



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Autoreferát dizertační práce

Využití plazmových technologií ke zlepšení kvality krmiv

Mgr. Zbyněk Havelka

2019

Školitel: doc. RNDr. Petr Bartoš, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Pavel Kříž, Ph.D.

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Abstract

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

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

The resulting part is, for its clear arrangement, divided into four subchapters – stating of selected parameters of plasma device, influence of plasma on nutritional parameters, influence of plasma on the model fungus *Trichoderma virens* and possibilities of the use of plasma discharge for the decreasing of concentration of mycotoxins in feedstuffs.

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

Obsah

Úvod	4
1 Rešerše literatury	6
1.1 Houbové organismy	6
1.2 Mykotoxiny	8
1.2.1 Vliv mykotoxinů na užitkovost zvířat	8
1.2.2 Možnosti dekontaminace mykotoxinů v krmivech	10
1.3 Plazmové technologie	10
2 Cíl a hypotézy práce	13
3 Materiál	15
3.1 Plazmová aparatura	15
3.2 Použitý biologický materiál	18
4 Vybrané výsledky	19
4.1 Charakterizace plazmové aparatury	19
4.1.1 Distribuce teplotního pole	19
4.1.2 Měření spektrálních charakteristik plazmového výboje typu Gliding Arc	21
4.2 Vliv plazmatu na vybrané výživové parametry	22
4.3 Vliv plazmatu na modelovou houbu <i>T. virens</i>	24
4.3.1 Vliv vzdálenosti plazmové hlavice od myceliálního disku	24
4.3.2 Vliv UV záření na klíčivost spor houby <i>T. virens</i>	26
4.3.3 Vliv teplého vzduchu na klíčivost spor houby <i>T. virens</i>	28
4.3.4 Vliv plazmového výboje na houby přítomné na povrchu laboratorně infikovaných semen	29
4.4 Vliv plazmatu na mykotoxiny	31
4.4.1 Vliv plazmového výboje na koncentraci DON a D3G na laboratorních substrátech	31
4.4.2 Vliv plazmového výboje na obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici jarní	34
Závěr	36
Seznam literatury	37

Úvod

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

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

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

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

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

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

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

Kapitola 1

Rešerše literatury

Realizovaný výzkum je možno charakterizovať ako výrazne medzioborový s presahom do oblasti fyziky plazmatu, mikrobiológie a návrhu a konstrukcie technických zariadení. Z tohoto dôvodu je rešerše literatury rozdelená do troch separátnych oblastí pokrývajúcich predmetnú problematiku houbových mikroorganizmů, mykotoxínů a plazmatu. Vzhľadom ke značnému počtu publikácií v uvedených oborech jsou v rešerši zmíněny jen ty nejvýznamnější výsledky úzce související s tématem dizertační práce.

1.1 Houbové organismy

Houby predstavujú fylogeneticky diverznú skupinu mikroorganizmů. Jedná sa o heterotrofnú eukaryota, ktorá jsou buď jednobuněčné (kvasinky) alebo hyfální (vláknité houby). Houbové organismy se rozmnožují pohlavně (telemorfa) nebo nepohlavně (anamorfa).

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Mykotoxiny

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

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

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

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

Nejčastějšími a nejnebezpečnějšími druhy mykotoxinů jsou zřejmě Aflatoxiny, Deoxynivalenoly, Zearalenony, Ochratoxiny, T2 toxiny a Fumonisin (Kulovaná et al., 2002). Požití potravy obsahující některý z těchto mykotoxinů může vést k intoxikaci s chronickým (dlouhodobý příjem malého množství) nebo akutním průběhem (příjem vysoké dávky). Výše vyjmenované mykotoxiny, vyjma T2 toxinu, jsou u potravin monitorovány a jejich maximální povolený obsah v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ je stanoven komisí Evropské unie v Úředním věstníku (Úř. věst. L 364, 19. 12. 2006, s. 15–21).

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

1.2.1 Vliv mykotoxinů na užitkovost zvířat

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

Zdravotní obtíže hospodářských zvířat vyvolané mykotoxiny jsou dány v první řadě druhem požitého mykotoxinu, jeho množstvím a případnou kombinací s jiným mykotoxinem a jejich konjugáty. Každý mykotoxin ovlivňuje tělo zvířete jiným způsobem. Jednorázové zkrmení napadeného krmiva způsobuje primární mykotoxikózy. Při dlouhodobějším příjmu krmiva obsahující menší množství toxických mykotoxinů dochází k chronickým účinkům (Suchý a Herzig, 2005).

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

Všeobecně se dá říci, že většina mykotoxinů způsobuje snížení příjmu potravy zvířaty, což vede k podvýživě, anorexii a později k úhynu zvířete, napadají trávicí ústrojí, ledviny a játra. Při reprodukci způsobují rození malých a slabých jedinců a pseudograviditu.

Tabulka 1.1: Limitní hodnoty koncentrace mykotoxinů v krmivech (Zeman et al., 2015)

Mykotoxin	Typ krmiva	Limitní koncentrace
		$[\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}]$
Aflatoxin B1	Kompletní krmiva pro dojnice a mladá zvířata	5
	Krmiva	20
Deoxynivalenol	Kompletní doplňková krmiva pro prasata	900
	Obiloviny a krmiva z obilovin	8 000
	Kukuřice a vedlejší krmiva	12 000
Zearalenon	Kompletní a doplňková krmiva pro selata a prasničky	100
	Kompletní a doplňková krmiva pro telata, dojnice, ovce a kozy	500
	Kukuřice a vedlejší krmiva	3 000
Fumonisin B1 a B2	Kompletní a doplňková krmiva pro prasata, koně a králíky	5 000
	Kukuřice a kukuřičná vedlejší krmiva	60 000
Ochratoxin	Kompletní doplňková krmiva pro prasata	50
	Obiloviny a krmiva z obilovin	250

1.2.2 Možnosti dekontaminace mykotoxinů v krmivech

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

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

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

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

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

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

1.3 Plazmové technologie

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

Pojem plazma pro ionizovaný plyn poprvé použil v roce 1928 americký nositel Nobelovy ceny Irwing Langmuir (1881–1957). Plazma je tvořeno především elektricky nabitými částicemi, (elektrony a ionty), neutrálními částicemi, částicemi v excitovaných stavech a volnými radikály. Plazma musí obsahovat dostatečné množství volných nosičů elektrického náboje, vykazovat kolektivní chování (reaguje na elektrická a magnetická pole

jako celek) a být kvazineutrální, tzn. v makroskopickém objemu je stejný počet kladných a záporných nábojů (Kulhánek, 2011). Ne každý ionizovaný plyn můžeme tedy rovnou nazývat plazmatem.

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

Pro potřeby této dizertační práce je nejvýznamnější plazmový výboj generovaný elektrickým polem ve vzduchu za atmosférického tlaku. Velmi rychlé elektrony vznikající v plazmatu způsobují kolize s neutrálními částicemi vzduchu. Při těchto srážkách vznikají reaktivní částice – volné radikály a disociované molekuly, reaktivní kyslík, atomární kyslík (O), ozón (O₃), hydroxylové radikály (OH•), různé sloučeniny dusíku (N₂, NO, NO₂), dále samozřejmě také ionty kyslíku, dusíku a dalších složek plynu a v neposlední řadě také vznikají elektrony. Koncentrace těchto reaktivních částic v pracovním plynu závisí na jeho složení, změnou ve složení pracovního plynu (použitím příměsí) lze velmi dobře upravit parametry plazmového výboje pro následné využití v mnoha technických aplikacích, jako jsou například modifikace povrchových vlastností materiálů (Penkov et al., 2015), leptání plazmatem nebo chemické úpravy materiálů (Špatenka et al., 1999).

