeňov *P. coprophilum* ani jeden neprodukoval grizeofulvín, produkcia roquefortínu C bola potvrdená u oboch. Pri ostatných sledovaných kmeňoch toxinogenita TLC metódou nebola potvrdená.

Tab. č. 17: Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (*in vitro*) zo vzoriek pšeničných zrn zo Žilinského kraja v sezóne 2008

Testované druhy penicilií	Žilinský kraj		
	Endogénna mykocenóza	Oplach	
		G	RC
<i>P. coprophilum</i>	-	0*/2**	2/2
<i>P. hordei</i>	-		0/4

Použité skratky:

G – grizeofulvín, **RC** – roquefortín C

* - počet pozitívnych kmeňov ** - počet testovaných kmeňov

4.3.3 Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Košického kraja

Z lokality Smižany z Košického kraja sme sumárne odobrali všetky 3 vzorky pšenice, z ktorých sme testovali na potenciálnu toxinogenitu jediného zástupcu mikroskopických húb z oplachu *P. coprophilum* (Tab. č. 18).

Produkcia grizeofulvínu a roquefortínu C sa pri tomto kmene nepotvrdila.

Tab. č. 18: Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (*in vitro*) zo vzoriek pšeničných zŕn z Košického kraja v sezóne 2008

Testovaný druh penicilií	Košický kraj		
	Endogénna mykocenóza	Oplach	
		G	RC
<i>P. coprophilum</i>	-	0*/1**	0/1

Použité skratky:

G – grizeofulvín, RC – roquefortín C

* - počet pozitívnych kmeňov

** - počet testovaných kmeňov

4.3.4 Toxinogenita izolovaných penicilií z lokalít Prešovského kraja

Z troch vzoriek pšeničných zŕn odobraných z 3 lokalít Prešovského kraja sme testovali 8 kmeňov siedmich potenciálne toxinogénnych druhov penicilií: *P. carneum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum* (Tab. č. 19).

Z endogénnej mykocenózy sme sledovali 3 kmene potenciálne toxinogénnych penicilií, pričom *P. citrinum* produkoval citrinín, *P. crustosum* produkoval penitrém A aj roquefortín C, *P. verrucosum* produkoval citrinín, ale produkcia ochratoxínu A sa u tohto kmeňa nepotvrdila.

Z 5 kmeňov skriningovaných z povrchovej mykocenózy 2 kmene *P. roqueforti* z dvoch produkovali roquefortín C, *P. carneum* produkoval roquefortín C, ale neprodukoval patulín a penitrém A. *P. griseofulvum* produkoval všetky sledované mykotoxíny, s výnimkou kyseliny cyklopiazónovej. Pri druhu *P. chrysogenum* sa toxinogenita nepotvrdila.

Tab. č. 19: Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (*in vitro*) zo vzoriek pšeničných zŕn z Prešovského kraja v sezóne 2008

Testované druhy penicilií	Prešovský kraj									
	Endogénna mykocenóza				Oplach					
	C	OTA	PA	RC	C	CPA	G	P	PA	RC
<i>P. carneum</i>								0/1	0/1	1/1
<i>P. citrinum</i>	1*/1**									
<i>P. crustosum</i>			1/1	1/1						
<i>P. griseofulvum</i>						0/1	1/1	1/1		1/1
<i>P. chrysogenum</i>										0/1
<i>P. roqueforti</i>										2/2
<i>P. verrucosum</i>	1/1	0/1								

Použité skratky:

C – citrinín, CPA – kyselina cyklopiazónová, G – grizeofulvín, OTA – ochratoxín A, P – patulín,

PA – penitrém A, RC – roquefortín C

* - počet pozitívnych kmeňov

** - počet testovaných kmeňov

4.3.5 Toxinogenita izolovaných penicilií z regiónov stredného a východného Slovenska

Z 5 lokalít stredného a 4 lokalít východného Slovenska sme odberom získali 11 vzoriek pšeničných zŕn, z ktorých sme izolovali 27 kmeňov deviatich potenciálne toxinogénnych zástupcov penicilií: *P. carneum*, *P. citrinum*, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* a *P. verrucosum* (Tab. č. 20).

Rozborom endogénnej mykocenózy sme analyzovali 8 kmeňov penicilií. Žiaden z 5 kmeňov *P. chrysogenum* neprodukoval roquefortín C. *P. citrinum* produkoval citrinín, *P. crustosum* produkoval penitrém A aj roquefortín C. Druh *P. verrucosum* sa podieľal na produkcii citrinínu, nie však na produkcii ochratoxínu A.

Oplachovou metódou bolo skrínigovaných 19 potenciálne toxinogénnych kmeňov. Z 5 kmeňov *P. chrysogenum* produkoval len 1 roquefortín C, zo 4 kmeňov *P. coprophilum*

produkovali 3 roquefortín C, avšak grizeofulvín nebol produkovaný. *P. griseofulvum* produkoval všetky sledované mykotoxíny, okrem kyseliny cyklopiazónovej. Žiaden zo 4 kmeňov *P. hordei* neprodukoval sledovaný roquefortín C. *P. carneum* produkoval roquefortín C, ale neprodukoval patulín ani penitrém A, *P. verrucosum* neprodukoval žiaden zo skrínigovaných mykotoxínov.

