

*Realizace výzkumného projektu Mze ČR QJ1310100
„Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů
v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“
financovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum.*

Řešitelské organizace:

Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko
Mendelova univerzita v Brně
AgroKonzulta Žamberk spol. s r. o.

Uplatněná certifikovaná metodika

Metodika 40/2017

**Metodika výroby zdravotně bezpečných
siláží z bílkovinných pícnin v nepříznivých
povětrnostních podmínkách**

Autorský kolektiv:

doc. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D., Ing. Daniela Knotová, Ph.D.,
Ing. František Mikyska, Ing. Jan Pelikán, CSc.,
prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D., doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D.,
Ing. Klára Konečná, Ing. Marie Balabánová, Ph.D.,
Ing. Lucie Hodulíková, doc. Ing. Pavel Horký, Ph.D.,
Ing. Veronika Mlejnková, Ph.D.

Troubsko
2017

Metodika byla schválena Ústředním kontrolním
a zkušebním ústavem zemědělským v Brně,
Osvědčení UKZUZ 011244/2017

Vydavatel:

© Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko

© Mendelova univerzita v Brně

© AgroKonzulta Žamberk spol. s r. o.

1. vydání

ISBN 978-80-88000-19-8

Obsah

Anotace	5
Annotation	7
1 Úvod	9
2 Cíl metodiky	10
3 Vlastní popis metodiky	11
3.1 Bílkovinné píce	11
3.1.1 Vojtěška setá (<i>Medicago sativa</i> L.)	11
3.1.2 Jetel luční (<i>Trifolium pratense</i> L.)	12
3.1.3 Pramedi (<i>Trifolium pratense</i> L. x <i>Trifolium medium</i> L.)	13
3.2 Biogenní aminy	13
3.3 Mykotoxiny	15
3.4 Silážní aditiva	17
3.5 Výroba siláží pro analýzy	17
3.5.1 Výroba pokusných mikrosiláží	17
3.5.2 Výroba siláží v provozních podmínkách	18
3.6 Chemické analýzy	18
3.6.1 Analýza biogenních aminů	18
3.6.2 Analýzy mykotoxinů	23
3.7 Biogenní aminy v pokusných mikrosilážích	25
3.7.1 Biogenní aminy v silážích jetelovin	25
3.7.2 Biogenní aminy u vojtěšky seté	30
3.8 Mykotoxiny v pokusných mikrosilážích	33
3.9 Biogenní aminy v silážích z provozních podmínek	35
3.10 Doporučení pro praxi	42
4 Srovnání novosti postupů	44
5 Popis uplatnění certifikované metodiky	45
6 Ekonomické aspekty	46
7 Seznam použité literatury	47
8 Seznam publikací předcházejících metodice	50
9 Dedikace a jména oponentů	51



Anotace

Siláže patří k základním objemným krmivům využívaným ve výživě skotu. Úspěch silážního procesu je dán obsahem cukrů a pufrační kapacitou konzervované biomasy. Vyšší obsah dusíkatých látek a nižší obsah cukrů významně snižuje silážovatelnost. Silážovatelnost je možné ovlivnit zvýšením obsahu sušiny. Vyšší sušina je nezbytná zvláště u bílkovinných píceň. Špatné povětrnostní podmínky v době sklizně spojené s vyšším srážkami a vzdušnou vlhkostí mohou bránit zavadání na potřebný obsah sušiny. Nedostatečné zavadání může vést nejenom ke zhoršení kvality siláží, ale také ke snížení zdravotní bezpečnosti píče.

Cílem předložené metodiky je porovnat obsah biogenních aminů a mykotoxinů v silážích vojtěšky seté, jetele lučního a hybridu Pramedi konzervovaných při nízké sušině a ošetřených biologickým a chemickým aditivem a doporučit vhodné postupy konzervace bílkovinných píceň s nízkou sušinou s cílem zachovat zdravotní bezpečnost krmiv.

Hodnocen byl celkový obsah biogenních aminů (BA), histaminu (Him), tyraminu (Tym), putrescinu (Put), kadaverinu (Cad), spermidinu (Spd) a sperminu (Spm). Použitím biologických aditiv s obsahem *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* a *Enterococcus faecium* se snížil obsah hodnocených biogenních aminů v silážích jetele lučního ze stanoviště Vatín. Výrazně nižší produkce biogenních aminů v silážích hodnocených jetelovin (jetel luční, vojtěška setá, hybrid Pramedi) ze stanoviště Troubsko i Vatín byla patrná při použití chemického aditiva tvořeného 43 % kyseliny mravenčí, 30 % mravenčanu amonného, 10 % kyseliny propionové a 2 % kyseliny benzoové.

Mykotoxiny deoxynivalenol (DEO) a zearalenon (ZEA) byly zachyceny v zelené hmotě a silážích. Přestože byly vyrobené siláže prosté vláknitých hub, tak zde zůstal zachovaný obsah deoxynivalenolu a zearalenonu.

Zdravotní bezpečnost siláží je možné v první řadě zajistit dodržením všech technologických zásad při jejich výrobě. Nezbytné je zejména dosáhnout optimální sušiny siláže. Při silážování bílkovinných krmiv s nízkým obsahem



sušiny je třeba využít silážní aditiva. V biomase může docházet k hlubokému rozkladu bílkovin a následné tvorbě biogenních aminů. Biogenní aminy se tvoří v případě, že nedojde k okyselení silážované hmoty během 10 dnů. Tento proces je možné ovlivnit rychlým okyselením silážované biomasy prostřednictvím organických kyselin.



Annotation

Silage is one of the fundamental roughages used in cattle nutrition. The success of the ensiling process is given by the contents of sugars and buffering capacity of the biomass. Higher protein content and lower sugar content significantly reduces ensilability. Ensilability can be influenced by increasing of dry matter content. Higher dry matter content is needed especially for protein forage. Bad weather conditions at harvest time (higher rainfall and atmospheric humidity) may prevent wilting to necessary dry matter content. Low dry matter content can lead to a deterioration of silage quality and to reduce forage safety.

The aim of this methodology is to compare the content of biogenic amines and mycotoxins in silages of alfalfa, red clover and hybrid Pramedi preserved at low dry matter content and treated with biological and chemical additive and recommend appropriate procedures of legumes ensiling with a low dry matter content in order to preserve forage safety.

It evaluated the total content of biogenic amines (BA), histamine (Him), tyramine (team), putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd) and spermine (SPM). Using a biological additive containing *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* has been reduced content of biogenic amines in red clover silage from Vatin station. Significantly lower production of biogenic amines in silages evaluated legumes (red clover, alfalfa, hybrid Pramedi) from station Troubsko and Vatin was evident with the use of a chemical additive consisting of 43% formic acid, 30% ammonium formate, 10% propionic acid and 2% benzoic acid.

Mycotoxins deoxynivalenol (DEO) and zearalenone (ZEA) were captured in green matter and silage. Silage did not contain filamentous fungi, but was present deoxynivalenol and zearalenone.

Silage safety can be primarily achieved by compliance all the technological principles during their preparation. It is necessary to keep the optimum dry matter. Silage additives should be used at ensiling of legumes with low dry



matter content. During ensiling can be a deep degradation of protein and the subsequent formation of biogenic amines. Biogenic amines are formed when the ensiled biomass is not acidified during 10 days. This process can be influenced by rapid acidification of the silage biomass through organic acids.



1 Úvod

Siláže patří k základním objemným krmivům využívaným ve výživě skotu. Kukuřičné siláže jsou významným zdrojem energie. Zdrojem dusíkatých látek mohou být siláže vyrobené z vojtěšky seté nebo jetele lučního. Vyšší obsah dusíkatých látek a nižší obsah cukrů významně snižuje silážovatelnost, zejména vojtěšky seté. Úspěch konzervačního procesu závisí na obsahu sušiny. Vyšší obsah sušiny je naprosto nezbytný při silážování vojtěšky seté. Špatné povětrnostní podmínky v době sklizně, spojené s vyšším srážkami a vzdušnou vlhkostí, mohou bránit zavadání na potřebný obsah sušiny. Nedostatečné zavadání může vést nejenom ke zhoršení kvality siláží, ale také ke snížení zdravotní bezpečnosti píce. Zdravotní riziko mohou představovat mykotoxiny produkované vláknitými houbami a biogenní aminy, které vznikají v důsledku hlubokého rozkladu bílkovin.



2 Cíl metodiky

Cílem předložené metodiky je (I) popsat metody analýzy biogenních aminů uplatněné v různých laboratořích České republiky, (II) porovnat obsah biogenních aminů a mykotoxinů v silážích vojtěšky seté, jetele lučního a hybridu Pramedi konzervovaných při nízké sušině a ošetřených biologickým a chemickým aditivem, (III) porovnat obsah biogenních aminů v zelené pícei, zavadlé pícei a silážích vojtěšky seté konzervovaných při různé sušině, kontaminovaných zeminou a ošetřených biologickým a chemickým aditivem, (IV) porovnat obsah biogenních aminů v silážích z bílkovinných pícein vyrobených v provozních podmínkách a (V) doporučit vhodné postupy konzervace bílkovinných pícein s nízkou sušinou s cílem zachovat zdravotní bezpečnost krmiv.



3 Vlastní popis metodiky

3.1 Bílkovinné píce

3.1.1 Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.)

Vojtěška setá se vyznačuje vysokým obsahem bílkovin. Vedle velkého množství vitamínů obsahuje také minerální látky, zejména vápník, fosfor, draslík a hořčík. Výživná hodnota vojtěšky je ovlivňována řadou faktorů, jako je pořadí seče, vegetační fáze, teplota a také množství dešťových srážek v průběhu vegetace. Vyšší teploty v průběhu vegetace ovlivňují obsah NDF v buněčných stěnách a tím snižují stravitelnost organické hmoty (Míka et al., 1997). Vyšší teploty v průběhu vegetace způsobují větší prodýchání asimilátů a tím snížení obsahu vodorozpustných sacharidů (Hakl et al., 2005). V případě vodního deficitu dochází ke snížení výnosů a snížením kvality, která je způsobena lignifikací pletiv (Míka et al., 1997).