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

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

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

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

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

— **vstupní chemické podmínky**

složení pracovního plynu,

— **tlak**

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

— **struktura elektromagnetického pole**

většinou vystavení externímu elektromagnetickému poli – využití k urychlování částic,

— **parametry systému a výboje**

počet, tvar a rozmístění elektrod, průtok pracovního plynu.

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

Kapitola 2

Cíl a hypotézy práce

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

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

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

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

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

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

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

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

Výzkumné hypotézy

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

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

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

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

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

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

Kapitola 3

Materiál

3.1 Plazmová aparatura

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

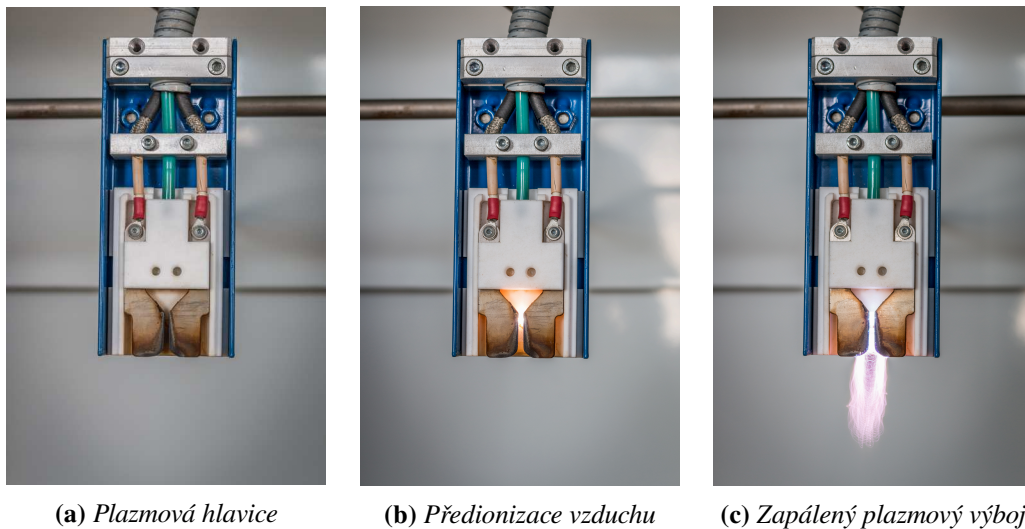


Obrázek 3.1: Systém pro generování plazmového výboje typu Gliding Arc

Vysokonapěťový zdroj Vysokonapěťový zdroj GVN1k-2011 firmy RADAN, s.r.o. obsahuje vysokonapěťový transformátor (10 kV) pracující s frekvencí 50 Hz. Přímo v napájecím zdroji je integrován rotametr Omega FL-2008, kterým se nastavuje požadovaný průtok pracovního plynu v plazmové trysce. Tento rotametr je schopen regulace průtoku v rozsahu 10–100 SCFH (Standard Cubic Feet per Hour). Průtok 35,3 SCFH odpovídá hodnotě 1 Nm³/h.

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

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



(a) Plazmová hlavice

(b) Předionizace vzduchu

(c) Zapálený plazmový výboj

Obrázek 3.2: Fotografie plazmové hlavice

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



Obrázek 3.3: Míchací zařízení

Tabulka 3.1: Vybrané parametry experimentálního zařízení

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

3.2 Použitý biologický materiál

Semena

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

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

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

Houby

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

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

Mykotoxiny

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

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

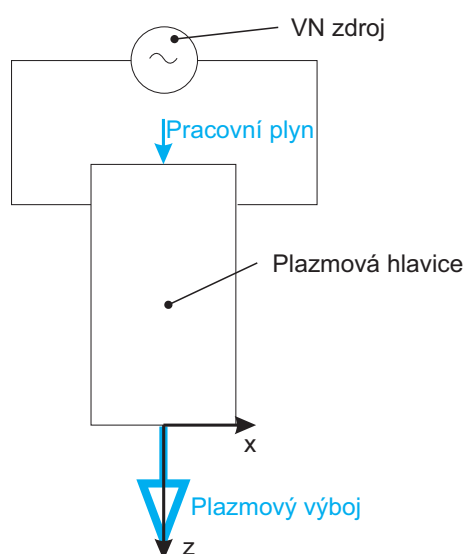
Kapitola 4

Vybrané výsledky

4.1 Charakterizace plazmové aparatury

4.1.1 Distribuce teplotního pole

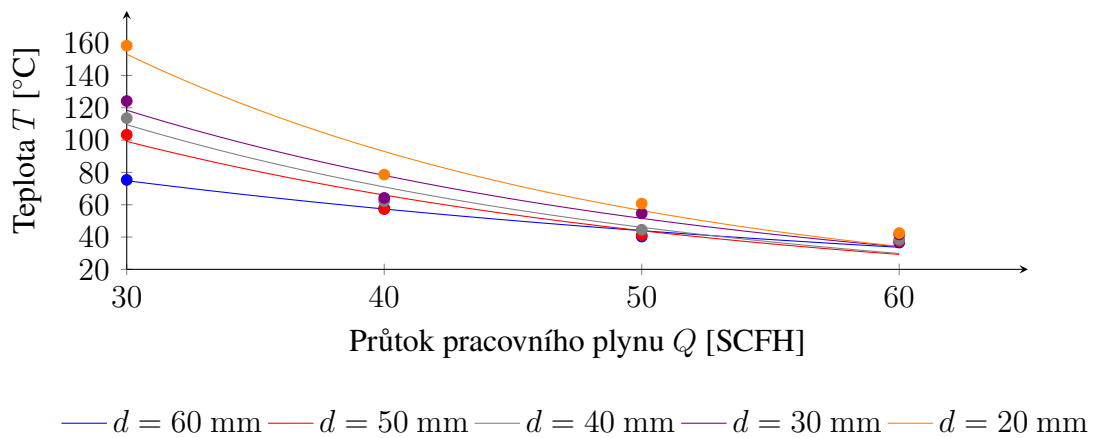
Teplota pracovního plynu hraje v procesu ošetřování biologických materiálů velice důležitou roli a zejména při vyšších teplotách může docházet k nežádoucím změnám ve složení biologického materiálu. Distribuce teplotního pole pracovního plynu byla měřena dataloggerem OM-EL-USB-TC-LCD se sondou Greisinger GTF 300. Sonda byla umístěna v podélné ose proudění pracovního plynu (osa z; viz obrázek 4.1) ve vzdálenosti 20–60 mm od spodní hrany plazmové hlavice (tj. souřadnice $z = 0$ odpovídá okraji krytu plazmové hlavice). Teplota byla stanovena v různých vzdálenostech s krokem 10 mm. Průtok pracovního plynu byl volen v rozmezí od 30 do 60 SCFH v krocích po 10 SCFH. Každou sekundu byla zaznamenána aktuální teplota s přesností 0,5 °C. Vývoj teploty v čase byl pro každou variantu sledován po dobu 5 minut. Z naměřených dat byla stanovena teplotní závislost na průtoku pracovního plynu a na vzdálenosti od spodní hrany plazmové hlavice.