Tab. č. 20: Kmene penicilií testované na schopnosť produkcie mykotoxínov metódou TLC (*in vitro*) zo vzoriek pšeničných zrn z oboch regiónov stredného a východného Slovenska v sezóne 2008

Testované druhy penicilií	Regióny stredného a východného Slovenska										
	Endogénna mykocenóza				Oplach						
	C	OTA	PA	RC	C	CPA	G	OTA	P	PA	RC
<i>P. carneum</i>									0/1	0/1	1/1
<i>P. citrinum</i>	1*/1**										
<i>P. coprophilum</i>							0/4				3/4
<i>P. crustosum</i>			1/1	1/1							
<i>P. griseofulvum</i>						0/2	2/2		2/2		2/2
<i>P. hordei</i>											0/4
<i>P. chrysogenum</i>				0/5							1/5
<i>P. roqueforti</i>											2/2
<i>P. verrucosum</i>	1/1	0/1			0/1			0/1			

Použité skratky:

C – citrinín, CPA – kyselina cyklopiazónová, G – grizeofulvín, OTA – ochratoxín A, P – patulín,

PA – penitrém A, RC – roquefortín C

* - počet pozitívnych kmeňov

** - počet testovaných kmeňov

5 Diskusia

Mykotická kontaminácia obilnín sa stáva celosvetovým problémom. FAO uvádza, že až 25 % obilnín z celosvetovej produkcie je znehodnotených mykotoxínmi – toxickými metabolitmi mikromycét, s čím sú spojené obrovské ekonomické a agronomické straty.

Predkladaná práca sa zaoberá práve touto problematikou, pričom výsledky získané z analýzy mykotickej a mykotoxinogénnej kontaminácie pšeničných zŕn z regiónov stredného a východného Slovenska zo sezóny 2008 porovnáva s výsledkami iných autorov. Vzorky pšeničných zŕn sme odobrali zo štyroch krajov Slovenska (Banskobystrický, Žilinský, Košický, Prešovský), celkovo sme získali 11 vzoriek, ktoré sme podrobili sledovaniu mykotickej kontaminácie druhmi rodu *Penicillium* z endogénnej mykocenózy a oplachu. Druhy rodu *Penicillium* sú často prítomné ako kontaminanty poľnohospodárskych komodít počas sušenia a skladovania (Creppy, 2002). Po identifikácii jednotlivých druhov penicilií sme analyzovali toxinogenitu izolátov, čiže ich schopnosť tvoriť v substráte mykotoxíny. Toxinogenita bola detekovaná metódou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) v podmienkach *in vitro*.

Z regiónov stredného Slovenska sme izolovali a identifikovali celkovo 14 druhov a 185 izolátov penicilií. Najvyšší počet izolátov (126) vykazoval druh *P. chrysogenum*, čo predstavovalo 68 % zo všetkých izolátov. Najvyššiu frekvenciu výskytu (60 %) z oboch metód izolácie (endogénna mykocenóza, oplach) sme zistili pri druhu *P. aurantiogriseum*, čo sa zhoduje s výsledkami Tančinovej et al. (2009), ktorí zo vzoriek pšenice z roku 2007 zistili najvyššiu frekvenciu výskytu (23,3 %) práve z druhu *P. aurantiogriseum*.

Mykotické osídlenie vzoriek z regiónov východného Slovenska sa v porovnaní so vzorkami z lokalít stredného Slovenska mierne líšilo. Mykoflóra tých istých skladovaných produktov bude rozdielna, ak budú skladované za rozdielnych podmienok (Tančinová et Labuda, 2006). Z lokalít východného Slovenska sme identifikovali celkovo 15 druhov a 717 izolátov penicilií z oboch foriem izolácie. Najvyššiu frekvenciu výskytu (100 %) a zároveň najväčší počet izolátov (562) sme analyzovali z druhu *P. aurantiogriseum* z oboch metód izolácie (endogénna mykocenóza, oplach). *P. aurantiogriseum* sa celoplošne vo svete bežne vyskytuje (Frisvad et Samson, 1991).

Analyzované vzorky z oboch sledovaných regiónov Slovenska vykazovali značnú povrchovú mykotickú kontamináciu, z 20 druhov penicilií sme až 16 druhov identifikovali z oplachu. Z celkového počtu 902 izolátov sa najčastejšie vyskytoval druh *P.*

aurantiogriseum (581), ktorý tvoril 64 % podiel izolátov, a *P. chrysogenum* (131) s 15 % podielom.

Jednotlivé izoláty penicilií sme podrobili testovaniu toxinogenity - schopnosti vytvárať v podmienkach *in vitro* zdraviu nebezpečné mykotoxíny. Analyzované kmene (21) odobraté z oboch regiónov Slovenska produkovali mykotoxíny v oboch spôsoboch izolácie (endogénna mykocenóza, oplach).

Z 8 kmeňov testovaných z endogénnej mykocenózy 3 kmene (37 %) produkovali mykotoxíny. Väčšinu mykotoxínov sme detekovali z oplachu, z 19 odobratých kmeňov sa až 14 kmeňov (74 %) podieľalo na produkcii mykotoxínov. Druh *Penicillium griseofulvum* produkoval súčasne viac mykotoxínov (grizeofulvín, patulín, roquefortín C), čo sa stotožňuje s tvrdením Dlouhého (1998), že konkrétny druh huby môže produkovať rôzne mykotoxíny.