Sklizeň porostů je třeba provádět ve fázi butonizace (nasazení květních poupat), (Doležal et al., 2006), nejpозději na počátku kvetení. Později se výrazně zvyšuje obsah vlákniny, snižuje se obsah energie a hrubého proteinu. Kvalita píce vojtěšky je dána podílem listů a lodyh. Podíl listů v rané fázi první seče bývá 42 až 48 % (Šimko in Doležal a Skládanka, 2008). V listech je obsaženo 18 – 28 % NDF, 12 – 20 % ADF a přes 30 % hrubého proteinu. Naproti tomu ve stoncích je 35 – 70 % NDF, 30 – 55 % ADF a jen 10 – 20 % hrubého proteinu. Stravitelnost organických živin je ovlivněna nejen obsahem vlákniny (podílem ligninu a obsahem celulózy), ale také stupněm olistění rostliny, dále obsahem sekundárních metabolitů, zejména fenolových látek (Kalač a Míka, 1997). Právě ve fázi butonizace je stejný podíl listů a lodyh. Toto je optimální termín pro sklizeň vojtěšky nejenom z hlediska její produkce, ale také kvality. Obsah hrubého proteinu v tomto období přesahuje 24 %. Fáze butonizace je relativně krátká a trvá 5 až 7 dní. Případná sklizeň v ranější vývojové fázi než je butonizace může způsobit technologické problémy při konzervaci, kdy se zvyšuje riziko hlubokého rozkladu bílkovin a návazně tvorby biogenních aminů.



Píce vojtěšky seté se využívá pro výrobu sena a siláží. Vojtěškové siláže patří mezi bílkovinná krmiva a ve výživě skotu představují jeden z hlavních zdrojů bílkovinných krmiv. Zároveň je to velmi obtížně silážovatelná plodina. V této souvislosti je problémem vysoký obsah hrubého proteinu, nízká pufrací kapacita a nízký obsah vodorozpustných sacharidů. Vojtěška se silážuje po předcházejícím zavadání. Při sušině méně než 20 % je vojtěška velmi obtížně silážovatelná, naopak její silážovatelnost se výrazně zlepšuje při zavadnutí na sušinu více než 40 %. Zvýšení obsahu sušiny vede k lepšímu fermentačnímu procesu, zvyšuje se příjem sušiny a tím užitkovost zvířat. Rozhodující vliv na kvalitu siláže má také pořadí seče. Ve druhé a další seči je příznivější poměr mezi obsahem hrubého proteinu a vodorozpustnými cukry. Rostlina se stává lépe silážovatelnou. Vojtěšková siláž bývá většinou zkrmována v dávce 2-3 kg/100 kg živé hmotnosti.

3.1.2 Jetel luční (*Trifolium pratense* L.)

Jetel luční byl v minulosti využíván ke zkrmování v čerstvém stavu, neboť jeho píce ve srovnání s travami nebo vojtěškou jen pomalu lignifikuje. Pomalejší stárnutí píce jetele je dáno zejména vysokou stravitelností stonků ve srovnání s vojtěškou a štirovníkem růžkatým (Buxton et al., 1985). V době sklizně představují větší nebezpečí nepříznivé povětrnostní podmínky. Nepříznivé počasí je spojeno s odkladem sklizně a stárnutím porostu, případně silážováním nedostatečně zavadlé píce.

Sklizeň začíná ve fázi květních pupat, ale i při plném kvetení si zachovává dobrou kvalitu. Oproti vojtěšce má píce jetele vyšší obsah rozpustných cukrů a nižší obsah hrubého proteinu a proto je snadněji silážovatelná. Tetraploidní odrůdy oproti diploidním obsahují vyšší obsah vody v píci o 1,3 až 2,4 % (Hejduk a Knot, 2010) a proto pomaleji zavadají pro následné silážování.

Píce jetele lučního se využívá na výrobu sena a siláží. Podobně jako vojtěška setá patří jetel luční mezi bílkovinná krmiva. Vysoký obsah hrubého proteinu zhoršuje silážovatelnost. Pro úspěšnou konzervaci se nechává zavadnout na



sušinu 35 – 45 %. Podobně jako u vojtěšky seté vede zvýšení obsahu sušiny k lepšímu fermentačnímu procesu, zvyšuje se příjem sušiny a následně užítkovost zvířat. Nižší příjem sušiny silážovaných jetelovin je často způsoben vznikem nežádoucích kvasných kyselin (kyselina máselná), rozkladem bílkovin a výskytem biogenních aminů (Vyskočil et al., 2008). Dávka jetelových siláží se u skotu pohybuje od 2 – 3 kg/100 kg živé hmotnosti.

3.1.3 Pramedi (*Trifolium pratense* L. x *Trifolium medium* L.)

Je mezidruhový hybrid jetele lučního (*Trifolium pratense* L.) cv. Tatra ($2n=4x=28$) a jetele prostředního (*Trifolium medium* L.), ($2n=8x=64$). Jedná se o víceletou jetelovinu, která může být vhodnou náhradou za jetel luční. Výška, doba kvetení a kvalita je srovnatelná s tetraploidními odrůdami jetele lučního. Pramedi se může rozmnožovat vegetativně prostřednictvím krátkých podzemních výběžků a ve srovnání s jetelem lučním je vytrvalejší (Pelikán et al., 2016). Při zkouškách byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi odrůdou Pramedi a oběma rodiči. Pramedi vykazuje statisticky průkazně vyšší počet lodyh na rostlinu. Hybrid lze využívat jako pícninu na orné půdě v čisté kultuře nebo ve směsích, ke zkrmování je vhodný jak v čerstvém stavu tak jako siláž.

3.2 Biogenní aminy

Biogenní aminy patří mezi přirozené škodlivé látky k krmivech. Společně s těkavými mastnými kyselinami mohou snižovat chutnost siláží. Rovněž byl prokázán jejich nepříznivý vliv na zdravotní stav přežvýkavců (Tveit et al., 1992, Steidlová a Kalač, 2002).

Základem pro tvorbu biogenních aminů je proteolýza, která probíhá přirozeně během silážování. Jedná se o dekarboxylaci aminokyselin působením rostlinných proteáz a peptidáz a enzymů bakterií (Scherer et al., 2015). Hluboký rozklad bílkovin mohou způsobit mikroorganismy rodu *Clostridia*, *Bacillus*, *Klebsiella*,



Escherichia, *Lactobacillus* nebo *Pediococcus*. Výsledkem tohoto rozkladu je tvorba biogenních aminů (Santos, 1996). Obsah biogenních aminů v silážích závisí zejména na druhu plodiny a silážním procesu (Scherer et al., 2015). Riziko tvorby biogenních aminů je zvláště při silážování bílkovinných píceň, jako je vojtěška setá. Zvláště v případech, kdy není možné zajistit odpovídající sušinu a je silážována nedostatečně zavadlá biomasa (Steidlová a Kalač, 2002).

Mezi biogenní aminy patří kadaverin, spermidin, spermin, tyramin, fenyletylamin nebo tryptamin (Tab. 1). Za nejvýznamnější z biogenních aminů se považuje histamin, který vyvolává snížení krevního tlaku a zhoršuje cirkulaci krve v končetinách skotu. Putrescin byl označen za jeden z faktorů způsobujících ketózu (Tveit et al., 1992). Biogenní aminy způsobují odlupování sliznice bachoru a střev přežvýkavců. V důsledku expozice aminů je stěna střevní propustná pro nestrávené živiny a škodliviny z tráveniny, do trávicího ústrojí se tak dostává krev, která umožňuje rozvoj nežádoucích bakterií vyvolávajících chronické záněty. Detoxikace biogenních aminů v organismu zatěžuje ledviny a játra (Krynski, 1988, Křížek, 1993, Steidlová a Kalač, 2002).

Tab. 1 Aminokyseliny v silážích a související biogenní aminy (Santos, 1996)

Aminokyselina	Související biogenní amin	Klasifikace
Alifatické		
Lysin	Kadaverin	Diamin/polyamin
Arginin	Putrescin	Diamin/Polyamin
	Spermidin	Polyamin
	Spermin	Polyamin
Aromatické		
Tyrosin	Tyramin	Monoamin
Fenylalanin	Fenyletylamin	Monoamin
Heterocyklické		
Tryptofan	Tryptamin	Monoamin
Histidin	Histamin	Monoamin



3.3 Mykotoxiny

Výroba objemných krmiv je spojena s rizikem výskytu mykotoxinů, které navíc mohou přecházet do potravního řetězce (Skládanka et al., 2011). Mykotoxiny jsou nebezpečné metabolity, které jsou často karcinogenní a jejich výskyt vážně ohrožuje zdraví zvířat a lidí (Reverberi et al., 2010). Mykotoxiny jsou produkovány vláknitými houbami a mohou být příčinou chronických nebo akutních onemocnění (Tab. 2). Často dochází k produkci několika rozdílných mykotoxinů stejným druhem hub. Mykotoxiny kontaminují krmiva ještě před sklizní nebo během skladování. V našich klimatických podmínkách se v objemných krmivech nejvíce vyskytuje deoxynivalenol (DON) a zearalenon (ZEA), (Vašátková et al., 2010). Tyto mykotoxiny jsou produkovány houbou *Fusarium graminearum* a dalšími druhy rodu *Fusarium*. K produkci ZEA dochází za maximální teploty 25 °C. Zatímco produkce DON je závislá na rostoucí teplotě pohybující se nad 25 °C. V polních podmínkách může souběžně nastat syntéza mykotoxinů ZEA a DON. Deoxynivalenol způsobuje zažívací problémy, špatnou koordinaci pohybu, aborty. Krmiva kontaminovaná deoxynivalenolem mohou zvířata odmítat. Zearalenon je estrogenní mykotoxin, který způsobuje reprodukční problémy. Nápadnými příznaky je výrazné zduření vulvy a mléčné žlázy. Zearalenon zabraňuje vývoji folikulů a způsobuje příznaky přetrvávající říje nebo nymfomanie, podporuje tvorbu a perzistenci funkčního progesteronu produkujícího žlutá tělíska, což způsobuje anestrus a pseudograviditu.



Tab. 2 Vlákňité houby produkující mykotoxiny a jejich vliv na zvířata

Rod vláknitých hub	Mykotoxiny	Kontaminované produkty	Vliv na zvířata
Aspergillus	Aflatoxiny	Jadrná krmiva	Karcinogenní a mutagenní účinek. Pokles příjmu krmiva, snížení produkce mléka a přírůstků, poruchy plodnosti. Aflatoxiny mohou přecházet do mléka v poměru 65:1.
	Ochratoxin A	Jadrná krmiva, siláže	Rozkládá se v dobře fungujícím batoru, problémy při acidózách. Poškození ledvin, zvýšený příjem vody, vyšší náchylnost k onemocnění.
Fusarium	Fumonisy	Jadrná krmiva	Špatně se rozkládají v batoru, poškozuji játra a ledviny.
	T-2 toxin	Zelená píce, siláže	Částečně se rozkládají v batoru, problémy při acidózách. Pokles příjmu krmiva, produkce mléka a přírůstků. Trávicí problémy, poruchy plodnosti,
	Deoxynivalenol	Jadrná krmiva, zelená píce, siláže	Využíván jako indikátor kontaminace píce mykotoxiny. Rozkládá se v batoru, problémy mohou být u krav s acidózou. Snížení příjmu sušiny, poruchy trávení, snížení přírůstků a produkce mléka.
	Zearalenon	Jadrná krmiva, zelená píce, siláže	Estrogenní aktivita, poruchy reprodukce, nepravidelný říjový cyklus, výskyt folikulárních cyst, aborty
Penicillium	Roquefortin C	Siláže	Neurotoxický, narušuje činnost batoru.
	Patulin	Ovoce, siláže	Neurotoxický, narušuje činnost batoru.