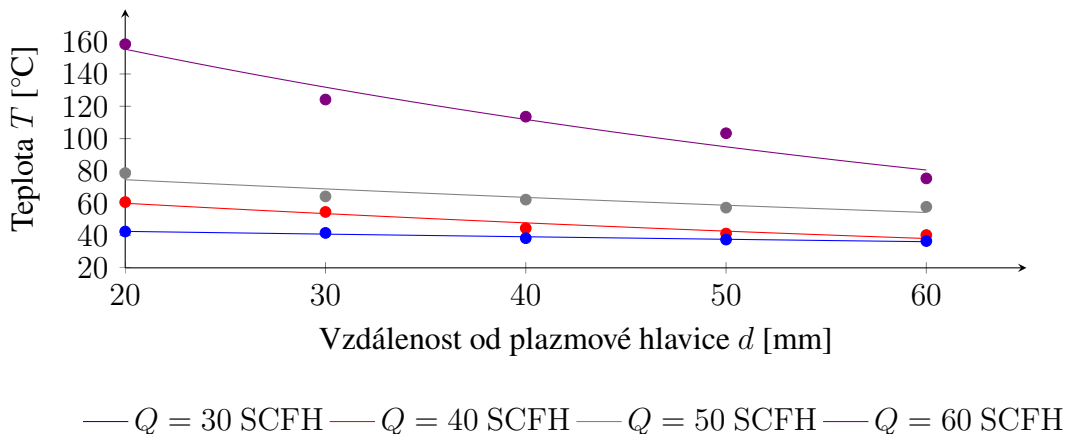
Obrázek 4.1: Umístění teplotní sondy

Typické rozložení teplot je zobrazeno na obrázku 4.2 respektive 4.3. Obrázek 4.2 znázorňuje závislost teploty vzduchu (pracovního plynu) na jeho průtoku a obrázek 4.3 ukazuje závislost teploty pracovního plynu na vzdálenosti teplotní sondy od hrany plazmové hlavice. Dle očekávání se teplota snižuje se vzrůstajícím průtokem pracovního plynu a se vzrůstající vzdáleností. Tento pokles je výrazný hlavně u nižších průtoků plynu, u vyšších průtoků je mnohem menší. Gradient teploty je větší v menší vzdálenosti od krytu trysky než ve větší vzdálenosti – teplota se vzrůstající vzdáleností od plazmové hlavice intenzivně klesá.

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



Obrázek 4.2: Závislost teploty pracovního plynu na jeho průtoku pro různé vzdálenosti od plazmové trysky

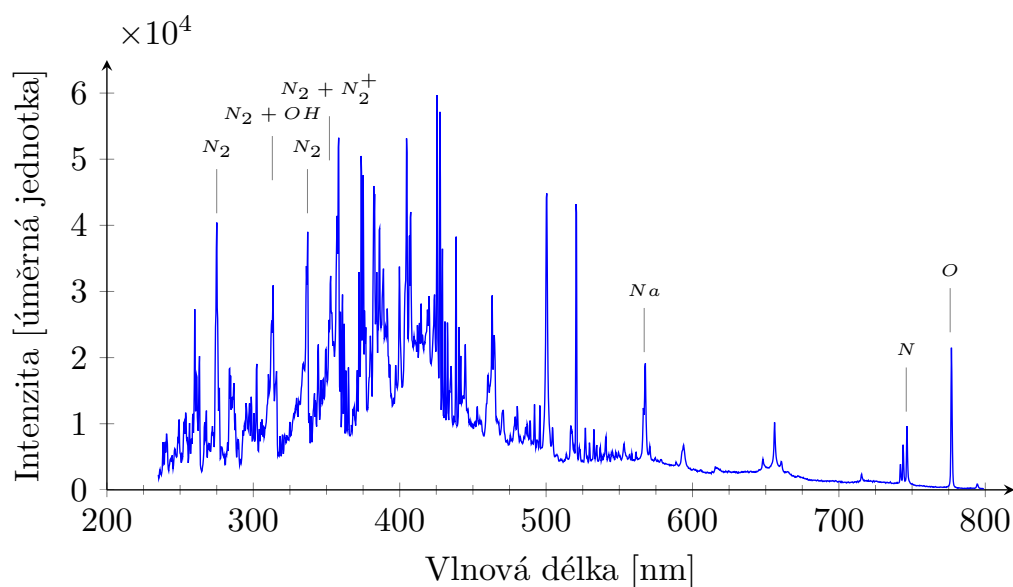


Obrázek 4.3: Závislost teploty pracovního plynu na vzdálenosti od plazmové hlavice pro různé průtoky

4.1.2 Měření spektrálních charakteristik plazmového výboje typu Gliding Arc

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

K měření spektrálních charakteristik byl využit spektroskop AvaSpec-ULS2048-USB2 vyrobený firmou Avantes BV. K zaznamenání dat byl použit dodávaný program AvaSoft ve verzi 8. Čidlo spektroskopu bylo umístěno ve vzdálenosti 10 cm od hrany plazmové hlavice a nacházelo se na svislé ose z (viz obrázek 4.1) průtoku pracovního plynu.



Obrázek 4.4: Spektrální charakteristika výboje Gliding Arc

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

4.2 Vliv plazmatu na vybrané výživové parametry

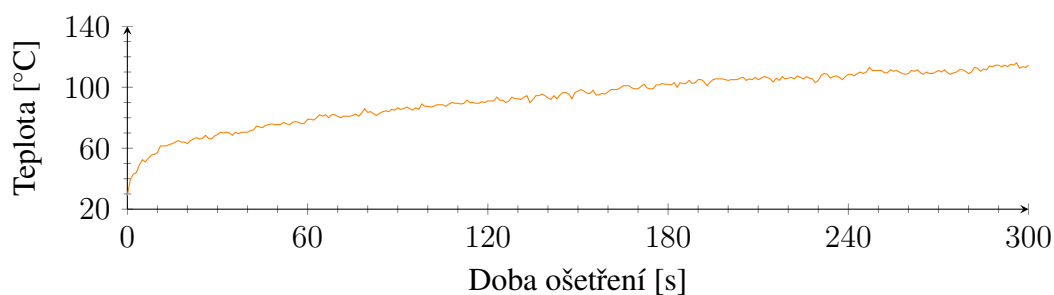
Cílem následujícího experimentu bylo ověřit, zda v důsledku působení plazmového výboje dochází ke změně ve výživových parametrech vybraných zemědělských plodin. Experiment vychází z práce Kříž et al. (2014), který testoval vliv plazmatu na plodinu *Triticale*. Vzhledem k tomu, že k této problematice již byla dostupná některá data a s ohledem na omezené finanční možnosti, byl test proveden pouze na jednom vzorku. Parametry ošetření jsou uvedeny v tabulce 4.1. Výsledky získané pro ošetřený a neošetřený vzorek jsou shrnuty v následujících grafech.

Tabulka 4.1: Parametry ošetření vzorku

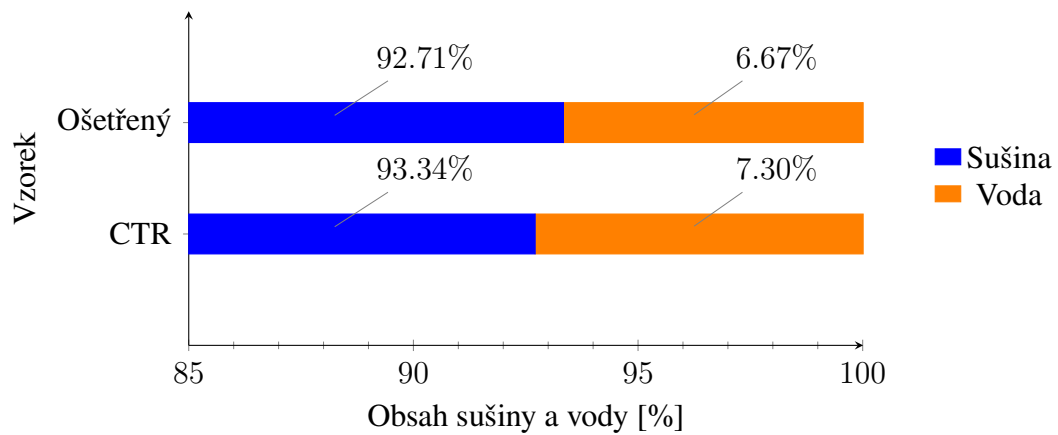
Parametr	Hodnota
Vzdálenost od plazmové hlavice	60 mm
Doba ošetření	300 s
Průtok pracovního plynu	30 SCFH
Otáčky míchacího zařízení	1 s ⁻¹
Hmotnost vzorku	100 g