Citrinín je klasifikovaný ako stredne silný mykotoxín s nefrotoxickými účinkami. Môže sa vyskytovať spoločne s ochratoxínom A (Šimůnek, 2003), čo sa v našich výsledkoch nepotvrdilo. Z toxinogénnych kmeňov *P. citrinum* (1) a *P. verrucosum* (1) oba produkovali citrinín so 100 % frekvenciou, čo sa zhoduje s výsledkami autorov Tančinovej et al. (2009), ktorí zo vzoriek pšenice z roku 2007 izolovali dva kmene *P. citrinum*, pričom oba kmene produkovali citrinín. Obdobne Felšöciová et al. (2009) zo vzoriek pšenice z konvenčného poľnohospodárstva zo sezóny 2006/2007 izolovali ako producentov citrinínu 5 kmeňov *P. citrinum*.

Kyselina cyklopiazónová (CPA) patrí medzi neurotoxíny, spôsobuje poškodenie tráviacej sústavy a pečene (Šimůnek, 2003). Z našich testovaných kmeňov *P. griseofulvum* ani jeden CPA neprodukoval.

Z hľadiska toxicity patrí grizeofulvín medzi slabo toxické mykotoxíny (Golian, 1998), pôsobí toxicky v kostnej dreni, črevnom epiteli a tumoroch (Pitt et Leistner, 1991). Produkcia grizeofulvínu bola zaznamenaná u dvoch (33 %) zo 6 kmeňov. Grizeofulvín produkovali dva kmene *P. griseofulvum*, čo sa zhodovalo aj s výsledkami Tančinovej et al. (2009), ktorí uvádzajú produkciu grizeofulvínu u všetkých 20 kmeňov *P. griseofulvum*.

Potenciálnym producentom ochratoxínu A bol druh *Penicillium verrucosum*. Za hlavného producenta ochratoxínu A v obilninách dopestovaných v Európe považujú Lund et Frisvad (2003) práve tento druh. Nami izolovaný kmeň *Penicillium verrucosum* ochratoxín A neprodukoval.

Patulín patrí medzi silne toxické mykotoxíny (Golian et Zeleňáková, 2010), narúša proces dýchania a permeabilitu bunčných membrán (Ruprich, 2002). Zo 4 kmeňov

potenciálnych producentov patulínu *P. carneum*, *P. coprophilum*, *P. griseofulvum* sme izolovali tri (75 %), ktoré mykotoxín produkovali. Na produkcii patulínu sa podieľali kmene *P. griseofulvum* (2) a *P. coprophilum* (1). V štúdií, ktorú realizovali Felšöciová et al. (2009) na pšeničných zrnách v sezóne 2006/2007, produkovali patulín mykotoxinogénne druhy *P. coprophilum*, *P. griseofulvum* a *P. raistrickii*.

Penitrém A je zaradený medzi silné neurotoxíny (Golian, 1998), obvykle produkovaný druhom *P. crustosum* (Tančinová et Labuda, 2006), s čím sa stotožňujú naše výsledky. Z dvoch testovaných kmeňov produkoval penitrém A iba *P. crustosum*. Podobne izolovali Felšöciová et al. (2008) penitrém A zo všetkých troch kmeňov *P. crustosum* zo vzoriek pšenice z konvenčného poľnohospodárstva v sezóne 2007.

Roquefortín C patrí medzi mykotoxíny s nízkou toxicitou, avšak je klasifikovaný ako neurotoxín (Dijksterhuis et Samson, 2007). Naše vzorky boli najviac kontaminované práve týmto mykotoxínom. Z 24 testovaných kmeňov až 10 (42 %) produkovalo tento mykotoxín. Z potenciálnych producentov roquefortínu C sme izolovali druhy *P. carneum* (1), *P. coprophilum* (3), *P. crustosum* (1), *P. griseofulvum* (2), *P. chrysogenum* (1), *P. roqueforti* (2). Felšöciová et al. (2009) izolovali z pšeničných zrn v sezóne 2006/2007 20 pozitívnych kmeňov penicilií, ktoré produkovali roquefortín C, pričom niektoré izolované druhy penicilií boli totožné s našimi (*P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*).

6 Návrh na využitie výsledkov

Výskyt vláknitých mikroskopických húb, konkrétne zástupcov rodu *Penicillium* Link má svoje pozitívne a negatívne stránky. Za pozitívum možno pokladať významné uplatnenie niektorých druhov penicilií v biotechnológiách, potravinárstve, farmácii pri výrobe antibiotík, či v genetickom inžinierstve. Oveľa častejšie sa však stretávame s negatívnymi stránkami ich pôsobenia.

V nemalej miere sa podieľajú na skladovej kontaminácii poľnohospodárskych komodít, najmä obilnín, čím spôsobujú vysoké ekonomické straty. Problém výskytu penicilií ako skladových kontaminantov spočíva v produkcii sekundárnych toxických metabolitov - mykotoxínov, ktoré predstavujú rôzne zdravotné riziká pre ľudí a zvieratá.

Predkladaná diplomová práca poukazuje najmä na mykotické znehodnocovanie pšenice potravinárskej, základnej zložky potravinovej pyramídy. Analýzou vzoriek pšenice potravinárskej, odobratých z regiónov stredného a východného Slovenska sa potvrdila mykotická kontaminácia druhmi rodu *Penicillium*, ako aj produkcia mykotoxínov u niektorých druhov.

