

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mykotoxiny a jejich vliv na adhezi vybraných  
probiotických kmenů bakterií za podmínek *in vitro*  
kultivace na buněčných liniích**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Alona Sudakova  
Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mykotoxiny a jejich vliv na adhezi vybraných probiotických kmenů bakterií za podmínek *in vitro* kultivace na buněčných liniích" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. dubna 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala a Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost, pomoc při práci v laboratoři a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky.

# Mykotoxiny a jejich vliv na adhezi vybraných probiotických kmenů bakterií za podmínek *in vitro* kultivace na buněčných liniích

## Souhrn

Mykotoxiny představují nebezpečí pro lidské zdraví, jelikož se stále vyskytují v potravinách a krmivech. Do organismu člověka se dostávají přes vdechovaný vzduch, pokožku, ale nejčastěji se dostávají s potravinami přes gastrointestinální trakt, kde přichází do styku se střevní mikrobiotou. Probiotické mikroorganismy, které jsou součástí mikrobioty, mají velký význam pro zdraví člověka: stimulují a regulují imunitní reakce, nepřímo regulují metabolismus hostitele a ovlivňují nervový systém. Pro dosažení zdravotního přínosu je potřeba, aby probiotika kolonizovala gastrointestinální trakt, a proto adheze, tj. schopnost přilnout, je považována za klíčovou vlastností probiotik. Je známo, že po styku probiotik s mykotoxiny dochází ke změně adhezenčních vlastností. Existuje ale málo dostupných informací o tom, jak interakce mykotoxinů a probiotik probíhá bezprostředně v trávicím traktu.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat a zhodnotit vliv mykotoxinu rodu *Alternaria*, konkrétně alternariol (AOH) a alternariol monomethyl ether (AME), na adhezenční vlastnosti vybraných kmenů bakterií rodu *Lactobacillus*, a to *L. gasseri* a *L. plantarum*. K testování adheze byly využity *in vitro* modely Caco-2 a HT29, kde byly přidány vzorky mykotoxinů v koncentraci 10 µg/ml a 5 µg/ml společně s fluorescenčně značenými testovanými bakteriálními kmeny.

Naměřené hodnoty adheze se snížily téměř ve všech případech a pohybovaly se v rozmezí 61,02 % až 134,51 %. Ve dvou případech došlo ke zvýšení hodnot adheze, a to u *L. gasseri* s mykotoxinem AME v koncentraci 10 µg/ml o 16,17 % a s AME v koncentraci 5 µg/ml o 34,51 % v porovnání s kontrolou na Caco-2 buněčných liniích. Statisticky významné rozdíly s kontrolou byly pozorovány u *L. gasseri* na Caco-2 linii s přidáním AOH v koncentraci 10 µg/ml, *L. gasseri* na HT29 s přidáním AME v koncentraci 5 µg/ml a u *L. plantarum* na HT29 s AOH v koncentraci 10 µg/ml a AME ve stejné koncentraci.

Z dosažených výsledků lze tvrdit, že stanovená hypotéza byla potvrzena, a mykotoxiny rodu *Alternaria* (AOH a AME) mají vliv na adhezenční vlastnosti probiotických mikroorganismů, v našem případě *L. gasseri* a *L. plantarum*.

**Klíčová slova:** *Alternaria* spp; bakterie mléčného kvašení; potraviny; *in vitro* intestinální model; fluorescence

# **Mycotoxins and their effect on the adhesion of selected probiotic strains of bacteria under *in vitro* cell line culture conditions**

## **Summary**

Mycotoxins pose a danger to human health due to their occurrence in food and feed. They enter the human body through inhaled air, the skin, but most often they enter with food through the gastrointestinal tract, where they come into a contact with the intestinal microbiota. Probiotic microorganisms that are part of the microbiota play an important role in human health: they stimulate and regulate immune responses, indirectly regulate the host's metabolism and influence the nervous system. The key property of probiotics is adhesion, i.e. the ability to adhere, which enables long-term colonization of the GIT and subsequent health benefits. It is known that after contact of probiotics with mycotoxins, adherence properties change. However, there is little available information on how mycotoxins and probiotics interact directly in the digestive tract.