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

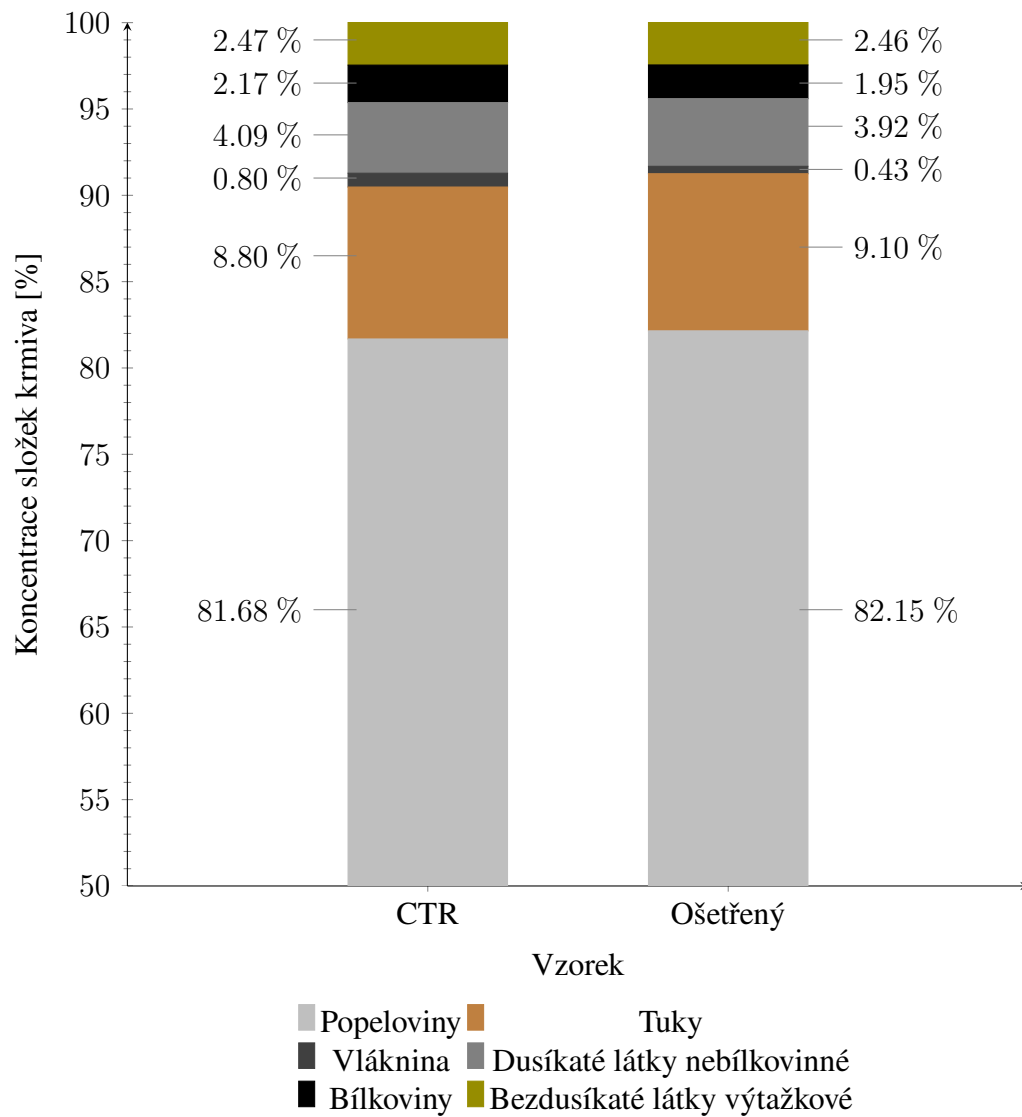
Po ošetření byl vzorek znovu zvážen, jelikož v průběhu ošetření je dosahováno vyšších teplot pracovního plynu (viz obrázek 4.5) a je tudíž možno očekávat změnu hmotnosti vzorku v důsledku vysoušení semen. U ošetřených vzorků byla stanovena hmotnost 98,6 g, tj. úbytek hmotnosti činil 1,4 g. Již z této hodnoty lze dělat závěry o výsledcích hodnoty sušiny v krmivech. Obsah sušiny by měl s časem ošetření plazmatem vzrůstat.



Obrázek 4.5: Teplota uvnitř míchacího zařízení v závislosti na době ošetření



Obrázek 4.6: Poměr obsahu sušiny a vody ve vzorcích



Obrázek 4.7: Koncentrace vybraných složek krmiva ve vzorcích

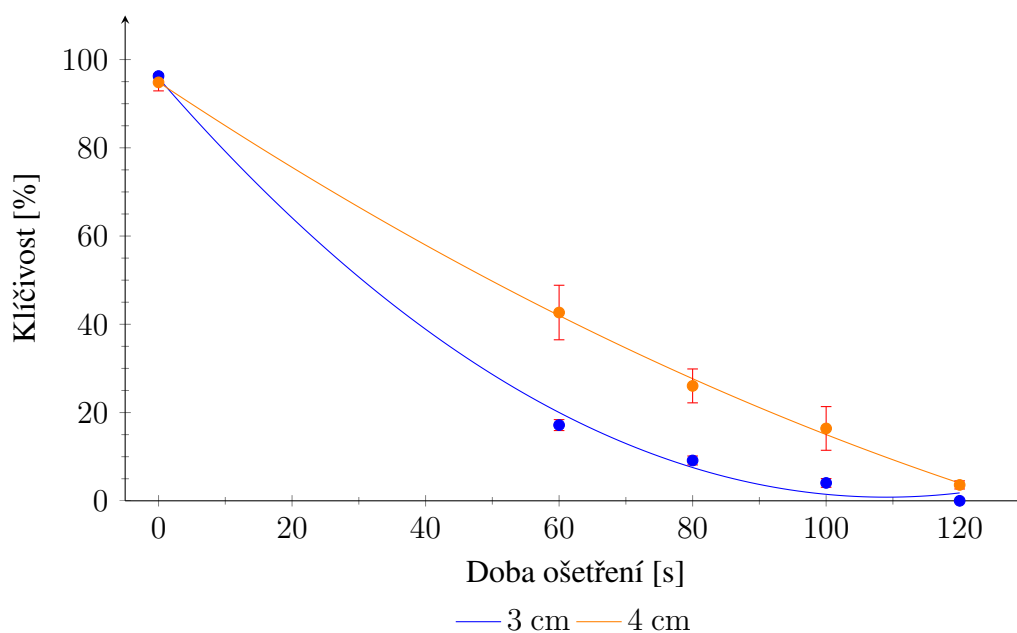
4.3 Vliv plazmatu na modelovou houbu *T. virens*

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

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

4.3.1 Vliv vzdálenosti plazmové hlavičky od myceliálního disku

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



Obrázek 4.8: Klíčivost spor houby *T. virens* po 24 hodinách po vystavení plazmatu