Na základe dosiahnutých výsledkov navrhujeme venovať zvýšenú pozornosť pozberovému uskladneniu a skladovým podmienkam, ako aj predzberovej prevencii. Za dôležité pokladáme zavedenie systému HACCP, na ktorom by mal byť založený program kontroly potravín a krmív, aby sa zamedzilo spracovaniu kontaminovaných obilnín na výrobu potravín a krmív.

Podľa našich odporúčaní je potrebné sa problematikou výskytu mikroskopických húb, ako aj mykotoxínov v obilninách naďalej zaoberať.

7 Záver

Mykotická kontaminácia obilnín skladovými hubami je súčasnosti čoraz viac riešenou problematikou. Druhy rodu *Penicillium* často osídľujú za priaznivých podmienok uskladnené poľnohospodárske komodity, obzvlášť obilniny. Nedochádza len k samotnému znehodnoteniu kvality alebo nutričnej hodnoty plodiny, ale hlavné riziko spočíva v produkcii ťažko odbúrateľných toxických metabolitov – mykotoxínov, ktoré kumuláciou sa v organizme človeka alebo zvieratá vyvolávajú ireverzibilné poruchy zdravia.

V predkladanej diplomovej práci sme analyzovali 11 vzoriek pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) slovenského pôvodu zo sezóny 2008, ktoré sme odobrali z regiónov stredného (Banskobystrický - 3; Žilinský kraj - 2) a východného (Košický – 3; a Prešovský kraj – 3) Slovenska. Zo všetkých vzoriek boli izolované peniciliá.

Z regiónov stredného Slovenska sme zo vzoriek pšenice najvyššiu diverzitu penicilií získali z Banskobystrického kraja z endogénnej mykocenózy (11 druhov, 86 izolátov) s prevahou druhu *P. chrysogenum* (72 izolátov). Spolu sme zo vzoriek stredného Slovenska izolovali 14 druhov penicilií, z ktorých 6 druhov bolo prítomných v oboch spôsoboch izolácie. Zo 185 izolátov sa najčastejšie vyskytoval druh *P. chrysogenum* (126) so 68 % podielom izolátov.

Z regiónov východného Slovenska sme zo vzoriek pšenice najvyššiu diverzitu penicilií získali z Prešovského kraja z oplachu (12 druhov). Prvenstvo v počte izolátov sme zaznamenali v Košickom kraji opäť z oplachu (551) s prevahou druhu *P. aurantiogriseum* (519). Z 15 identifikovaných druhov penicilií zo vzoriek z lokalít východného Slovenska sa 4 druhy penicilií nachádzali v endogénnej a povrchovej mykocenóze. Z počtu 717 izolátov tvoril druh *P. aurantiogriseum* (562) najvyššie percento izolátov (78 %).

Sledovaním endogénnej a povrchovej mykocenózy sme sumárne zo vzoriek z oboch regiónov stredného a východného Slovenska izolovali 20 druhov penicilií, pričom 13 druhov tvorilo endogénnu mykocenózu a 17 druhov sme identifikovali z oplachu. Z uvedeného vyplýva, že vzorky pšeničných zŕn boli od značnej miery kontaminované povrchovo, avšak výrazná bola aj endogénna kontaminácia zrna.

Z celkového počtu 902 izolátov sme zaznamenali na celom sledovanom území najčastejší výskyt druhu *P. aurantiogriseum* (581), ktorý tvoril 64 % podiel izolátov a *P. chrysogenum* (131) s 15 % podielom.

Vybraté kmene potenciálne toxínogénnych druhov penicilií sme testovali metódou TLC v podmienkach *in vitro* na schopnosť produkovať sledované mykotoxíny (citrinín, kyselina cyklopiazónová, grizeofulvín, ochratoxín A, patulín, penitrém A a roquefortín C). Celkovo sme izolovali 27 kmeňov deviatich potenciálne toxínogénnych zástupcov penicilií: *P. carneum*, *P. citrinum*, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* a *P. verrucosum*. Rozborom endogénnej mykocenózy sme analyzovali na toxínogenosť 8 kmeňov penicilií, pričom všetky s výnimkou *P. chrysogenum* produkovali aspoň jeden mykotoxín. Väčšinu mykotoxínov sme izolovali z oplachu, z 19 kmeňov až 14 (74 %) produkovalo minimálne jeden zo sledovaných mykotoxínov.

Z testovaných 27 potenciálne toxínogénnych kmeňov produkovalo mykotoxíny 21 kmeňov (81 %). Desiat kmeňov (48 %) produkovalo roquefortín C, dva kmene (10 %) produkovali citrinín, grizeofulvín, patulín a jeden kmeň (5 %) produkoval penitrém A. Ani jeden z testovaných kmeňov neprodukoval kyselinu cyklopiazónovú, ani ochratoxín A.