3.4 Silážní aditiva

Biologická silážní aditiva stimulují na začátku fermentačního procesu mléčné kvašení. Složena jsou z různých druhů mléčných bakterií. Mléčné bakterie přispívají k rychlému okyselení silážované hmoty. Doporučené minimální koncentrace jsou 100 000 zárodků na 1 gram silážované hmoty (Doležal et al., 2012). Využívány jsou nejenom homofermentativní (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*), ale také heterofermentativní (*L. buchneri*, *L. brevis*, *L. delbrückii*, *Propionibacterium freundreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*) bakterie mléčného kvašení. Bakterie heterofermentativního kvašení produkují nejenom kyselinu mléčnou, ale také kyselinu octovou a propionovou. Tyto kyseliny se podílejí na potlačení sekundární fermentace a mohou zastavovat růst plísní. Většinou se používá kombinace homofermentativních a heterofermentativních bakterií. Biologická aditiva se využívají při silážování zavadlé biomasy.

Chemická aditiva rychle snižují hodnotu pH a inhibují nežádoucí skupiny mikroorganismů, tím zamezují hlubokému rozkladu proteinů a mohou snížit riziko výskytu biogenních aminů. Chemická aditiva se využívají pro silážování biomasy s vyšší vlhkostí a nižším obsahem vodorozpustných cukrů. Mezi chemické konzervační prostředky patří organické kyseliny, popř. jejich soli, louh sodný pro konzervaci vlhkého zrna, amoniak nebo močovina.

3.5 Výroba siláží pro analýzy

3.5.1 Výroba pokusných mikrosiláží

Pokusné mikrosiláže byly vyrobeny v kontejnerech o průměru 150 mm a výšce 100 cm. Silážovaná byla biomasa vojtěšky seté, jetele lučního



a hybridu Pramedi z pokusných parcel založených ve Výzkumném ústavu pícninářském v Troubsku a ve Výzkumné stanici MENDELU ve Vatíně. Porosty byly sklizeny ve fázi butonizace (nasazení květních poupat). Sklizená biomasa byla nařezána na velikost částic 3 cm. Pro plnění každého kontejneru bylo odváženo 8 kg hmoty. Každá odrůda byla silážována neošetřená (A), ošetřená biologickým aditivem (B) a chemickým aditivem (C). Jako biologické aditivum byly využity bakterie mléčného kvašení *Lactococcus lactis* (NCIMB 30117), *Lactobacillus plantarum* (DSM 16568), *Enterococcus faecium* (DSM 22502/NCIMB 11181) a enzym xylanáza EC 3.2.1.8 a jako chemické aditivum bylo využito 43 % kyseliny mravenčí, 30 % mravenčanu amonného, 10 % kyseliny propionové a 2 % kyseliny benzoové.

Silážní kontejnery byly uchovány při teplotě 28 °C, v místnosti bez přístupu světla. Otevřeny byly po 90 dnech, kdy byly odebrány vzorky pro chemické analýzy.

3.5.2 Výroba siláží v provozních podmínkách

Pokusné siláže byly odebrány ze třech podniků v okolí Orlickoústecka, které hospodaří v řepařské a bramborářské výrobní oblasti. Nadmořská výška se pohybuje v rozmezí od 250 do 400 metrů nad mořem.

3.6 Chemické analýzy

3.6.1 Analýza biogenních aminů

Metoda na MENDELU

Příprava vzorku na stanovení biogenních aminů

Pro přípravu vzorku bylo naváženo 300 mg, ke kterému bylo následně přidáno 2 ml H₂O ACS. Vzorek byl následně podroben inkubací při 25 °C, po dobu 60



minut, při 300 rpm. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 4 °C, 25 000g po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který následně byl centrifugován při 4°C, 25 000g po dobu 10 minut. Takto připravený vzorek byl podroben analýze na AAA 400.

Stanovení biogenních aminů

Pro analýzu aminokyselin byl použit kapalinový chromatograf AAA 400 (Ingos, Česká republika). Systém se skládá z náplňové skleněné chromatografické kolony, dvou chromatografických pump pro dopravu elučních pufrů a derivatizačního činidla, chlazeného karuselu pro 25 zkumavek o objemu 1,5 - 2 ml, dávkovacího ventilu, tepelného reaktoru, VIS detektoru a chlazeného zásobníku pro derivatizační činidlo. Skleněná chromatografická kolona s vnitřním průměrem 0.37 cm a délkou 5.5 cm byla naplněna silným katexovým ionexem v sodíkovém cyklu LG ANB (laboratoř při Spolku pro chemickou a hutní výrobu) s průměrnou velikostí částic 12 μm a sítěním 8 %. Skleněná kolona byla temperována termostatem na teplotu 60 °C. Chromatografické pumpy pro dopravu elučních pufrů a derivatizačního činidla mohou pracovat při průtoku 0,01-10 ml/min při nejvyšším tlaku 40 MPa. Objem nástřikové smyčky byl 100 při přesnosti nástřiku RSD 1 %. Dvoukanálový VIS detektor s objemem průtočné kvyety 5 μl pracoval při vlnových délkách 440 a 570 nm. Jako derivatizační činidlo byl použit roztok ninhydrinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ninhydrin byl rozpuštěn v 75 % v/v organickém rozpouštědla methylcellosolve (Ingos, Česká republika) a v 25 % v/v 4M acetátovém pufru (pH 5,5). K redukci byl použit SnCl_2 (Lachema, Česká republika) Derivatizační činidlo bylo po celou dobu uchováno pod inertní atmosférou N_2 a chlazeno. Eluce aminokyselin probíhala podle programu skokovým gradientem elučních pufrů o různé iontové síle a pH, a také gradientem teploty. Při analýze byl průtok mobilní fáze nastaven na 0,3 ml.min⁻¹ a tlak se pohyboval v rozmezí 4,5-6 MPa. Teplota na reaktoru byla nastavena na 120 °C.



Metoda implementovaná na Univerzitě Hradec Králové

Chemikálie

Standardy biogenních aminů histaminu, spermidinu, sperminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu a vnitřního standardu 1,7-diaminoheptanu, derivatizačních činidel o-ftaldialdehydu a N-acetylcysteinu byly dodány v čistotě 98% a vyšší firmou Sigma-Aldrich, s.r.o. Acetonitril (gradient grade) a kyselina chlorovodíková 37%, p.a.+ byla dodána firmou Chromservis, s.r.o. Kyselina boritá, hydroxid sodný a chlorid draselný byly čistoty p.a. a dodány firmou Merci. K přípravě roztoků byla použita ultračistá voda MilliQ (Merck).

Směsný zásobní roztok standardů biogenních aminů byl připraven navážením 100 mg jednotlivých aminů, který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky (100 ml) a rozpuštěn v 0,1M HCl. Roztok vnitřního standardu byl připraven o koncentraci 1 mg/ml. Pro usnadnění rozpuštění, byla použita ultrazvuková lázeň.

Instrumentace

Kapalinový chromatograf Agilent složený z kvarterní pumpy série 1260 (G1311B), automatického dávkovače vzorků série 1260 (G1329B), termostatu automatického dávkovače série 1290 (G1330B), termostatu kolony série 1260 (G1316A), detektoru UV/VIS oblasti série 1260 (G4212B), fluorescenčního detektoru série 1260 (G1321B). Řízení HPLC a zpracování výsledků probíhalo pomocí programu OpenLab CDS, v. C.01.01. Vyrobeno firmou Agilent Technologies. K pipetování byly použity pipety Eppendorf Research Plus. Analytické váhy KEEN ABS 120-4 (Kern and Sohn).

Extrakce biogenních aminů

K extrakci vybraných biogenních aminů (BA) byla využita metodika dle (Steidlová & Kalač, 2002) s drobnými modifikacemi. Pro stanovení BA byl připraven kyselý extrakt. Bylo naváženo přesně asi 20 g zmrazeného vzorku siláže, přidáno 200 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové a 1 ml roztoku 1,7-diaminoheptanu o koncentraci 1,04 mg/ml, který sloužil jako vnitřní standard. Směs byla homogenizována v mixeru po dobu 5 minut. Homogenizát byl zfiltrován přes papírový filtr



a následně přes nylonový stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,22 μm .

Filtrované extrakty byly uchovávány v mrazničce při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před měřením byly extrakty rozmrazeny a zředěny 10x 0,1M HCl.

Derivatizace

K derivatizaci byla použita vyvinuta metodika kombinující o-ftaldialdehyd (OPA) a N-acetylcystein (NAC). Množství 2,5 μl borátového pufru (0,2M kyselina boritá v 0,2M KCl: 0,2M NaOH (1:1), pH = 9,3) bylo přidáno k 1 μl kyselého extraktu ze vzorku siláže a 5x promícháno. Poté bylo přidáno 0,5 μl derivatizačního činidla (0,25 g OPA/50 ml metanolu; 1,52 g NAC/5 ml; OPA:NAC:borátový pufr 0,5: 0,045: 0,705) a vzniklý roztok 10x promíchán, zředěn 32 μl borátového pufru a 8x promíchán. K analýze byl dávkován 1 μl derivatizovaného vzorku.

Chromatografické podmínky

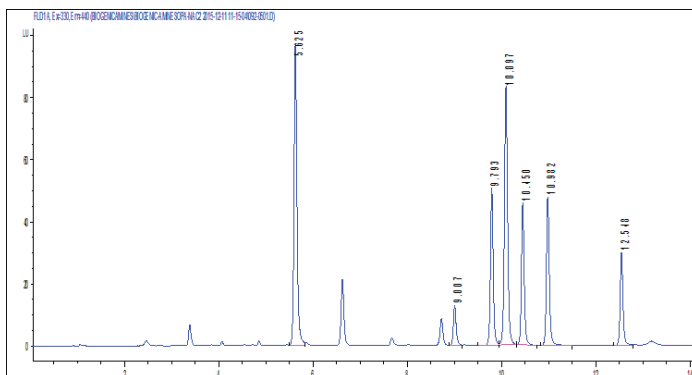
Separace probíhala na koloně Kinetex C8 o velikosti částí 2,6 μm , průměru 3 mm a délce 75 mm s předkolonovým držákem SecurityGuard a předklonkou C8 4 x 3 mm (vše výrobce Phenomenex, dodavatel Chromservis, s.r.o.).