The aim of this thesis was to test and evaluate the effect of the mycotoxin of the genus *Alternaria*, specifically alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), on the adhesion properties of selected strains of *Lactobacillus* bacteria, namely *L. gasseri* and *L. plantarum*. *In vitro* models Caco-2 and HT29 were used for adhesion testing, where mycotoxin samples were added at a concentration of 10 µg/ml and 5 µg/ml together with fluorescently labelled tested bacterial strains.

The measured adhesion values decreased in almost all cases and ranged from 61.02 % to 134.51 %. There was an increase in adhesion values in two cases, namely for *L. gasseri* with mycotoxin AME at a concentration of 10 µg/ml by 16.17 % and at a concentration of AME 5 µg/ml by 34.51 % compared to the control on Caco-2 cell lines. Statistically significant differences were observed for *L. gasseri* on the Caco-2 line with the addition of AOH at a concentration of 10 µg/ml, *L. gasseri* on HT29 with the addition of AME at a concentration of 5 µg/ml and for *L. plantarum* on HT29 with AOH at a concentration 10 µg/ml and AME at the same concentration.

From the results achieved, it can be said that the established hypothesis was confirmed, and mycotoxins of the genus *Alternaria* (AOH and AME) have an effect on the adhesion of probiotic microorganisms in the gastrointestinal tract of the host, in our case *L. gasseri* and *L. plantarum*.

**Keywords:** *Alternaria* spp; lactic acid bacteria; food; *in vitro* intestinal model; fluorescence

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Gastrointestinální trakt</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 Mikrobiota gastrointestinálního traktu</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3 Probiotika</b> .....	<b>11</b>
3.3.1 Charakteristika probiotických organismů .....	11
3.3.2 Funkce probiotik .....	12
3.3.3 Mechanismus působení probiotik .....	15
3.3.4 Významné druhy probiotik .....	13
<b>3.4 Mykotoxiny</b> .....	<b>17</b>
<b>3.5 Významné mykotoxiny</b> .....	<b>19</b>
<b>3.6 Mykotoxiny rodu <i>Alternaria</i></b> .....	<b>22</b>
3.6.1 Vstup mykotoxinů do gastrointestinálního traktu .....	25
3.6.2 Interakce mykotoxinů se střevní mikrobiotou .....	26
<b>4 Metodika</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Materiál</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2 Metoda</b> .....	<b>28</b>
4.2.1 Kultivace buněčných linií .....	28
4.2.2 Založení 96-jamkových destiček .....	28
4.2.3 Příprava barviva .....	28
4.2.4 Příprava bakteriální suspenze a barvení laktobacilů .....	29
4.2.5 Testování adheze .....	29
4.2.6 Statistická analýza .....	29
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 Adheze probiotik s mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2 Adheze probiotik s mykotoxiny na HT29 buněčných liniích</b> .....	<b>31</b>
<b>6 Diskuze</b> .....	<b>34</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>37</b>
<b>8 Literatura</b> .....	<b>38</b>
<b>9 Seznam tabulek a obrázků</b> .....	<b>45</b>
<b>9.1 Seznam tabulek</b> .....	<b>45</b>
<b>9.2 Seznam obrázků</b> .....	<b>45</b>
<b>10 Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	<b>46</b>

# 1 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických hub, které kontaminují potraviny a krmiva a způsobují závažné problémy z hlediska bezpečnosti a kvality produkce. Je známo přibližně 400 druhů mykotoxinů, z nichž většina má teratogenní, mutagenní, karcinogenní a imunosupresivní účinky na zdraví člověka. Kromě toxického efektu na organismus člověka, mykotoxiny jsou taky schopny ovlivňovat střevní mikrobiotu. Při styku mykotoxinů s probiotickými bakteriemi ve střevě dochází ke změně adhezenčních vlastností probiotik, tj. schopnosti ulpívat na buňky střevního epitelu. Adheze je důležitou podmínkou symbiózy mezi probiotickými bakteriemi a organismem hostitele, tím pádem umožňuje i zdravotní přínos, který probiotika poskytují.

Interakce mykotoxinů, produkovaných známými rody mikroskopických hub, jako je *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*, je poměrně dobře prostudována, a proto v této práci jsme se zaměřili na méně známý rod plísní, a to rod *Alternaria*. Alternariové mykotoxiny kontaminují širokou škálu zemědělských produktů. Jsou často detekovány v obilovinách a obilných produktech, olejnatých semenech a rajčatech. Jsou dostupné informace o jejich toxickém účinku na zdraví člověka, ale vliv alternariových mykotoxinů na adhezenční vlastnosti probiotik ve střevě stále není dobře prostudován, proto se jedná o aktuální téma.