8 Zoznam použitej literatúry

1. ABARCA, M. L. et al. 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. In *Journal of food protection*, roč. 66, 2003, s. 504-506.
2. ABRAMSON, D. – USLEBER, E. – MARLBAUER, E. 2001. Immunochemical method for citrinin. In *Mycotoxin protocols*, Towa: Humana Press, Trucksess, M. – Pohland, A. F. (Eds.), 2001, s. 195-204.
3. AL-YAHYA, S. A. 1999. Deterioration rates of wheats as measured by CO₂ production. In *Canadian Agricultural Engineering*, roč. 41, 1999, s. 161-166.
4. BARBORÁKOVÁ, Z. et al. 2010. Výskyt toxínogénnych druhov rodu *Penicillium* v pšenici slovenského pôvodu z úrody 2008 a ich možný vplyv na zdravie konzumenta. In *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, č. 1, s. 1-3, ISSN 1338-0230.
5. BEARDALL, L. J. – MILLER, J. D. 1994. Natural occurrence of mycotoxins other than aflatoxin in Africa, Asia and South America. In *Mycotoxin Res.*, roč. 10, 1994, s. 21-40.
6. BELAJOVÁ, E. 2007. Manažment mykotoxínov. In *Trendy v potravinárstve*, roč. 14, 2007, č. 4, s. 15-19, ISSN 1336-085X
7. BENNETT, J. W. – KLICH, M. 2003. Mycotoxins. In *Clinical Microbiology Review*, roč. 316, 2003, s. 497-516.
8. BETINA, V. 1990. Mykotoxíny, chémia – biológia – ekológia. Bratislava : ALFA, 1990. 288 s. ISBN 80-05-00631-4.
9. BOYSEN, M. – JACOBSSON, K.G. – SCHNURER, J. 2000. Molecular Identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. In *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 66, 2000, s. 1523-1526.

10. BULLERMAN, R. L. 1995. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In *Fumonisin in Food, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Jackson, L. – DeVries, J. W. – Bullerman, L. B. (Eds.), New York: Plenum Press, roč. 392, 1995, s. 27-38.
11. COLE, R. J. – COX, R. H. 1981. Handbook of toxin fungal metabolites. New York, Academic Press, 1981, 937 s. ISBN 0-12-179760-0.
12. CREPPY, E. E. 1999. Human ochratoxicosis. In *J. Toxicol. Rev.*, roč. 18, 1999, s. 277-293.
13. CREPPY, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. In *Toxicology Letters*, roč. 127, 2002, s.19- 28.
14. CUHRA, P. 2009. Kyselina sorbová – pomocník nebo potenciální hrozba?. In *Výživa a potraviny*, roč. 64, 2009, č. 3, s. 66, ISSN 1211-846X.
15. DE HOOOG, G. S. et al. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed., In *Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures*. 2000, 1126 s. ISBN 90-70351-43-9.
16. DIJKSTERHUIS, J. – SAMSON, R. A. 2007. Food Mycology & Multifaceted Approach to Fungi and Food. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007, 403 s. ISBN 0-8493-9818-5.
17. DOLEŽAL, P. – ZEMAN, L. 2006. Charakteristika plesní vo vzťahu ku kvalite objemových krmív. In *Slovenský chov*, roč. 5, 2006, č. 5, s. 16–18, ISSN 1335-1990.
18. FAPOHUNDA, S. O. – OLAJUYIGBE, O. O. 2006. Studies on stored cereal degradation by *Alternaria tenuissima*. In *Acta Botanica Mexicana*, č. 77, 2006, s. 31-40, ISSN 0187-7151.
19. FASSATIOVÁ, O. 1995. Nomen conservandum u rodu *Penicillium*. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995, s.15-16.

20. FELŠÖCIOVÁ, S. et al. 2008. Výskyt *Penicillium* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2007. In *Sborník příspěvků z workshopu MIKROMYCO 2008*, Ed. Nováková, A. 2008.s. 13-23. ISBN 978-80-86525-12-9.
21. FELŠÖCIOVÁ, S. et al. 2009. Endogénna mykobiota pšenice slovenského pôvodu druhov rodu *Penicillium*. In *Acta fytotechnica et zootechnica – mimoriadne číslo*, s. 133 – 143.
22. FILTENBORG, O. – FRISVAD, J. C. – SAMSON, R.A. 2002. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. In *Introduction to food and airborne fungi*. Wageningen: Ponsen & Looyen, Chapter 4, 2002, s. 306-320.
23. FRISVAD, J. C. 1989. The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. In *Archives of Environment Contamination and Toxicology*, roč. 18, 1989, s. 452-467.
24. FRISVAD, J. C. – FILTENBORG, O. 1989. Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and Mycotoxin Production. In *Mycologia*, roč. 81, 1989, s. 837-861.
25. FRISVAD, J. C. – SAMSON, R.A. 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In *Handbook of Applied Mycology*, New York, roč. 3, 1991, s. 31-67.
26. FRISVAD, J. C. - SAMSON, R. A. – DIJKSTERHUIS, J. 2007. Fungi and mycotoxins. In *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, New York, CRC Press, 2007, 375 s. ISBN – 13: 978-0-8493-9818-6.
27. FRISVAD, J. C. – THRANE, U. 1987. Standardized high - performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra. In *J. Chromatogr.* 1987, s.195 -214.
28. FRISVAD, J. C. – THRANE, U. 2002. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In *Introduction to food and Airborne fungi*. 6th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, s. 321-331, ISBN 90-70351-42-0.