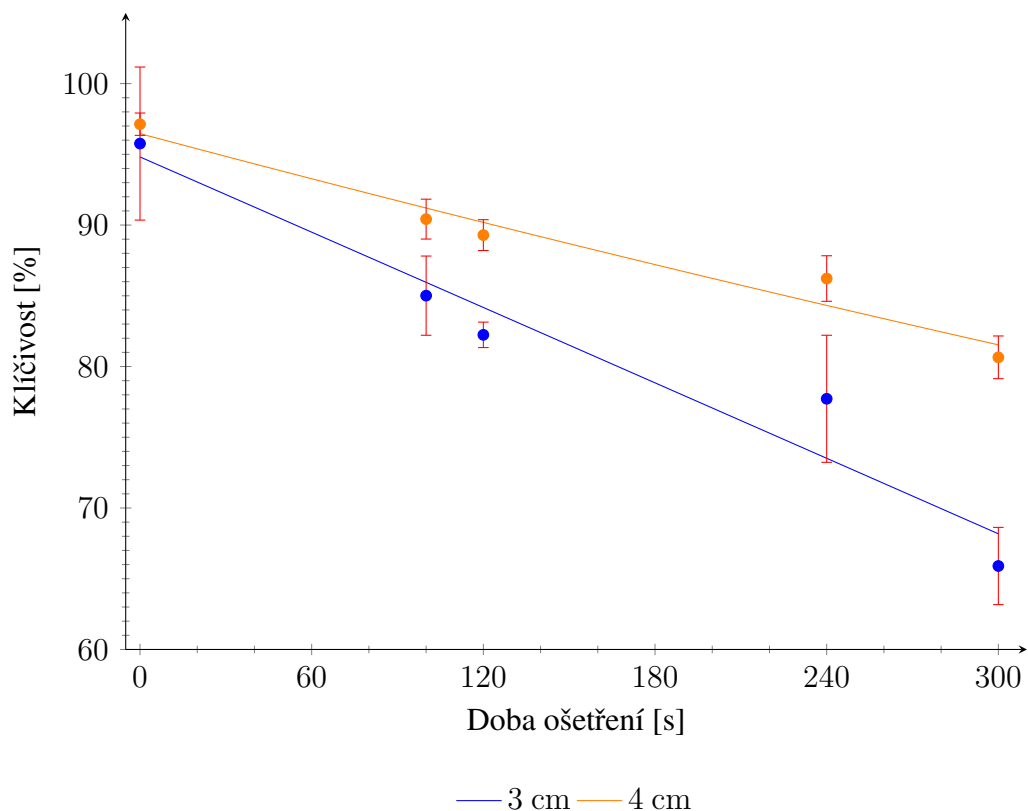
Tabulka 4.2: Klíčivost spor houby *T. vires* po 24 hodinách po vystavení plazmatu a maximální teplota pracovního plynu

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

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

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

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



Obrázek 4.9: Klíčivost spor houby *T. virens* po vystavení UV záření

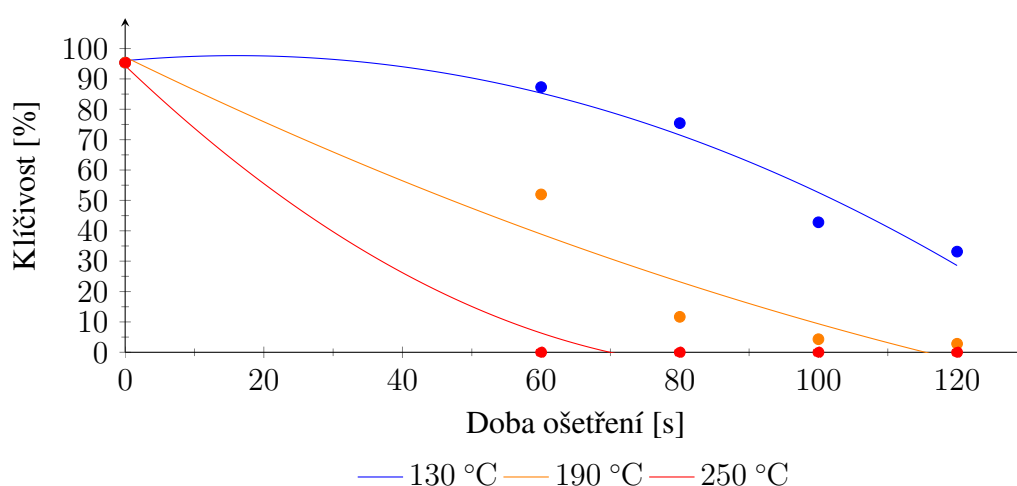
Tabulka 4.3: Klíčivost spor houby *T. vires* po vystavení UV záření a maximální teplota pracovního plynu

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

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

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

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



Obrázek 4.10: Klíčivost spor houby *T. virens* po vystavení teplému vzduchu

Tabulka 4.4: Klíčivost spor houby *T. virens* po vystavení horkému vzduchu [%]

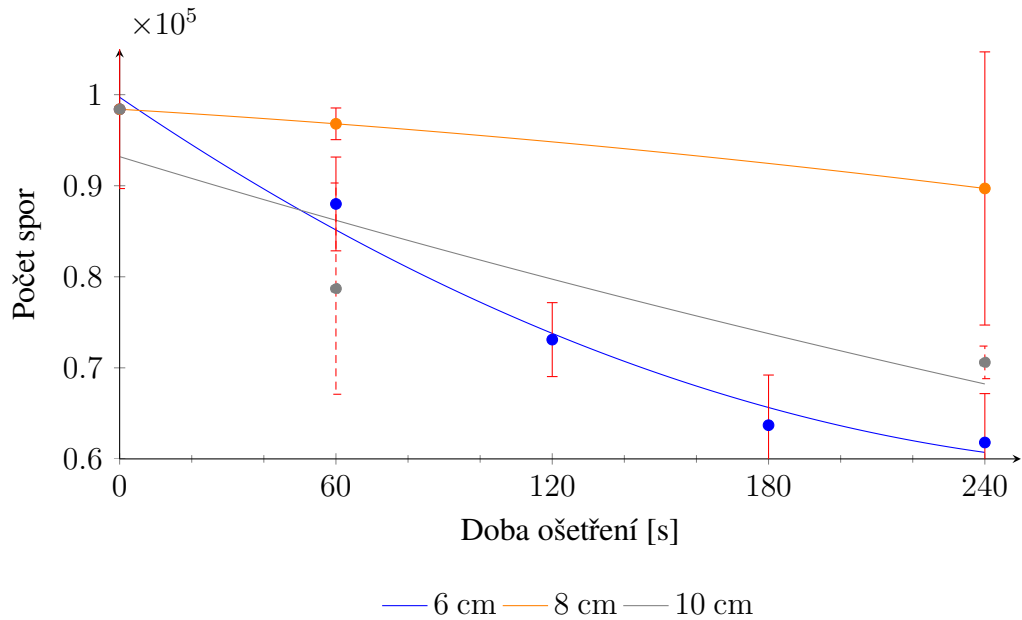
Doba ošetření [s]	Teplota teplému vzduchu		
	130 °C	190 °C	250 °C
0	95,35 ± 0,00	95,35 ± 0,00	95,35 ± 0,00
60	87,30 ± 0,51	51,97 ± 2,28	0,00 ± 0,00
80	75,44 ± 6,74	11,67 ± 0,25	0,00 ± 0,00
100	42,80 ± 0,40	4,31 ± 4,31	0,00 ± 0,00
120	33,14 ± 0,32	2,81 ± 0,44	0,00 ± 0,00