K separaci byla použita gradientová eluce. Roztok A měl složení 0,1M octan sodný, jehož pH bylo upraveno koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu 5,8. Rozpouštědlo B byl acetonitril. Průtok mobilní fáze byl 0,49 ml/min. Eluce začala při složení mobilní fáze 95 % A s lineárním gradientem do 87,2 % A v čase 1,5 min a 60 % A v čase 15 min. Poté následovala kondicionace kolony s mobilní fází s 95% A. Chromatografická kolona byla termostatovaná na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. K fluorescenční detekci byla použita excitační vlnová délka 330 nm a emisní vlnová délka 440 nm.

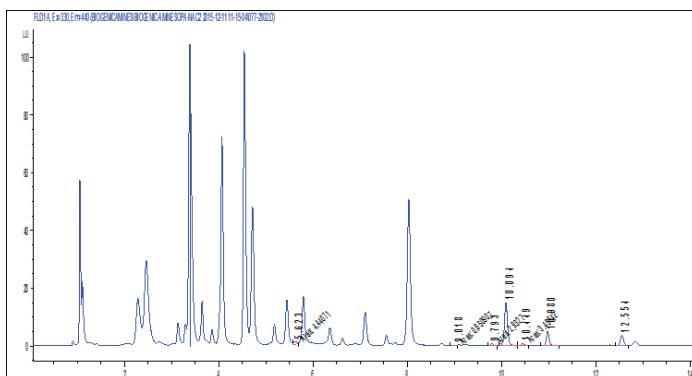
Chromatogram standardu BA o koncentracích 0,01 mg/ml je na obrázku 1a; vzorek č. 17 na obrázku 1b; vzorek č. 17 s přidáním množstvím 10 mg BA/20 g vzorku na obrázku 1c.

Zpracování výsledků

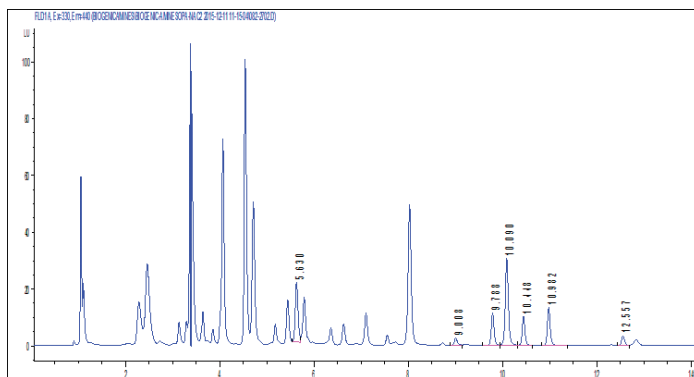
Výtěžnost metody byla stanovena metodou standardního přídatku. Ke kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu.



Obr. 1 Chromatogram čistého standardu. Časem označené píky odpovídají postupně histaminu, spermidinu, sperminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu a 1,7-diaminoheptanu.



Obr. 2 Chromatogram vzorku 17. Časem označené píky odpovídají postupně histaminu, spermidinu, sperminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu a 1,7-diaminoheptanu.



Obr. 3 Chromatogram vzorku 17 s přidaným množstvím 10 mg BA. Časem označené píky odpovídají postupně histaminu, spermidinu, sperminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu a 1,7-diaminoheptanu

3.6.2 Analýzy mykotoxinů

Analýzy mykotoxinů byly provedeny ELISA testem. ELISA test je kompetitivní přímý enzymatický test pro kvantitativní analýzu deoxynivalenolu (DON), zearalenonu (ZEA), fumonisinu (FUM) a aflatoxinu (AFL) v různých komoditách, včetně krmiv. Hodnoty jsou uvedeny v jednotkách ppm (parts per milion), což představuje 1 miliontinu z celku (mg/kg), nebo ppb (parts per billion), což představuje 1 miliardtinu celku (µg/kg).

Princip ELISA testu

V kompetitivním ELISA testu analyzovaný mykotoxin obsažený v testovaném vzorku a konjugovaném antigenu soutěží o vazebná místa protilátky, na antigenu je navázaný enzym, který štěpí chromogen za vzniku barevné reakce. Čím víc mykotoxinu vzorek obsahuje, tím více vazebných míst je obsazeno. Naváže se méně konjugovaného antigenu a výsledná barevná reakce je slabší, přičemž konkrétní barva je závislá na typu použité soupravy. Intenzita zbarvení je měřena při odpovídajících vlnových délkách, výsledné koncentrace analytů jsou vypočteny na základě srovnání s absorbancí standardních roztoků.



Příprava vzorků na stanovení mykotoxinů

Vzorky musí být před samotnou analýzou řádně homogenizovány. Z celkového vzorku bylo po homogenizaci odebráno cca 250 g hmoty. Tato část vzorku byla dále zpracována dle metodiky (stříhání, mletí) a z ní byla po zpracování odebrána navážka (5-10 g dle metodiky) pro přípravu vzorku k analýze. Takto upravené vzorky se následně extrahovaly buď destilovanou vodou, nebo 70 % methanolem (70:30), záleží na tom, jaký mykotoxin se zrovna stanovuje. Pro detekci DON jsou vzorky extrahovány destilovanou vodou. Pro zjištění přítomnosti T2, ZEA a AFL se používá extrakční činidlo nebo 70 % methanol. Množství vody nebo methanolu se určuje podle stanovení. Po filtraci je teprve vzorek připraven na analýzu. Aby stanovení proběhlo správně, musí se dbát na pH vzorků, které by mělo být v rozmezí 6 – 8.

Postup při ELISA testu

Elisa se provádí pomocí automatických kalibrovaných pipet, kterými se mykotoxiny, standardy a činidla přenáší na stripy. Nejprve se používají červené stripy (označené), do kterých podle počtu vzorků dáme 100 µl konjugátu Solution. Dále následují standardy, ty si seřadíme podle koncentrace a pipetujeme opět 100 µl do jamek, vždy do každé jeden. První jamka se vynechává. Od každého vzorku odpipetujeme 100 µl do jamek následujících po standardech. Poté jednotlivé jamky pomocí pipety promícháme a přeneseme do nových neoznačených stripů. Neoznačené stripy necháme inkubovat 5 – 10 minut podle toxinu, který zrovna stanovujeme. Dále obsah vylijeme a 5x promyjeme destilovanou vodou. Po inkubaci použijeme 100 µl substrátu Solution a necháme opět 5 – 10 minut inkubovat. Na závěr použijeme stop-činidlo Red stop Solution, kterým reakci ukončíme. Stripy na destičce vložíme do readeru EL 808, který nám analýzu vyhodnotí.

Výhodnocení ELISA testu

Po provedení ELISA testu byla změřena intenzita výsledného zbarvení při výrobcem doporučené vlnové délce – Neogen 650 nm (modrá až červenofialová). Z absorbance standardních roztoků byla vytvořena kalibrační křivka, ze které



byly následně odečteny hodnoty ostatních analyzovaných vzorků. Pro relevanci výsledků je důležitý také korelační koeficient kalibrační křivky, který udává pravděpodobnost správnosti výsledku. Pro vyhodnocení absorbance byla použita čtečka Biotek EL 808 UI se softwarem KC junior.

3.7 Biogenní aminy v pokusných mikrosilážích

3.7.1 Biogenní aminy v silážích jetelovin

Experiment s víceletými druhy jetelovin byl založen ve Výzkumné pícninářské stanici Ústavu výživy zvířat a pícninářství AF MENDELU na pokusných pozemcích ve Vatině a ve Výzkumném ústavu pícninářském na pokusných pozemcích v Troubsku. Sklizeny byly porosty vojtěšky seté (Holyna a Tereza), jetele lučního 2n (Spurt), jetele lučního 4n (Amos) a hybridu Pramedi v prvním užitkovém roce. Předmětem hodnocení byla biomasa z první seče. Silážována byla hmota o sušině 20–24 %. Reprezentativní vzorky píce (6 kg) byly umístěny do umělohmotných mikrosilážních nádob a utuženy tlakem 600 kg/m³. Nádoby byly skladovány v místnosti bez přímého světla při teplotě 28 °C po dobu 90 dnů. Pro konzervaci vojtěšky seté a jetele lučního bylo použito biologické a chemické aditivum, pro konzervaci hybridu Pramedi pouze chemické aditivum. Použitá aditiva byla porovnána s neošetřenou kontrolní variantou. Biologické aditivum obsahovalo bakterie mléčného kvašení *Lactococcus lactis* (NCIMB 30117), *Lactobacillus plantarum* (DSM 16568), *Enterococcus faecium* (DSM 22502/ NCIMB 11181) a enzym xylanasu EC 3.2.1.8. Chemické aditivum bylo tvořeno ze 43 % kyselinou mravenčí, 30 % mravenčanem amonným, 10 % kyselinou propionovou a 2 % kyselinou benzoovou. Odběry siláží byly provedeny 90 dnů po začátku konzervace. Odebrané vzorky píce byly analyzovány v laboratořích Ústavu chemie a biochemie AF MENDELU v Brně. Hodnocen byl celkový obsah biogenních aminů (BA), histaminu (Him), tyraminu (Tym), putrescinu (Put), kadaverinu (Cad), spermidinu (Spd) a sperminu (Spm).



Celkový obsah biogenních aminů byl v silážích ze stanoviště Vatín (Tab. 3) od 291 do 2149 mg/kg. Nejvyšší obsah byl zjištěn v neošetřených silážích jetele lučního 2n (2149 mg/kg). Siláže jetele lučního 2n zde obsahovaly také vysoké množství histaminu (147 mg/kg), tyraminu (663 mg/kg), putrescinu (608 mg/kg) a kadaverinu (478 mg/kg). Van Os et al. (1996) potvrzuje skutečnost, že pokud nedojde k okyselení silážní hmoty v prvních 10 dnech fermentace, významně stoupá produkce biogenních aminů. Hodnota pH ovlivňuje aktivitu dekarboxyláz (Silla Santos, 1996) a zároveň inhibuje růst mikroorganismů (Bover-Cid et al., 2000). Použitím biologických aditiv s obsahem *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* a *Enterococcus faecium* se snížil obsah hodnocených biogenních aminů v silážích jetele lučního. Nishino et al. (2007) uvádí, že obsah biogenních aminů mohou snížit biologická aditiva s obsahem *Lactobacillus casei*. Výrazně nižší produkce biogenních aminů byla potom patrná při použití chemického aditiva. Celkový obsah biogenních aminů zde byl 419 mg/kg, obsah histaminu pouze 1 mg/kg, tyraminu 2 mg/kg a kadaverinu 0 mg/kg.