29. GOLIAN, J. 1998. Ochorenia z potravín. Nitra: Vydavateľské a edičné stredisko SPU v Nitre, 1998, 123 s. ISBN 80-7137-519-5.
30. GOLIAN, J. 2000. Potraviny v treťom tisícročí – budú naše potraviny bez mykotoxínov?. In *e-poľnohospodár* [online], roč. 44, 2000, č. 15, [cit. 2011-03-03]. Dostupné na internete:
<<http://www.uniag.sk/SKOLA/POLNOHOSP/pol44/clanky/pol15.html>>.
31. GOLIAN, J. – ZELENÁKOVÁ, L. 2010. Ochorenia z potravín, Nitra: SPU, 2010, 105 s. ISBN 978-80-552-0328-7.
32. GÖRNER, F. – VALÍK, L. 2004. Aplikovaná biológia potravín. Praha: Malé centrum, 2004, ISBN 80-967064-9-7.
33. HÄGGBLOM, P. 1990. Isolation of Roquefortine C from Feed Grain. In *American Society for Microbiology*, roč. 56, 1990, č. 9, s. 2924-2926.
34. HUIS in't VELD, J. H. J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. In *Int. J. Food. Microbiol.* roč. 33, 1996, s. 1-18.
35. Image: In *Penicillium*. [cit 2011-02-23]. Dostupné na internete:
<<http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/penic3>>
36. JESENSKÁ, Z. 1987. Mikroskopické huby v potravinách a v krmivách. Bratislava: Alfa, 1987, 320 s. MHV 063-018-87.
37. KARABÍNOVÁ, M. et al. 1997. Špeciálna rastlinná výroba – obilniny. Nitra: SPU, 1997, 210 s. ISBN 80-7137-344-3.
38. KIM, W. J. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. In *Food Rev. Int.*, roč. 9., 1993, s. 299-313.
39. KOSIAK, B. et al. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality – a matched pair sample study. In *Journal Food Mikrobiology*, roč. 93, 2004, s. 51 – 62.

40. KUBÁTOVÁ, A. 1995a. Historie a současný stav rodu *Penicillium*. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995a, s. 3-11.
41. KUBÁTOVÁ, A. 1995b. Studium rodu *Penicillium* v České a Slovenské republice a přehled druhů uváděných z tohto území. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995b, s. 34-35.
42. KUBÁTOVÁ, A. 2000. Nové druhy toxinogenních penicilií nalezené na potravinách a jejich identifikace. In *Aktuální problematika mikrobiologie potravin II. Liblice – Byšice : Dům vědeckých pracovníků Akademie věd*, 2000, s.103-107.
43. LABUDA, R. – LABUDOVÁ, S. 2004. Soil of Arborétum Mlyňany as a source of rare microscopic fungi. In *Actual problems solved in Agrocomplex: International scientific seminar in Nitra*, Nitra: SPU, 2004.
44. LABUDA, R. – TANČINOVÁ, D. 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. In *Ann. Agric. Environ. Med.*, roč. 13, 2006, s. 193-200.
45. LACEY, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 1989, s. 11-25.
46. LACEY, J. – MAGAN, N. 1991. Fungi colonizing cereal grain: their occurrence and water and temperature relationships. In *Cereal Grain – Mycotoxins, Fungi and Quality in Storage*, Chapter 5. Amsterdam: Elsevier. 1991, s. 77-118.
47. LEE, H. B. – MAGAN, N. 1999. Enviroment factors influence in vitro interspecific interaction between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin produktion. In *Mycopathologia*, roč. 146, 1999, č. 1, s. 43-47.
48. LOUČKA, R. – MACHAČOVÁ, E. 1997. Konzervace vlhkého zrna, UZPI Praha, 1997, č. 32, s. 74, ISBN 80-86153-09-6.

49. LOWES, N. R. – SMITH, R. A. – BECK, B. E. 1992. Roquefortine in the stomach contents of dogs suspected of strychnine poisoning in Alberta, *Can Vet J*, 1992, s. 535-538.
50. LUND, F. – FRISVAD, J. C. 1994. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. In *Mycological Research*, roč. 98, 1994, s. 481-492.
51. LUND, F. – FRISVAD, J. C. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. In *J. Appl. Microbiol.*, roč. 95, 2003, s. 1117-1123.
52. MAGAN, N. et al. 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and Mycotoxin accumulation in stored grain. In *European Journal of Plant Pathology*, roč. 109, 2003, s. 723-730.
53. MALÍŘ, F. et al. 2003. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxíny a zdraví člověka. Brno : Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003, 350 s. ISBN 80-7013-395-3.
54. Manipulácia s pozberanými zrninami. 2010, s. 1-4, [cit 2011-03-14]. Dostupné na internete: <<http://www.vetagro.sk/?part=actual>>
55. MARVANOVÁ, L. 1995. Některá vzácnější penicilia a podobné rody. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995, s. 89-97
56. MAŠKOVÁ, Z. et al. 2011. Frequented species of field fungi on wheat and their potential production of toxic metabolites. In *Potravinárstvo*, roč. 5, 2011, č. 1, s. 43-50, ISSN 1338-0230.
57. MILLS, J. T. 1990. Mycotoxins and toxigenic fungi on cereal grains in western Canada. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, roč. 68, 1990, s. 982-986.