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

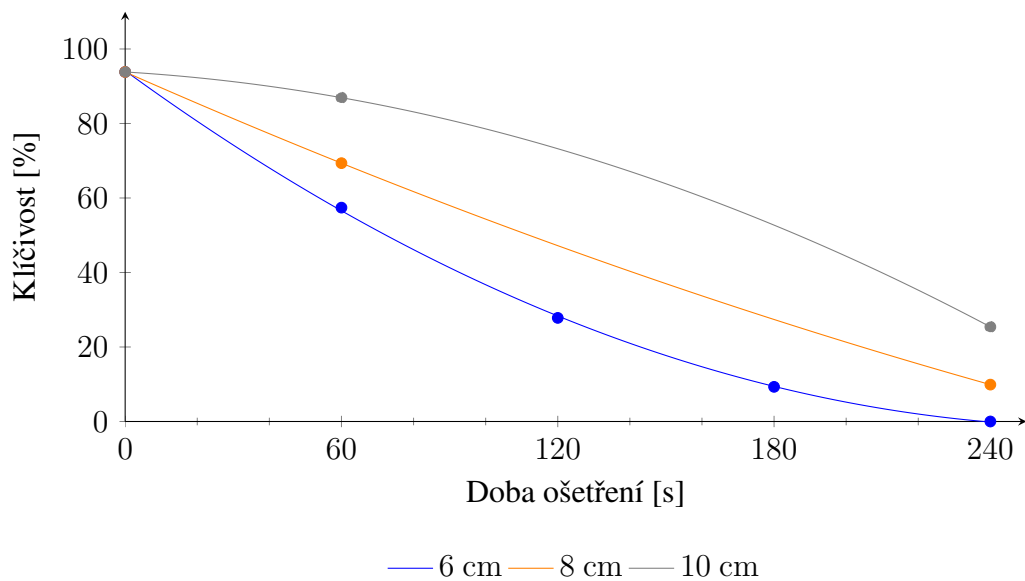
V předchozích experimentech byl prokázán vliv plazmatu na houbu *Trichoderma virens* umístěnou na myceliárním disku. Pro přiblížení se co nejvíce reálným podmínkám, proběhla umělá infekce semen pšenice jarní odrůdy Tercie za účelem ověření degradace plísni i na živém biologickém materiálu. Infekce byla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

Tabulka 4.5: Klíčivost a počet spor houby *T. virens* na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu

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



Obrázek 4.11: Počet spor houby *T. virens* na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu



Obrázek 4.12: Klíčivost spor houby *T. virens* na obilkách pšenice jarní po vystavení plazmatu

4.4 Vliv plazmatu na mykotoxiny

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

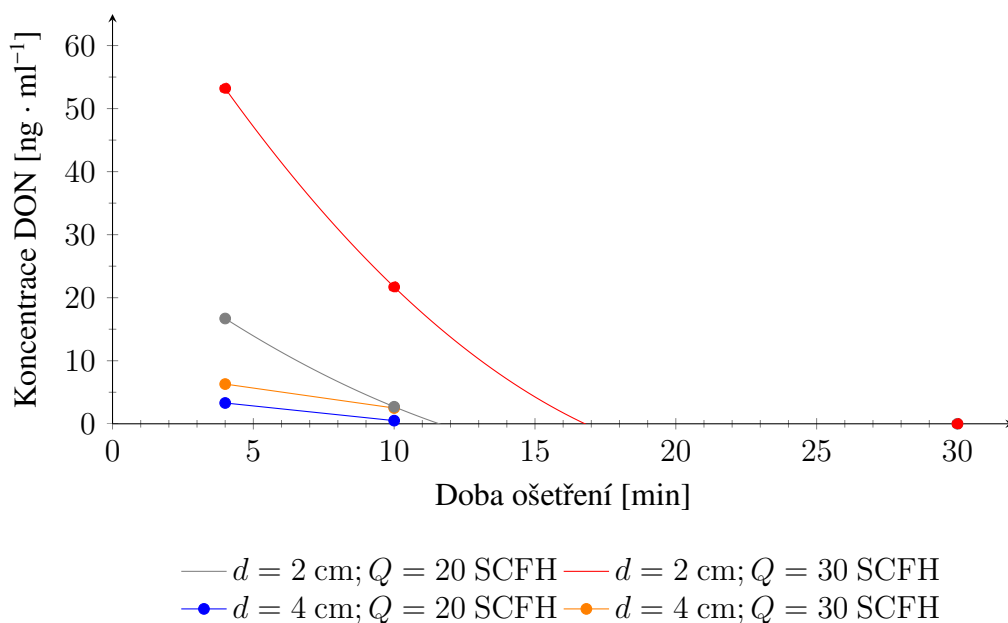
Pro určení a kvantifikaci DON a DON-3-Glc bylo využito přístroje HPLC společnosti Finnigan Surveyor s iontovou pastí LCQ Advantage společnosti Thermo-Fisher (USA). Chromatografické separace bylo dosaženo v koloně 4μ Synergi Hydro RP 80A HPLC ($3,0 \times 150$ mm, velikost částic $4,0$ mm) vybavené ochranou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

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

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

Tabulka 4.6: Koncentrace a úbytek DON na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

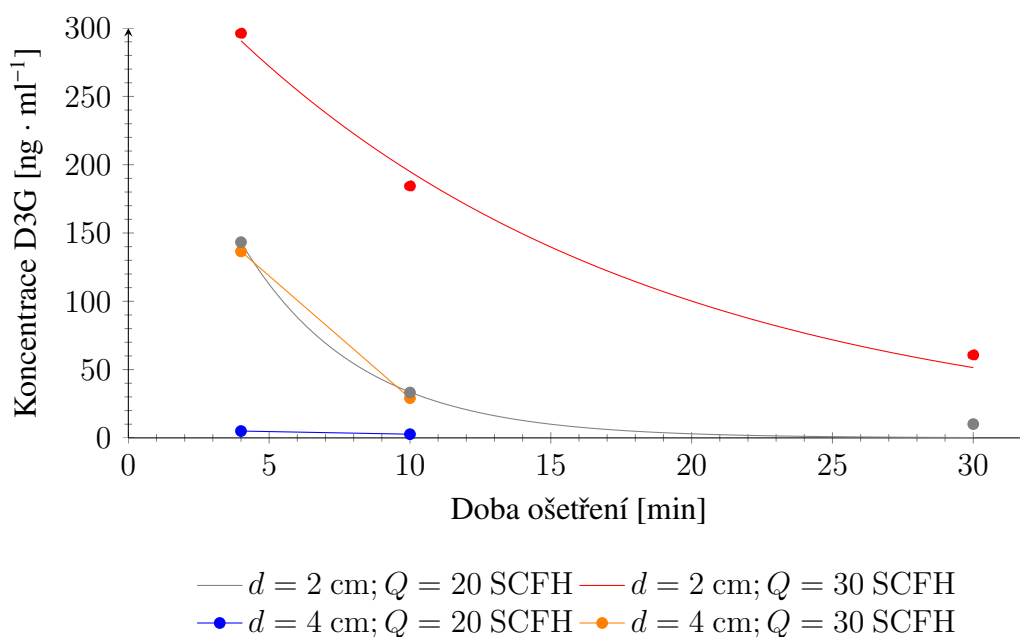
#	Vzdálenost od hrany pl. hlavice	Průtok prac. plynu	Doba ošetření	DON	Úbytek
	[cm]	[SCFH]	[min]	[ng · ml ⁻¹]	[%]
CTR	–	–	–	1 000,0	0,00
01	2	20	4	3,3	99,67
02		30		6,3	99,37
03		20	10	0,5	99,95
04		30		2,5	99,75
05	4	20	4	16,7	98,33
06		30		53,2	94,68
07		20	10	2,7	99,73
08		30		21,7	97,83
09		30	20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



Obrázek 4.13: Koncentrace čistého DON na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

Tabulka 4.7: Koncentrace a úbytek D3G na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

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



Obrázek 4.14: Koncentrace čistého D3G na laboratorních substrátech po vystavení plazmatu