Tab. 3 Obsah biogenních aminů v silážích víceletých jetelovin ze stanoviště Vatín

Druh	Him mg/kg	Tym mg/kg	Put mg/kg	Cad mg/kg	Spd mg/kg	Spm mg/kg	BA mg/kg
Neošetřené							
Vojtěška setá Holyna	0	51	187	1	2	279	521
Vojtěška setá Tereza	15	44	130	1	1	262	453
Jetel luční 2n Spurt	147	663	608	478	1	253	2149
JL x JP Pramedi	10	4	309	0	0	288	612
Biologické aditivum							
Vojtěška setá Holyna	1	50	176	1	2	296	526
Vojtěška setá Tereza	50	711	485	164	0	218	1629
Jetel luční 2n Spurt	3	126	166	24	0	309	629
Chemický konzervant							
Vojtěška setá Holyna	1	51	182	1	2	267	503
Vojtěška setá Tereza	11	2	120	0	1	157	291
Jetel luční 2n Spurt	1	2	96	0	1	321	419
JL x JP Pramedi	1	5	348	1	0	307	663



Pozitivní vliv biologického aditiva nebyl patrný u siláží vojtěšky seté. Neošetřené siláže a siláže ošetřené biologickými aditivy měly srovnatelný obsah biogenních aminů. Naopak použití chemických aditiv vedlo podobně jako u jetele lučního k redukci obsahu hodnocených biogenních aminů.

Obsah biogenních aminů u hybridu Pramedi byl srovnatelný s vojtěškou setou. Na rozdíl od vojtěšky seté nebyl obsah biogenních aminů ovlivněn použitím chemického aditiva, vyjma obsahu histaminu, jehož obsah byl po použití chemického aditiva pouze 1 mg/kg sušiny.

Celkový obsah biogenních aminů v silážích ze stanoviště Troubsko (Tab. 4) byl od 257 do 1595 mg/kg. Na rozdíl od stanoviště Vatín zde byla hodnocena tetraploidní odrůda jetele lučního. Siláže vojtěšky seté měly vyšší obsah biogenních aminů (1224 a 1595 mg/kg), zejména tyraminu (522 a 1067 mg/kg), putrescinu (464 a 151 mg/kg) a kadaverinu (67 a 196 mg/kg). Obsah histaminu byl u siláží ze stanoviště Troubsko od 3 do 6 mg/kg sušiny.



Tab. 4 Obsah biogenních aminů v silážích víceletých jetelovin z roku 2014, stanoviště Troubsko

Druh	Him mg/kg	Tym mg/kg	Put mg/kg	Cad mg/kg	Spd mg/kg	Spm mg/kg	BA mg/kg
Neošetřené							
Vojtěška setá Holyna	4	522	464	67	3	164	1224
Vojtěška setá Tereza	6	1067	151	196	1	174	1595
Jetel luční 4n Amos	3	145	129	66	5	169	517
JL x JP Pramedi	4	103	117	52	8	219	503
Biologické aditivum							
Vojtěška setá Holyna	4	709	247	60	3	166	1189
Vojtěška setá Tereza	8	867	274	68	8	179	1404
Jetel luční 4n Amos	9	59	348	65	5	187	672
Chemický konzervant							
Vojtěška setá Holyna	17	18	190	0	3	145	373
Vojtěška setá Tereza	9	68	106	0	0	239	423
Jetel luční 4n Amos	21	4	0	0	2	229	257
JL x JP Pramedi	0	339	327	292	0	289	1248



Biologické aditivum neovlivnilo obsah biogenních aminů u vojtěškových siláží, ani u siláží z jetele lučního. Patrný byl vliv chemického aditiva. Použitím chemického aditiva se u siláží vojtěšky seté a jetele lučního snížil nejenom celkový obsah biogenních aminů, ale také obsah tyraminu, putrescinu a kadaverinu.

Siláže hybridu Pramedi měly srovnatelný obsah biogenních aminů při použití biologických i chemických konzervantů. Výjimku představoval obsah histaminu, který byl v silážích ošetřených chemickým aditivem nulový. Steidlová a Kalač (2004) zjistili histamin u travních siláží pouze v případě, že nebyly ošetřeny aditivy (7,4 mg/kg). Siláže ošetřené chemickými i biologickými konzervanty byly prosté histaminu.

3.7.2 Biogenní aminy u vojtěšky seté

Experiment s vojtěškou setou odrůda Jarka byl založen na pokusných plochách Výzkumného ústavu pícninářského v Troubsku. Hodnocena byla biomasa z prvního užitkového roku. Silážovány byly vzorky zelené a zavadlé píce z první seče. Část silážovaných vzorků byla kontaminována zeminou z pokusné plochy. Reprezentativní vzorky píce (6 kg) byly umístěny do umělohmotných mikrosilážních nádob a utuženy tlakem 600 kg/m³. Nádoby byly skladovány v místnosti bez přímého světla při teplotě 28 °C po dobu 90 dnů. Pro konzervaci bylo použito biologické a chemické aditivum. Použitá aditiva byla porovnána s neošetřenou kontrolní variantou. Biologické aditivum obsahovalo bakterie mléčného kvašení *Lactococcus lactis* (NCIMB 30117), *Lactobacillus plantarum* (DSM 16568), *Enterococcus faecium* (DSM 22502/ NCIMB 11181) a enzym xylanasu EC 3.2.1.8. Chemické aditivum bylo tvořeno ze 43 % kyselinou mravenčí, 30 % mravenčanem amonným, 10 % kyselinou propionovou a 2 % kyselinou benzoovou. Odběry siláží byly provedeny 90 dnů po začátku konzervace. Vzorky zelené píce, zavadlé píce a siláží byly analyzovány v laboratořích Ústavu chemie a biochemie AF MENDELU v Brně. Hodnocen byl celkový obsah biogenních aminů (BA), histaminu



(Him), tyraminu (Tym), putrescinu (Put), kadaverinu (Cad), spermidinu (Spd) a sperminu (Spm).

Biogenní aminy byly zachyceny již v zelené píci a obsah biogenních aminů se nepatrně zvyšoval také během zavadání (Tab. 5). Siláže vyrobené z nezavdlé biomasy měly celkový obsah biogenních aminů od 85 až do 7986 mg/kg (Tab. 6). Vysoký byl zejména obsah tyraminu, putrescinu, kadaverinu a sperminu. Použití biologického aditiva bylo účinné, pokud nebyly siláže kontaminovány zeminou. Kontaminace zeminou zvýšila riziko výskytu biogenních aminů a naprosto eliminovala účinek biologického aditiva. Siláže vyrobené ze zavdlé biomasy měly obsah biogenních aminů od 428 do 3243 mg/kg. Kontaminace zeminou zvýšila riziko výskytu biogenních aminů a stejně jako v případě zavdlé biomasy eliminovala účinek biologického aditiva. Kontaminace zeminou vedla ke zvýšení obsahu problémového histaminu. Jak již bylo konstatováno v předešlé části, Steidlová a Kalač (2004) zjistili histamin u siláží pouze v případě, že nebyly ošetřeny aditivou (7,4 mg/kg). Siláže ošetřené chemickými i biologickými konzervanty byly prosté histaminu. Pro výrobu siláží z biomasy kontaminované zeminou bylo účinnější použití chemického konzervantu.

Tab. 5 Vliv kontaminace zeminou na obsah biogenních aminů v zelené a zavdlé biomase vojtěšky seté

Kontaminace zeminou	Him mg/kg	Tym mg/kg	Put mg/kg	Cad mg/kg	Spd mg/kg	Spm mg/kg	BA celkem mg/kg
Zelená biomasa							
Nekontaminovaná	5	52	9	2	4	37	109
Kontaminovaná	7	32	3	3	5	77	127
Zavdlá biomasa							
Nekontaminovaná	5	115	6	4	6	34	170
Kontaminovaná	11	145	8	5	10	34	213



Tab. 6 Vliv kontaminace zeminou a obsahu sušiny na obsah biogenních aminů ve vojtěškových silážích

Kontaminace zeminou	Him mg/kg	Tym mg/kg	Put mg/kg	Cad mg/kg	Spd mg/kg	Spm mg/kg	BA celkem mg/kg
Nezavadlá							
Neošetřené							
Nekontaminovaná	10	919	302	228	4	223	1686
Kontaminovaná	11	551	262	148	0	240	1212
Biologické aditivum							
Nekontaminovaná	11	72	344	134	0	254	815
Kontaminovaná	17	5948	1425	0	0	597	7986
Chemický konzervant							
Nekontaminovaná	8	967	391	0	0	305	1671
Kontaminovaná	12	1083	300	0	0	0	1395
Nezavadlá							
Neošetřené							
Nekontaminovaná	12	589	217	115	0	180	1114
Kontaminovaná	11	652	258	255	0	163	1340
Biologické aditivum							
Nekontaminovaná	11	1200	435	250	0	428	2325
Kontaminovaná	144	763	1799	368	0	168	3243
Chemický konzervant							
Nekontaminovaná	15	848	243	0	1	222	1328
Kontaminovaná	30	2	165	0	6	225	428



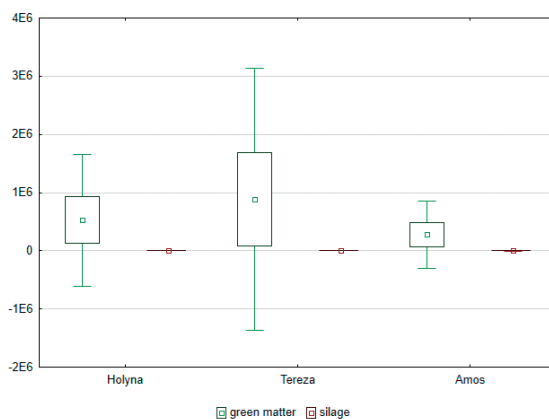
3.8 Mykotoxiny v pokusných mikrosilážích

Mykotoxiny deoxynivalenol a zearalenon byly zachyceny nejenom v silážích, ale také v zelené hmotě (Tab. 7). V případě zearalenonu bylo na stanovišti Troubsko možné zaznamenat zvýšení obsahu zearalenonu v silážované biomase. V ostatních případech byl obsah mykotoxinů v silážované hmotě srovnatelný s původní zelenou hmotou před silážováním, případně byl dokonce nižší.