58. MOSS, M. O. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In *Mycotoxins and Animal foods*, London, Smith, J. E. – Henderson, R. S. (Eds.), 1991, s. 37-56.
59. NAHM, K. H. 1995. Possibilities for preventing mycotoxicosis in domestic fowl. In *World Poult. Sci. J.*, roč. 51, 1995, s. 177-185.
60. NIELSEN, P. V. – DE BOER, E. 2002. Food preservatives against fungi. In: Samson, R. A. – Hoekstra, E. S. – Frisvad, J. C. – Filtenborg, O. In *Introduction to food and airborne fungi*, Wageningen, 2002, s. 357-367.
61. NOUT, M. R. J. 2002. Useful role of fungi in food processing. In *Atlas of clinical fungi*. Reus: Centraalbureau voor Schimmellecultures, 2002, s. 364-374, ISBN 063-018-87.
62. OSTRÝ, V. – RUPRICH, J. – ŠKARKOVÁ, J. 2002. Rozinky, ochratoxin A a zdraví člověka. In *Výživa a potraviny*, roč. 57, 2002, č. 3, s. 73-78, ISSN 1211-846X.
63. PITT, J. I. 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London : Academic Press, 1979, 634 s.
64. PITT, J. I. 1985. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Australia: Commonwealth scientific and industrial research organization, In *Division of food research*, 1985, 184 s. ISBN 0-643-03949-X.
65. PITT, J. I. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. In *Food Science Australia*, North ride, 2000, 197 s. ISBN 0-643-04837-5.
66. PITT, J. I. – CRIUCKSHANK, R. H. 1990. Speciation and synonymy in *Penicillium* subgenus *Penicillium* - towards a definitive taxonomy. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*, New York, SAMSON, R. A. – PITT, J. I.(Eds.), 1990, s. 103-119.
67. PITT, J. I. – HOCKING, A. D. 1997. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London : Blackie Academic & Professional. 1997. 593 s. ISBN 0-8342-1306-0.

68. PITT, J. I. – LEISTNER, L. 1991. Toxigenic *Penicillium* species. In *Mykotoxins and Animal foods*, London, Smith, J. E. – Henderson, R. S.(Eds.), 1991, s. 81-99.
69. QUILLIEN, J. F. 2002. Mykotoxíny: správa č. 3. – 2002 určená malým a stredným podnikom, Vydavateľstvo NOI Bratislava, 2002, s. 25, ISBN 80-89088-20-1.
70. RAJČÁKOVÁ, L. – MLYNÁR, R. 2005. Mikroskopické huby a mykotoxíny zhoršujú kvalitu vyrábaných krmív, 2005, [cit 2011-03-03]. Dostupné na internete : <<http://www.agroporadenstvo.sk/rv/krmoviny/mykotoxiny.htm?start>>.
71. RAMIREZ, C. 1982. Manual and atlas of the *Penicillia*. Amsterdam, New York, Oxford : Elsevier Biomedical Press, 1982. 874 s. ISBN 0-444-80369-6.
72. RAMOS, A. J. et al. 1998 . Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. In *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 44, 1998, s. 133-140.
73. RAPER, K. – THOM, CH. 1949. A manual of the *Penicillia*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1949, 875 s.
74. ROBERTS, T. A. 1989. Combinations of antimicrobial and processing methods. In *Food Technol.*, roč. 43, 1989, s. 156-163.
75. RUPRICH, J. 1997. Rízení zdravotního rizika podmíněného ochratoxinem A. In *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*. Příloha: Mykotoxin A, hodnocení nebezpečnosti a zdravotního rizika. 1997, č. 6, s. 1-12.
76. RUPRICH, J. 2002. Mykotoxin patulin z jablek v kojeneckých výživách – TV zpráva – pozornost ano, panika ne. 2002, [cit 2011-03-01]. Dostupné na internete: <<http://www.chpr.szu.cz/chemtox/toxikol/patulin.htm>>
77. SAMSON, R. A. et al. 2002. Introduction to food – and Airborne fungi. 6th ed. In *Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures*. 2002. 389 s. ISBN 90-70351-42-0.

78. SAMSON, R. A. - FRISVAD, J. C. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. In *Studies in Mycology*, 49, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2004, s. 1-173.
79. SCUNDAMORE, K. A. – BANKS, J. – MACDONALS, S. J. 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. In *Food Addit. Contam.*, roč. 20, 2003, č. 12, s. 1153-1163.
80. SKOUBOE, P. et al. 2000. Molecular methods for differentiation of closely related *Penicillium* species. In *Integration of modern taxonomic method for Penicillium and Aspergillus classification*, Amsterdam, Samson, R. A. – PITT, J. I. (Eds.), 2000, s. 179-188.
81. SMITH, J. E. – ROSS, K. 1991. The toxigenic aspergilli. In *Mycotoxins and Animal Foods*, Smith, J. E.- Henderson, R. S.(editors): CRP Press, Boca Raton Boston. Chapter 5. 1991, s. 101-118.
82. STAREKOVÁ, A. 2001. Mykotoxíny v potravinách. In *Výživa a potraviny pre tretie tisícročie*. Slovenská poľnohospodárska knižnica- Nitra, 2001, s. 80-83.
83. STOLK, A. C. – SAMSON, R. A. 1972. Studies on *Talaromyces* and related genera II. The genus *Talaromyces*. *Stud. Mycol.*, Baarn, s. 1-65.
84. ŠALGOVIČOVÁ, D. 2007. Kontrola cudzorodých látok v potravinách v rezorte pôdohospodárstva v roku 2006. In *Trendy v potravinárstve*, roč. 14, 2007, č. 3, s. 20-21, ISSN 1336-085X.
85. ŠIMŮNEK, J. 1995. Poruchy zdraví u lidí způsobené toxiny rodu *Penicillium*. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995, s. 117-121.