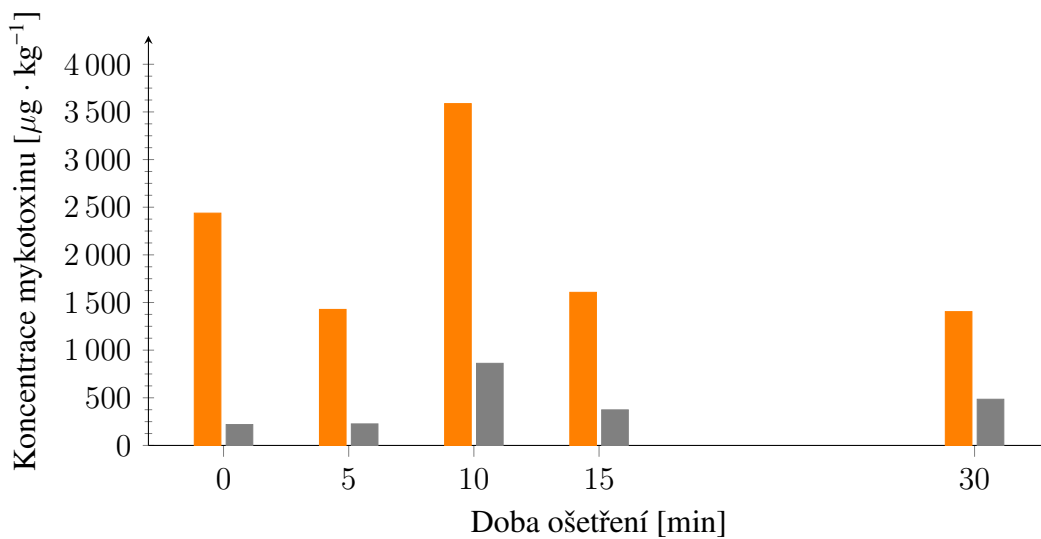
4.4.2 Vliv plazmového výboje na obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici jarní

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

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

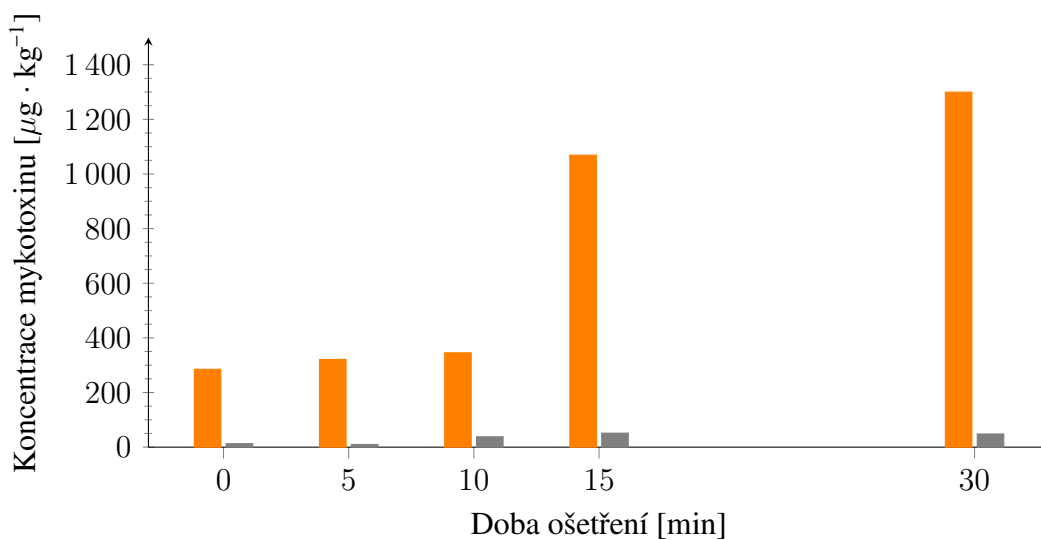
Tabulka 4.8: Koncentrace mykotoxinů v ječmeni a pšenici po vystavení plazmatu

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



■ DON ■ D3G

(a) Ječmen



■ DON ■ D3G

(b) Pšenice

Obrázek 4.15: Obsah mykotoxinů v ječmeni a pšenici

Závěr

V práci byla provedena charakterizace použitého zdroje nízkoteplotního plazmatu typu Gliding Arc. Na základě jednotlivých dílčích analýz byly navrženy procesní parametry nezbytné pro vývoj technického řešení pro ošetření krmiv. Následně byly provedeny experimenty ověřující vliv plazmového výboje na nutriční hodnotu zrnin, modelovou plíseň *Trichoderma virens* a v posledním kroku na mykotoxin Deoxynivalenol a jeho konjugát Deoxynivalenol-3-Glukosid. Na základě výsledků prezentovaných v dizertační práci je možno konstatovat:

- platnost hypotézy 1 až 4 byla provedenými experimenty **potvrzena**,
- platnost hypotéza 5 byla provedenými experimenty **zamítnuta**.

V rámci práce byl také zkonstruován funkční vzorek laboratorního zařízení pro ošetření krmiv infikovaných houbovými patogeny, který pracuje v kontinuálním režimu.

Plazmový výboj typu Gliding Arc má potenciál k využití v technické praxi, pro zlepšení kvality krmiv určených pro hospodářská zvířata. Je potvrzen pozitivní vliv na snižování spor patogenních hub, což vede k snížení rizika možné kontaminace krmiv mykotoxiny, zkázy potravin a krmiv. Spolu s tím je sníženo i riziko nákazy hospodářských zvířat po zkrmení napadenými krmivy. Avšak v otázce vlivu plazmatického výboje na mykotoxiny nacházející se na živém biologickém materiálu je nutno provést mnoho dalších experimentů.

Seznam literatury

- Amini, M. a Ghoranneviss, M. (2016). Effects of cold plasma treatment on antioxidants activity, phenolic contents and shelf life of fresh and dried walnut (*Juglans regia* L.) cultivars during storage. *{LWT} - Food Science and Technology*, 73:178–184.
- Bartoš, P., Špatenka, P., a Volfová, L. (2009). Deposition of TiO₂-based layer on textile substrate: Theoretical and experimental study. *Plasma Processes and Polymers*, 6(SUPPL. 1):S897–S901.
- Běláková, S., Benešová, K., Čáslavský, J., Svoboda, Z., a Mikulíková, R. (2014). The occurrence of the selected *fusarium* mycotoxins in Czech malting barley. *Food Control*, 37:93–98.
- Bermúdez-Aguirre, D., Wemlinger, E., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G., a Garcia-Perez, M. (2013). Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. *Food Control*, 34(1):149–157.
- Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., a van der Mullen, J. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57(4):609–658.
- Bosch, L., Pfohl, K., Avramidis, G., Wieneke, S., Viölm, W., a P., K. (2017). Plasma based degradation of mycotoxins produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* species. *Toxins*, 9(3):97.
- Chalupáčová, M. (2002). Prevence plísňových onemocnění. [online]. [cit. 2015-09-15], Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/czpz/edice/plne_znani/prevence_plisni.pdf.
- Cheeke, P. R. (1998). *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*, chapter Mycotoxins in cereal grains and supplements, pages 87–136. Interstate Publishers, Inc., Danville, IL. ISBN: 978-0813431284.
- Chen, H. H., Chang, H. C., Chen, Y. K., Hung, C. L., Lin, S. Y., a Chen, Y. S. (2016). An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma. *Food Chemistry*, 191:120–127. *Advances in Rice Chemistry, Nutrition and Technology*.
- Doležal, P. (2012). *Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat*. Petr Baštan, Olomouc. ISBN: 978-80-87091-33-3.
- Eaton, D., Beima, K., Bammler, T., Riley, R. T., a Voss, K. A. (2010). Hepatotoxic mycotoxins. *Comprehensive Toxicology*, 9:527–569.