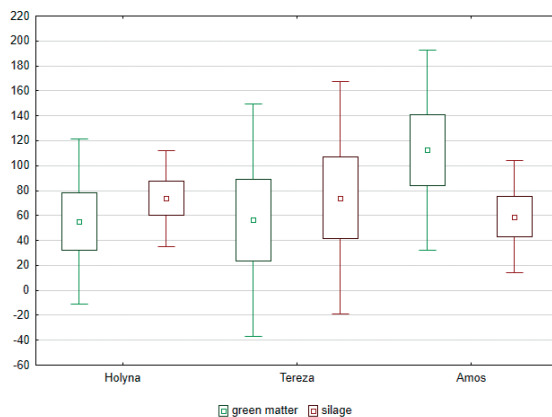
Vláknité houby produkující mykotoxiny patří mezi aerobní mikroorganismy, jejich spory tak byly zaznamenány v zelené píci. Anaerobní prostředí siláží potlačilo mikroskopické houby (Obr. 4), ale nevedlo k deaktivaci přítomných mykotoxinů. Přestože byly vyrobené siláže prosté vláknitých hub, tak zde zůstal zachovaný obsah deoxynivalenolu a zearalenonu. Mykotoxiny přecházely společně se sklizenou zelenou pící do následně vyrobených siláží (Obr. 5 a Obr. 6).

Tab. 7 Obsah mykotoxinů v zelené hmotě a silážích ze stanoviště Troubsko a Vatín

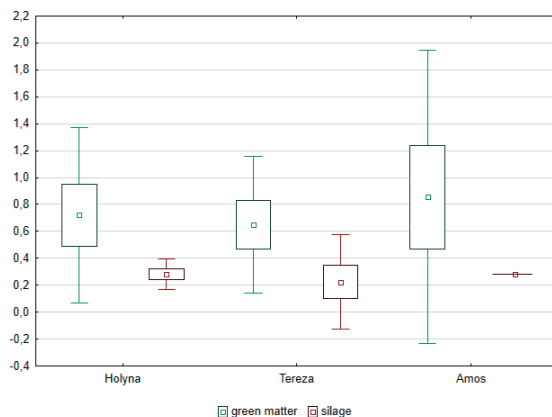
	Troubsko				Vatín			
	Zelená hmota		Siláž		Zelená hmota		Siláž	
Druh	DON (ppm)	ZEA (ppb)	DON (ppm)	ZEA (ppb)	DON (ppm)	ZEA (ppb)	DON (ppm)	ZEA (ppb)
Vojtěška setá Holyna	0,49	31,84	0,32	87,47	0,95	78,50	0,24	60,21
Vojtěška setá Tereza	0,47	23,45	0,35	107,23	0,83	89,17	0,10	41,18
Jetel luční 2n Spurt	0,50	50,26	0,33	72,81	1,21	85,56	0,31	52,95
Jetel luční 4n Amos	0,47	84,11	0,28	75,03	1,24	140,87	0,28	43,19
J. luční x J. prostřední Pramedi	0,65	64,78	0,26	81,93	1,31	104,23	0,23	45,88



Obr. 4 Porovnání počtu kolonií (CFU/g) tvořených mikroskopickými houbami v zelené hmotě a silážích vojtěšky seté a jetele lučního



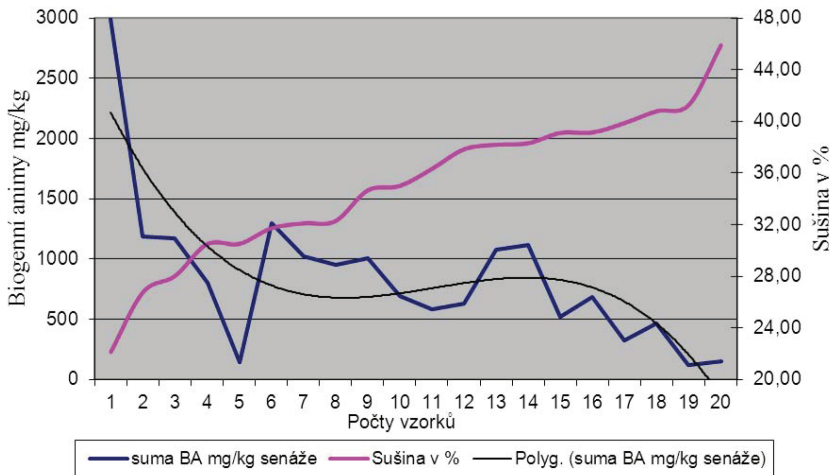
Obr. 5 Porovnání obsahu zearalenonu (ppb) v zelené hmotě a silážích vojtěšky seté a jetele lučního



Obr. 6 Porovnání obsahu deoxynivalenolu (ppm) v zelené hmotě a silážích vojtěšky seté a jetele lučního

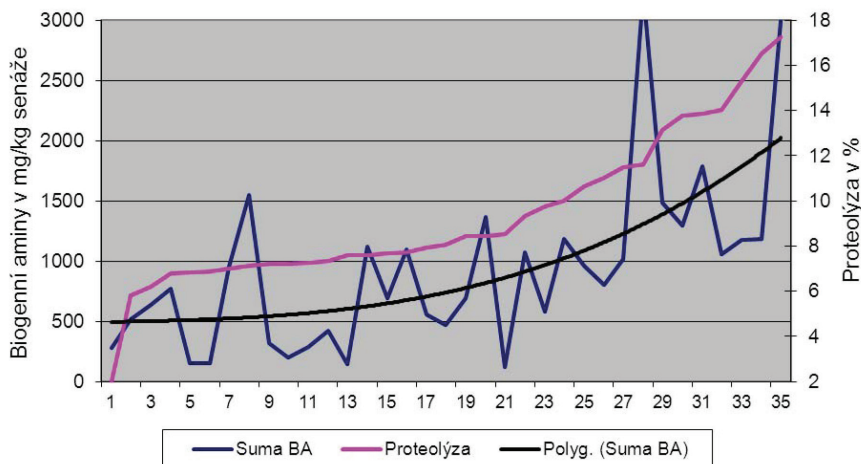
3.9 Biogenní aminy v silážích z provozních podmínek

Biogenní aminy jsou pro zemědělskou výrobu v dnešní době jednou z nejvýznamnějších rizikových skupin antinutričních látek. Riziko roste, pokud jsou krmné suroviny sklizeny za špatných hygienických podmínek (kontaminace zeminou - infekce klostridiemi). Největší problém, který trápí zemědělské podniky, je nepříznivé počasí. Pokud dostatečně nezavadne bílkovinná píce na siláž a musí se sklízet za nízké sušiny, je velký předpoklad, že fermentační proces nebude optimální. Mezi rizikové řadíme zejména siláže bílkovinné (vojtěškové, jetelové atd.). Na obr. 7 je vidět, že při nízkých sušinách je pravděpodobnost výskytu biogenních aminů vysoká, zvláště je to vidět na polynomické spojnicí trendu. Kolísání obsahu biogenních aminů v rozbořech záleží na mnoha faktorech, které negativně ovlivňují fermentační proces. Při špatném fermentačním procesu dochází k rozkladu bílkovin, které se v rozboru projeví zvýšenou proteolýzou.



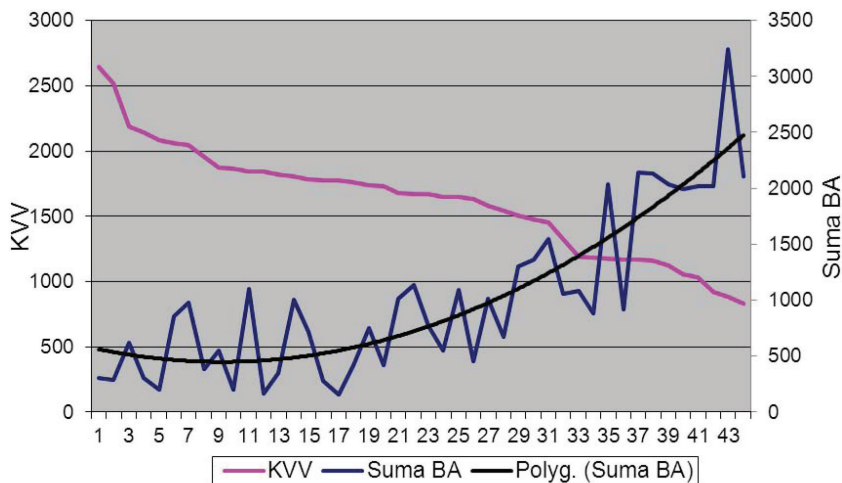
Obr. 7 Závislost sušiny na obsahu biogenních aminů rok 2014 - 2015

Na obr. 8 je zachycen vliv proteolýzy na obsah biogenních aminů v bílkovinných silážích v letech 2014 - 2015. Pro lepší přehlednost je hodnotami biogenních aminů opět vedena polynomičká spojnice trendu, která prakticky kopíruje křivku hodnot proteolýzy. Proteolýza již vzniká na poli na pokosu při zavadání. Čím delší dobu leží silážní hmota na poli, případně do ní i prší, tím je vyšší hodnota proteolýzy a v případě kontaminace hlinou (klostridie) se hodnoty zvyšují. Hodnota proteolýzy se u bílkovinných siláží toleruje do 7 % a u siláží z vojtěšky do 8 %. Pokud se hodnota proteolýzy dostane nad 15 %, je tato siláž podmíněčně zkrmitelná. V případě, že proteolýza je nad 20 %, pak je již zdravotně závadná a nesmí se zkrmovat. Zdravotní problémy pak způsobuje při rozkladu bílkovin jak čpavek, tak velké množství biogenních aminů.



Obr. 8 Vliv proteolýzy na obsah biogenních aminů v silážích (rok 2014 – 2015)

V obr. 9 je znázorněna závislost biogenních aminů na kyselost vodního výluhu (KVV). Důležité je při fermentačním procesu rychlé a dostatečné zfermentování silážní hmoty. Podmínkou úspěch je rychlé snížení pH, ale to je silně ovlivněno sušinou siláže. Při vyšších sušinách je pH relativně vysoké a z tohoto důvodu je vhodnější sledovat i KVV, které vypovídá o celkovém množství vytvořených kyselin. Pokud KVV je dostatečně vysoké, tak to svědčí o tom, že fermentační proces byl úspěšný. Z obr. 9 vyplývá, že hraniční hodnota KVV se pohybuje na hladině cca 1200. Tato závislost však platí u siláží, které byly ošetřeny probiotickými přípravky. Pokud použijeme ke konzervaci přípravky na bázi kyseliny mravenčí, dochází při aplikaci k okamžitému okyselení a k utlumení celkového fermentačního procesu, takže i KVV bude nižší. Následkem utlumení fermentačního procesu je i malá proteolýza bílkovin, a vytvoří se malé množství biogenních aminů.