86. ŠIMŮNEK, J. 2003. Mykotoxiny – přehled nejdůležitějších mykotoxinů. 2003, [cit 2011-03-04]. Dostupné na internete: <<http://www.med.muni.cz/prelek/MYKOTW/vzorce/>>
87. ŠINKOVÁ, T. 2007. Kvalita a bezpečnost biopotravin. In *Trendy v potravinářstve*, roč. 14, 2007, č. 4, s. 23-25, ISSN 1336-085X.
88. ŠTEVLÍKOVÁ, T. – KOPČANOVÁ, L. 1994. Biológia intenzívne obhospodarovaných pôd. Nitra: VŠP, 1994, 196 s. ISBN 80-7137-173-4.
89. ŠTEVLÍKOVÁ, T. et al. 2007a. Mikrobiológia 1. časť. Nitra: SPU, 2007a, 105 s. ISBN 978-80-8069-847-8.
90. ŠTEVLÍKOVÁ, T. et al. 2007b. Mikrobiológia 2. časť. Nitra: SPU, 2007b, 156 s. ISBN 80-8069-683-7.
91. ŠUDYOVÁ, V. – ŠLIKOVÁ, S. – VANČO, B. 2005. Mykotoxíny v potravinárskej pšenici. In *Výživa a zdravie*, roč. 49, 2005, č. 2, s. 28.
92. TANCIK, J. 2009. Regulácia hlavných škodcov kukurice v prvej polovici vegetácie. In *Agromanuál – regionálna príloha*, č. 4, 2009, s. 26, ISSN 1801-7673.
93. TANČINOVÁ, D. 1997. Význam sledovania mykotickej kontaminácie krmných zmesí pre kurčatá. In *Slovenský chov*, roč. 2, 1997, č. 1, s. 26.
94. TANČINOVÁ, D. 2008. Žatva a skladovanie obilnín z hľadiska výskytu mykotoxínov. In *Naše pole*, roč. 12, 2008, č. 12, s. 16-17, ISSN 1335-2466.
95. TANČINOVÁ, D. – KAČÁNIOVÁ, M. – JAVOREKOVÁ, S. 2001. Natural occurrence of fungi in feeding wheat after harvest and during storage in the agricultural farm facilities. In *Biologia*, roč. 56, 2001, č. 3, s. 247-250.
96. TANČINOVÁ, D. – LABUDA, R. 2006. Mykotická kontaminácia vybraných surovín rastlinného pôvodu. In *Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie*, Nitra: SPU, 2006, s. 167-194, ISBN 80-8069-780-9.

97. TANČINOVÁ, D. et al. 2008. Mikrobiológia potravín. Nitra: SPU, 2008, 150 s. ISBN 978-80-552-0145-0.
98. TANČINOVÁ, D. et al. 2009. Endogénna mykocenóza pšenice so zameraním na druhy rodov *Aspergillus* a *Penicillium*. In *Potravinárstvo*, roč. 3, 2009, č. 4, s. 43-50, ISSN 1338-0230.
99. TOMŠÍKOVÁ, A. 1995. Rod *Penicillium* v patogenezi niektorých chorôb. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995, s.103-106.
100. VAŇOVÁ, M. 2008. Kontaminácia obilnín mykotoxínmi a možnosti ochrany. In *Naše pole*, roč. 12, 2008, č. 6, s. 22-24, ISSN 1335-2466.
101. VAŇOVÁ, M. - TVARŮŽEK, L. - HRABALOVÁ, M. 2000. Fuzáriá v klasoch ozimnej pšenice a ochrana proti nim. In *Obilnářské listy*, roč. 8, 2000, č. 5, s. 109.
102. VESELÁ, D. – VESELÝ, D. 1995. Využití produkce mykotoxinů při druhové determinaci penicilií. In *Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu Penicillium*, Praha, Kubátová, A. – Prášil, K. (Eds.), 1995, s. 98-102.
103. VESELÝ, D. – VESELÁ, D. 1991. Use of chick embryos for prediction of embryotoxic effects of mykotoxins in mammals. In *Veterinary Medicine*, roč. 36, 1991, pp. 175-181.
104. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky č. 981/1996. Príloha č. 1 k desiatej hlave druhej časti potravinového kódexu SR. Kontaminanty v potravinách, časť D – mykotoxíny. [cit 2011-03-10].
Dostupné na internete: <http://www.svssr.sk/sk/legislativa/kodex/2_10_01.pdf>.
105. Výročná správa – Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Martine. 2007, s. 3, [cit 2011-04-10]. Dostupné na internete: <<http://www.ruvzmatrin.sk>>

106. ZIMOLKA, J. et al. 2005. Pšenice – pěstování, hodnocení a užití zrna. 1. vydanie
Praha: Profi Press, 2005, s. 109-110. ISBN 80-86726-09-6.