- Elen, O., Abrahamsen, U., a Brodal, G. (2002). The response of *Fusarium spp.* on different growing systems of barley. In *Proceedings of the Conference: Sustainable Systems of Cereal Crop Protection Against Fungal Diseases as the way of Reduction of Toxin Occurrence in Food Webs.*, pages 213–217, Kroměříž, Czech Republic.
- Fassatiová, O. (1979). *Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii*. SNTL, Praha. Řada potravinářské literatury.
- Flannigan, B. a Healy, R. E. (1983). The microflora of barleys accepted and rejected for malting. *Journal of the Institute of Brewing*, 89:341–343.
- Flannigan, B., Okagbue, R., Khalid, R., a Teoh, C. (1982). Mould flora of malt in production and storage. *Brewing & Distilling International*, 12:31–37.
- Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A. B., Vasilets, V. N., a Fridman, A. (2008). Applied plasma medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5(6):503–533.
- Henriksen, B. a Elen, O. (2005). Natural *Fusarium* grain infection level in wheat, barley and oat after early application of fungicides and herbicides. *Journal of Phytopathology*, 153(4):214–220.
- ICMSF (1998). Cereals and cereal products. In *Microorganism in Foods*, pages 313–355. Springer, Boston, MA. ISBN 978-1-4613-7422-0.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., a Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In Butt, T. M. and Jackson, C. a Magan, N., editors, *Fungi as biocontrol agents -progress, problems and potential*, pages 23–69. CAB International, Wallingford, UK.
- Ingr, I. (2007). *Základy konzervace potravin*. MZLU v Brně, Brno, 3rd edition. ISBN 978-80-7375-110-4.
- Johannessen, G. S. a Torp, M. (2005). Improving the safety of organic vegetables. In Jongen, W., editor, *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pages 331–348. Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-956-7.
- Kříž, P., Olšan, P., Havelka, Z., Horáková, M., Bartoš, P., Vazdová, P., Syamkrishna, B., a Špatenka, P. (2014). Seed treatment and water purification by the synergical effect of gliding arc plasma and photocatalytic film. In *2014 International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM)*, pages 1042–1046.
- Kalina, T. a Váňa, J. (2005). *Sinice, řasy, houby, mechorošty a podobné organismy v současné biologii*. Univerzita Karlova, Praha. ISBN: 80-246-1036-1.
- Konvalina, P., Štěrba, Z., Vlášek, O., Moudrý, J., J., Capouchová, I., a Stehno, Z. (2016). *Fusarium spp.* occurrence in grains of ancient wheat species. *Romanian Agricultural Research*, 33.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., a Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6):1595–1612.

- Kříž, P., Bartoš, P., Havelka, Z., Kadlec, J., Olšan, P., Špatenka, P., a Dienstbier, M. (2015). Influence of plasma treatment in open air on mycotoxin content and grain nutrients. *Plasma Medicine*, 5(2-4):145–158.
- Kulhánek, P. (2011). *Úvod do teorie plazmatu*. AGA, Praha, 1st edition. ISBN: 978-80-904582-2-2.
- Kulovaná, E., Kummer, V., a Faldíková, L. (23.1.2002). Účinky mykotoxinů na zdraví a reprodukci hospodářských zvířat. [online]. [cit. 2019-04-09], Dostupné z: <https://www.naschov.cz/ucinky-mykotoxinu-na-zdravi-a-reprodukci-hospodarskych-zvirat/>.
- Leipold, F., Schultz-Jensen, N., Kusano, Y., Bindslev, H., a Jacobsen, T. (2011). Decontamination of objects in a sealed container by means of atmospheric pressure plasmas. *Food Control*, 22(8):1296–1301.
- Magan, N. a Olsen, N. (2004). *Mycotoxin in food: Detection and control*. Woodhead Publishing limited, Cambridge, England. ISBN: 978-0849325579.
- Mallman, C. A. a Dilkin, P. (2011). *Mycotoxins and mycotoxicosis in swine secure*. Special Nutrients, inc. [cit. 2017-20-01], Dostupné z: <http://www.specialnutrients.com/pdf/book/Mycotoxins%20and%20Mycotxicosis%20in%20Swine%20Secure.pdf>.
- Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F. J., a Irene, N. (2012). Germination induced the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chemistry*, 131(1):274–279.
- McKane, J. a Kandel, J. (1996). *Microbiology essentials and applications*. McGraw-Hill Companies, USA, California, 2nd edition. ISBN: 978-0070451544.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.-C., Pelletier, J., Philip, N., a Saoudi, B. (2009). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 74(3):349–358.
- Moreau, M., Orange, N., a Feuilloley, M. (2008). Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances*, 26(6):610–617.
- Pankaj, S., Bueno-Ferrer, C., Misra, N., Milosavljević, V., O'Donnell, C., Bourke, P., Keener, K., a Cullen, P. (2014). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35(1):5–17.
- Park, B. J., Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, I.H. and Lee, M., Han, D., Chung, K., Hyun, S. O., a Park, J. (2007). Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface & Coatings Technology*, 201:5733–5737.
- Pazderů, K., Vepříková, Z., Capouchová, I., Konvalina, P., Prokinová, E., Janovská, D., Škeříková, A., a Honsová, H. (2016). Changes in the content of various *Fusarium* mycotoxins forms in germinating winter wheat and spring barley kernels. *Plant, Soil and Environment*, 62(1):42–46.

- Penkov, O. V., Khadem, M., Lim, W.-S., a Kim, D.-E. (2015). A review of recent applications of atmospheric pressure plasma jets for materials processing. *Journal of Coatings Technology and Research*, 12(2):225–235.
- Rada, V. a Havlík, J. (2012). *Transformace mykotoxinů střevními mikroorganismy*. Vědecký výbor výživy zvířat, Praha.
- Ramos, B., Miller, F., Brandão, T., Teixeira, P., a Silva, C. (2013). Fresh fruits and vegetables - An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20:1–15.
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B., a Pestka, J. J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48(1):1–34.
- Schmiedt, L. (2006). Úvod do fyziky plazmatu. [online]. [cit. 2016-06-09], Dostupné z: <http://atrey.karlin.mff.cuni.cz/řmarble/d/?p=0>.
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., a Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*, 33(6):1108–1119.
- Šerá, B., Gajdová, I., Šerý, M., a Špatenka, P. (2013). New physicochemical treatment method of poppy seeds for agriculture and food industries. *Plasma Science and Technology*, 15(9):935–938.
- Šerá, B., Špatenka, P., Šerý, M., Vrchotová, N., a Hrušková, I. (2010). Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 38(10 PART 2):2963–2968.
- Špatenka, P., Endres, H.-J., Krumeich, J., a Cook, R. (1999). Process control of plasma polymerization in a large industrial reactor. *Surface and Coatings Technology*, 116–119:1228–1232.
- Speijers, G. J. A. a Speijers, M. H. M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 152(1):91–98.
- Stapelmann, K., Kylián, O., Denis, B., a Rossi, F. (2008). On the application of inductively coupled plasma discharges sustained in Ar/O₂/N₂ ternary mixture for sterilization and decontamination of medical instruments. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41(19):192005.
- Suchý, P. a Herzig, I. (2005). *Plísňe a mykotoxiny - prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., a Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90(1):135–159.
- Velíšek, J. a Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin II*. Osis, Havlíčkův Brod. ISBN: 978-80-86659-16-9.

- Wang, J., Zhuang, H., Hinton, A., J., a Zhang, J. (2016). Influence of in-package cold plasma treatment on microbiological shelf life and appearance of fresh chicken breast fillets. *Food Microbiology*, 60:142–146.
- Yang, B., Chen, J., Yu, Q., Li, H., Lin, M., Mustapha, A., Hong, L., a Wang, Y. (2011). Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *Journal of Dentistry*, 39(1):48–56.
- Yoshida, S., Hagiwara, K., Hasebe, T., a Hotta, A. (2013). Surface modification of polymers by plasma treatments for the enhancement of biocompatibility and controlled drug release. *Surface and Coatings Technology*, 233:99–107.
- Yun, H., Kim, B., Jung, S., Kruk, Z. A., Kim, D. B., Choe, W., a Jo, C. (2010). Inactivation of *Listeria monocytogenes* inoculated on disposable plastic tray, aluminum foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food Control*, 21(8):1182–1186.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2):129–144.
- Zeman, L., Doležal, P., a Horký, P. (2015). Mykotoxiny u prasat. In *Krmivářství*, volume 3, pages 13–15. Profi Press s. r. o., Praha.