Obr. 9 Závislost biogenních aminů na KVV (rok 2015 – 2016)

V tab. 8 jsou znázorněny výsledky jednotlivých sečí a druhů siláží. Ve vojtěškové siláži byl jako nejrizikovější biogenní amin vyhodnocen histamin, jeho hodnoty se pohybovaly v rozmezí 11,7 až 489,5 mg/kg siláže. Tento biogenní amin se zároveň vyznačuje vysokou mírou toxicity, čímž jeho výskyt nabývá na významu a upozorňuje na případné problémy s paznehty. Naopak u krmného hrachu byla naměřena vysoká hladina kadaverinu. Dále byly naměřeny vyšší hladiny tyraminu a putrescinu. Stejný trend byl zaznamenán rovněž u vojtěškotrávy a siláže z TTP, kdy nejvíce zastoupeným biogenním aminem v biomase byl kadaverin. Při hodnocení biogenních aminů je nutné také vycházet i z jejich sumy, která se v daném období pohybovala v rozmezí 118 až 2990 mg/kg siláže. V tab. 9 je obsah biogenních aminů u siláží odebraných v provozních podmínkách v roce 2016. Tento rok byl v kvalitě fermentačního procesu velice vyrovnaný. Suma biogenních aminů se pohybovala v rozmezí 55,9 až 1091,4 mg/kg siláže. U vzorků 15 a 16 byl obsah biogenních aminů velice nízký, protože siláž byla vyrobena za extrémně teplého počasí (35° C) a fermentační proces byl jen minimální. V tabulce u jednotlivých siláží jsou uvedeny jak aditiva biologická,



tak konzervanty na bázi kyseliny mravenčí. V nádobových pokusech se prokázal pozitivní vliv na nízký obsah biogenních aminů, tak i v provozních podmínkách se to potvrdilo. Například vzorek č. 9 byla siláž z hrachu ošetřena kyselinami a díky tomu nedošlo k rozkladu aminokyselin na biogenní aminy. S hodnotou 76,1 mg/kg siláže je bezpečným krmivem pro skot. U vzorku č. 5, siláž z vojtěšky z první seče, je negativním extrémem vysoká hodnota histaminu 368,5 mg/kg siláže. Přestože celkové množství biogenních aminů není vysoké, přesto tato siláž může způsobit zdravotní problémy s paznehty.



Tab. 8 Obsah biogenních aminů u siláží z provozních podmínek za rok 2014 – 2015

Název siláž	Suš.	Him	Spd	Spm	Tym	Put	Cad	Σ BA
	%	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Vojtěšková siláž	38,2	114,1	3	0,5	233	277	449	1076
Vojtěšková siláž, 1. s.	37,8	11,7	3	9,4	310	41	257	633
Vojtěšková siláž	35	125	3	0,5	154	46	364	692
Hrách silážovaná drť	31,7	16,2	39,6	77,7	591	42	530	1296
Jetelotravní siláž, 2. seč, vak	32,3	43,7	94,6	9	450	249	109	955
Vojtěšková siláž	39,9	22,8	9,1	0,5	110	55	125	322
Vojtěšková siláž, 3. seč, vak	38,3	489,5	36,6	19,7	155	126	291	1117
Vojtěšková siláž	39,1	21,8	31,9	7,4	272	27	158	519
Vojtěšková siláž, 2. seč	40,8	40,2	123,7	15,1	218	39	30	466
Vojtěšková siláž	32,1	89,9	8,2	0,5	237	255	431	1021
Vojtěšková siláž, 3. seč	45,9	26,4	21	8	31	40	26	151
Vojtěšková siláž, 2. seč	41,3	22,2	27,5	22,1	11	22	14	118
Siláž TTP 25% + voj.tr.	28	178,4	28,4	2,6	215	291	459	1175
Vojtěškotráva siláž, 2. s.	22,1	444,9	11,1	4,6	557	708	1265	2990
Vojtěšková siláž	39,1	42,5	32,1	21,7	372	85	135	688
Hrách silážovaná drť	26,8	69	35,8	12,9	209	229	629	1185
Vojtěšková siláž	30,5	29,8	88,9	32	364	41	246	802
Siláž vojtěška 50% + trávy	30,5	17,7	18,4	2,3	41	24	44	147
Siláž TTP+vojt.+hrách -1.odběr	36,3	36,6	5,3	0,5	423	35	82	583
Siláž TTP+vojt.+hrách -2.odběr	34,7	106,9	12,6	8,1	326	194	362	1009



Tab. 9 Obsah biogenní aminů u siláží odebraných v provozních podmínkách za rok 2016

	Název siláže	Seč	Konzervant	Him	Spd	Spm	Tym	Put	Cad	Σ BA
				mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
1	Sil. vojtěška	4. s.	Bil.kon.	47,5	10,1	33	28,5	28	58,1	205,2
2	sil.hrách		Bil.kon.	89,1	19,7	20,4	137,8	122,9	456,4	846,3
3	Sil. vojtěška	1.s.	Bil.k.En	20,1	10,1	28,9	189,5	54	224,1	526,7
4	silážní hmota	panen.s.		23,7	11,5	16	1,3	23,5	12,3	88,3
11	silážní hmota	panen.s.		40,5	13,8	18	10,5	8,7	9,8	101,3
5	Sil. vojtěška	1.s.	Bil.k.En	368,5	16,7	25	90,1	31,2	203,7	735,2
6	Sil. hmota	1.s. vojt.		19,9	22,3	45,5	11,4	22,3	12	133,4
7	Sil. vojtěška	3.s.	Kyseliny		9,6	1,4	229,8	17,8	293,9	552,5
8	Sil. vojtěška	3.s.	Bil.k.En	0	33,4	6,8	272,7	10,1	19,5	342,5
9	sil. Hrách		Kyseliny	15,5	7,4	12,4	11,1	18,4	11,3	76,1
10	Sil. vojtěška	2.s.	Kyseliny	5,4	34,9	23,5	24,9	29,3	58,4	176,4
12	Sil. vojtěška	1.s.	Bil.k.E	22,6	13,9	37,6	299,8	109,9	607,6	1091,4
13	sil hrách		Bil.kon.	25,5	11,7	5,5	218,5	392,2	624,6	1278
14	sil. vojtěška	3.s.	Silosolve	146	18	14,8	284,7	14,2	78,4	556,1
15	sil. vojtěška	panen.s.	Bil.k.E	9,5	12,7	6,2	9,8	11,2	6,5	55,9
16	sil. vojtěška	panen.s.	Bil.k.+Ch	12,9	13,9	10	10,6	9,2	8,1	64,7
17	sil. vojt +hrách	2.s.	Bil.k.En	19,5	20,7	27,8	159,1	26,7	252,6	506,4
18	sil. kukuřice		Bil.kon.	32	0	6,2	112	89	77,8	317
19	sil. vojt +hrách	2.s. vojt.	Bil.k.En	87,8	11,1	6,6	175,7	183	390,9	855,1
20	sil. vojtěška	1.s.	Bil.k.En	99,2	13,8	36	136,2	178,7	523,7	987,6



3.10 Doporučení pro praxi

Zdravotní bezpečnost siláží z objemné píce je možné v první řadě zajistit dodržením všech technologických zásad při výrobě siláží. Zásadou číslo jedna je dodržení optimální sušiny siláže. Při silážování bílkovinných krmiv s nízkým obsahem sušiny je třeba využít silážní aditiva. V biomase může docházet k hlubokému rozkladu bílkovin a následně tvorbě biogenních aminů. Biogenní aminy se tvoří v případě, že nedojde k okyselení silážované hmoty během 10 dnů. Tento proces je možné ovlivnit rychlým okyselením silážované biomasy prostřednictvím organických kyselin, jak vyplývá z dosažených výsledků. Při použití organických kyselin není nutná vyšší sušina, ale již při sušinách kolem 30 % dochází u bílkovinných objemných krmiv ke stabilizaci silážní hmoty s minimální dopadem na rozklad bílkovin a vzniku proteolýzy. Jediným problémem při používání organických kyselin je cena konzervantu, která je několikanásobně vyšší než u probiotických přípravků. Z tohoto důvodu doporučujeme maximálně využít chemické konzervanty při nepříznivém počasí. Pokud je počasí příznivé, pak můžeme bez problémů využít do bílkovinných siláží biologická aditiva. Silážovatelnost bílkovinných krmiv záleží i na konzervovatelnosti krmiva. Obecně lze říci, že záleží na obsahu hrubého proteinu. Největší problémy se vyskytují u mladé vojtěšky, kde obsah hrubého proteinu v průměru ČR je cca 21 %, ale jsou siláže, které mají obsah až 27 %. Taková vojtěška má nízkou sušinu a na pokosu špatně zavadá a zůstává na poli několik dnů, aby dosáhla optimální sušiny a to je hlavní problém vzniku proteolýzy a následně tvorby biogenních aminů. Z biologických aditiv je možné využít přípravky, které obsahují *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum* a *Enterococcus faecium*. Jiné výsledky (Nishino et al., 2007) doporučují spíše aditiva s obsahem *Lactobacillus casei*. U biologických aditiv se účinek snižuje u píce kontaminované zeminou, která obsahuje klostridie. Z Databanky krmiv (vedené od roku 1997 v AgroKonzultě Žamberk spol. s r.o.), do které se shromažďují krmiva ze zemědělských podniků v ČR, se průměr popelovin



u siláží vojtěšek pohybuje na hladině 11,11 % a to je nejvíce ze siláží z objemných krmiv. Je však hodně rozborů, které mají hodnotu popelovin v rozmezí 15 % až 17 %. U siláží s tak vysokým obsahem popelovin při nedodržení optimální sušiny je velká pravděpodobnost znehodnocení siláže. Pokud se vyrobí siláž s proteolýzou 15 % nebo dokonce 20 % (zdravotně závadná siláž) a zkrmuje se, dojde ke snížení užitkovosti, ale co je mnohem horší, je zhoršení zdravotního stavu, rapidní snížení zabřezávání a v neposlední řadě dochází i k úhynům. Pokud siláž má více jak 20% proteolýzu (automaticky obsahuje vysoké množství biogenních aminů), je nutné přistoupit k likvidaci siláže z důvodu zdravotní závadnosti. Pokud siláž má hmotnost 1000 tun, cena siláže za tunu se pohybuje cca na 800,- Kč/t, pak likvidace siláže přijde zemědělský podnik na 800 000,- Kč. Jestliže bude zdravotně závadná siláž zkrmena, pak ztráty na zvířatech a užitkovosti budou mnohem vyšší, s předpokladem dlouhodobého zdravotního narušení celého stáda (včetně jalovic).

Na zdravotní stav a zhoršení užitkovosti ze zdravotně závadné siláže má vliv celý komplex ukazatelů. Při špatném fermentačním procesu je vysoká proteolýza a vnikají antinutriční látky. Z hlavních toxicky působících látek je čpavek spolu s biogenními aminy. Mezi nejrizikovější aminy patří histamin, který vyvolává snížení krevního tlaku a zhoršuje cirkulaci krve v končetinách skotu. Abychom se vyvarovali špatnému fermentačnímu procesu, je nutné maximálního dodržování správného technologického postupu při silážování. V případě nepříznivého počasí je vhodné použít chemický konzervant, který přispěje ke zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží.



4 Srovnání novosti postupů

Předložená metodika se zaměřuje na hodnocení zdravotní bezpečnosti siláží vojtěšky seté, jetele lučního a hybridu Pramedi. Hodnotí vliv druhu, sušiny, kontaminace zeminou a silážních aditiv na obsah biogenních aminů a mykotoxinů u významných druhů jetelovin. Dosavadní práce se zaměřovaly zejména na technologické postupy výroby kvalitních siláží, orientují se na problematiku hodnocení obsahu organických a anorganických živin, zvláštní pozornost bývá věnována hrubé vláknině. Předcházející metodiky se podrobně zabývaly hodnocením obsahu mykotoxinů, ale zejména u kukuřice seté a trav, které jsou náchylnější k houbovým chorobám. Publikována již byla metodika podrobně se zabývající analýzou biogenních aminů v silážích. Novost předložené metodiky spočívá v implementaci analýzy biogenních aminů na další pracoviště v České republice a posouzením obsahu biogenních aminů nejenom u siláží v provozních podmínkách, ale také u siláží vyrobených v rámci maloparcelkových experimentů. Přináší nejenom výsledky hodnocení obsahu biogenních aminů v pokusných mikrosilážích, ale doporučuje také postupy pro praxi při silážování nedostatečně zavdlé píce s cílem zachovat zdravotní bezpečnost siláží. Obsah biogenních aminů je doplněn analýzou obsahu mykotoxinů v silážích jetelovin.



5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Uživatelé metodiky budou především malé a střední zemědělské podniky, které se zabývají chovem přežvýkavců. Uzavřena byla smlouva o využití výsledku se Svazem chovatelů českého strakatého skotu. Metodika je určena pro všechny zemědělské podnikatele, kteří chtějí zvýšit zdravotní bezpečnost krmiv a kvalitu živočišných produktů. Metodiku dále využijí zemědělské poradci, kteří jsou zaměřeni na výživu hospodářských zvířat.

Metodika bude dostupná všem uživatelům v elektronické podobě ze stránek Výzkumného ústavu pícninářského v Troubsku a AgroKonzulty, s.r.o. Žemberk. Publikace je dále vydána Výzkumným ústavem pícninářským v počtu 300 ks v tištěné podobě, resp. na CD a bude k dispozici zájemcům na konferencích a seminářích.



6 Ekonomické aspekty

Zdravotní bezpečnost siláží je velice důležitá pro každého chovatele, protože se odráží nejenom ve zdravotním stavu hospodářských zvířat, ale i v kvalitě živočišných produktů, které mají úzkou souvislost s bezpečností a hygienickou nezávadností potravin (maso a mléko). Získané poznatky mohou umožnit výrobu zdravotně bezpečných siláží a předcházet tím zdravotním problémům hospodářských zvířat.

Metodika bude cenná z ekonomického hlediska zejména pro zemědělské podniky, které mají ve svých krmných dávkách vysoké procento bílkovinných siláží. U těchto siláží roste riziko výskytu biogenních aminů a jejich následný výskyt významně ohrožuje ekonomiku chovu. Včasná detekce výskytu biogenních aminů povede k udržení odpovídající užitkovosti, snížení finančních nákladů za veterinární léčbu a v neposlední řadě dojde k celkovému zlepšení welfare zvířat. Siláže kontaminované biogenními aminy a mykotoxiny nejsou vhodné k dalšímu využití ve výživě hospodářských zvířat, ani pro využití v bioplynových stanicích. Siláže s vysokým obsahem biogenních aminů je potřeba znehodnotit. Pokud siláž má více jak 20% proteolýzu (automaticky obsahuje vysoké množství biogenních aminů), je nutné přistoupit k likvidaci siláže z důvodu zdravotní závadnosti. Pokud siláž má hmotnost 1000 tun, cena siláže za tunu se pohybuje cca na 800,- Kč/t, pak likvidace siláže přijde zemědělský podnik na 800 000,- Kč. Jestliže by zdravotně závadnou siláž zkrmil, pak ztráty na zvířatech a užitkovosti by byly mnohem vyšší, s předpokladem dlouhodobého zdravotního narušení celého stáda (včetně jalovic).



7 Seznam použité literatury

- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausage. *Journal of Food Protection*, 2000, sv. 63, č. 2, s. 237–243.
- Buxton, D. R., Hornstein, J. S., Weiden, W. F., Marten, G. C. Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil and red clover. *Crop sci.*, 1985, sv. 25, s. 273 – 279.
- Doležal, P. [ed]. *Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat*. Olomouc: Vydavatelství Petr Baštan, 2012. 307 s.
- Doležal, P., Doležal, J., Mikyska, F., et al. *Konzervace, skladování a úpravy objemných krmiv*. Brno: MZLU Brno, 2006. 247 s.
- Doležal, P., Skládanka, J. Vliv vegetačního stádia vojtěšky seté na chemické složení a in sacco stravitelnost organické hmoty. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2008, sv. 56, č. 1, s. 55 – 63.
- Hakl, J., Kalista, J., Šantrůček, J. Určení termínu sklizně vojtěšky s využitím sumy efektivních teplot. *Úroda*, 2005, sv. 53. č. 4, s. 6.
- Hejduk, S., Knot, P. Effect of provenance and ploidity of red clover varieties on productivity, persistence and growth pattern in mixture with grasses. *Plant, Soil and Environment*, 2010, sv. 56, č. 3, s. 111 – 119.
- Kalač, P., Míka, V. *Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech*. ÚZPI Praha, 1997. 317 s.
- Krynski, A. Zatrucia produktami rozpadu bialka. *Hodowca Drob. Inwent.*, 1988, sv. 36, s. 4-5.
- Křížek, M. Biogenic amines in silage. 1. The occurrence of biogenic amines in silage. *Arch. Anim. Nutr.*, 1993, sv. 43, s. 169-177.
- Lancova, K., Hajslova, J., Kostelanska, M., Kohoutkova, J., Nedelnik, J., Moravcova, H., Vanova, M. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking. *Food Addit. Contam.* 2008, sv. 25, s. 650-659.



- Míka, V., Harazim, J., Kalač, P., Kohoutek, A., Komárek, P., Míka, V., Pavlů, V., Pozdíšek, J. *Kvalita píce*. Praha: UZPI Praha, 1997. 227 s.
- Nishino, N., Hattori, H., Wada, H., Touno, E. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, sv. 103, s. 325-332.
- Pelikán J., Knotová D., Hofbauer J. *Méně známé druhy zemědělských plodin*. Olomouc: Agriprint. s.r.o., 2016. 272 s.
- Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A. A., Fanelli, C., Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, sv. 87, s. 899-911.
- Santos, S.M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food. Microbiol.*, 1996, sv. 29, s. 213-231.
- Scherer, R., Gerlach, K., Südekum, K.-H. Biogenic amines and gamma-amino butyric acid in silages: Formation, occurrence and influence on dry matter intake and ruminant production. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, sv. 210, s. 1-16.
- Silla Santos, M. H. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, sv. 29, s. 213-231.
- Skladanka, J., Nedelnik, J., Adam, V., Dolezal, P., Moravcova, H., Dohnal, V. Forage as a primary source of mycotoxins in animal diets. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2011, sv. 8, s. 37-50.
- Steidlová, Š., Kalač, P. Biogenní aminy v travních a jetelotravních silážích. *Collection of Scientific Papers, Faculty of Agriculture in České Budějovice, Series for Animal Sciences*, 2002, sv. 19, s. 153-160.
- Steidlová, Š., Kalač, P. The effects of lactic acid bacteria inoculants and formic acid on the formation of biogenic amines in grass silages. *Archives of Animal Nutrition*, 2004, sv. 58, s. 245-254.
- Tveit, B., Lingaas, F., Svendsen, M., Sjaastad, O.V. Etiology of acetoneemia in Norwegian Cattle. 1. Effect of ketogenic silage, season, energy level, and genetic factors. *J. Dairy Sci.*, 1992, sv. 75, s. 2421-2432.



- Van Os, M., Van Wikselaar, P.G., Spoelstra, S.F. Formation of biogenic amines in well fermented grass silages. *Journal of Agricultural Science*. 1996, sv. 127, s. 97-107.
- Vasatkova, A., Krizova, S., Krystofova, O., Adam, V., Zeman, L., Beklova, M., Kizek, R. Effect of naturally mouldy wheat or fungi administration on metallothioneins-3 level in brain tissues of rats. *Neuroendocrinol. Lett.*, 2010, sv. 30, s. 163-168.
- Vyskočil, I., Zeman, L., Kratochvílová, P., Večerek, M., Vašátková, A. *Kapesní katalog krmiv*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 2008.



8 Seznam publikací předcházejících metodice

Mlejnková, V., Horký, P., Prášková, M., Skládanka, J., Hodulíková, L., Adam, V., Mlček, J., Juríková, T., Sochor, J. Biogenic amines and hygienic quality of lucerne silage. *Open Life Sciences*. 2016. sv. 11, č. 1, s. 280-286.

Mendelova univerzita v Brně. *Paramagnetická polymerní kompozice určená k izolaci biogenních aminů obsahující paramagnetické částice*. Kopel, P., Heger, Z., Cernei, N., Zítka, O., Kizek, R., Adam, V., Skládanka, J., Zítka, J., Horký, P. 29186. Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika.

Komínková, M., Lacková, Z., Cernei, N., Horký, P., Mlejnková, V., Hodulíková, L., Balabánová, M., Mikyska, F., Knotová, D., Pelikán, J., Skládanka, J., Adam, V., Kizek, R. *Metodika stanovení biogenních aminů v silážích*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. 37 s.



9 Dedikace a jména oponentů

Tato práce vznikla s podporou grantu QJ1310100 „Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“ financovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV).

Oponenti:

doc. Ing. David Zapletal, Ph.D. – Veterinární a farmaceutická univerzita

Ing. Jiří Kolouch – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský



Vydavatel:

© Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko

© Mendelova univerzita v Brně

© AgroKonzulta Žamberk spol. s r. o.

Náklad: 300 výtisků

Tisk: Agriprint, s.r.o., Wellnerova 7, 779 00 Olomouc

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.

ISBN 978-80-88000-19-8