Cílem této práce bylo zhodnotit, jak mykotoxiny rodu *Alternaria* ovlivňují adhezi vybraných probiotických mikroorganismů rodu *Lactobacillus* na střevní epitel.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Probiotické kmeny mohou sloužit jako aditivum v potravinách za účelem snížení výskytu mykotoxinů. Po kontaktu s mykotoxiny může docházet ke změně vlastností probiotických bakterií v trávicím traktu hostitele.

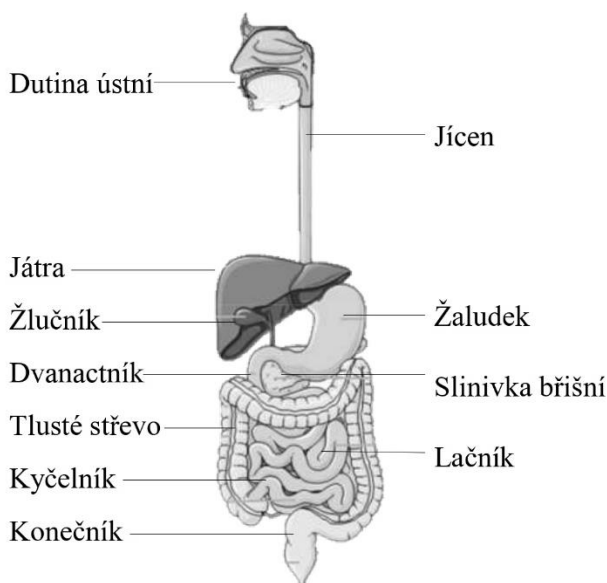
Cílem práce bude sledovat vliv alternariových mykotoxinů na změny adhezenčních vlastností vybraných probiotických bakterií.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt (GIT) (obr. 1) je soustava orgánů, která zajišťuje příjem a zpracování potravin, vstřebání živin a vyloučení nestravitelných zbytků. Trávicí soustavu lze rozdělit na trávicí trubici a na přiléhající orgány, které napomáhají procesu trávení vylučováním trávicích enzymů a šťáv. Každý orgán má svoji specifickou a nenahraditelnou funkci. Trávicí systém začíná dutinou ústní (*cavum oris*), na ní navazuje hltan (*pharynx*) a jícen (*oesophagus*). V těchto orgánech probíhá proces příjmu a rozměňování potravy, její zvlhčení, změkčení pomocí slin. Po průchodu hltanem a jícnem potrava se dostává do žaludku (*gaster*), kde enzymy žaludeční šťávy a kyselý pH zajišťují mechanické a chemické trávení. Horní části GITu tedy nehrají roli v přímé absorpci živin, ale slouží k zahájení zpracování potravinové matrice. Trávicí trubice pokračuje tenkým stěvem (*intestinum tenue*), které se člení na dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*), tlustým stěvem (*intestinum crassum*) rozdělující se na slepé střevo (*intestinum caecum*) s červovitým přívěskem (*appendix*), vzestupný, příčný, sestupný, esovitý tračník (*colon ascendens, transversum, descendens, sigmoideum*) a končí řitním otvorem (*anus*), což je vyústění konečnicku (*rektum*). Pomocnými orgány jsou játra (*iecur*), slinivka břišní (*pankreas*) a žlučník (*vesica fellea*) (Vertzoni et al. 2019).



**Obrázek 1:** Gastrointestinální trakt člověka (Vertzoni et al. 2019)

Kromě příjmu potravy a jejího trávení GIT se taky podílí na ochraně organismu před patogeny a hraje důležitou roli v imunitním systému. Střevní stěna vytváří účinnou fyzikální bariéru, která chrání před průnikem patogenů do krevního řečiště a tím i do dalších orgánů. Ochrana je taky zprostředkována mikroorganismy osídlující GIT (Cordonnier et al. 2015).

Lidské tělo se nachází v neustále symbióze s mikroorganismy. Soubor mikroorganismů v těle se nazývá mikrobiota. Mikroorganismy jsou v těle člověka distribuovány nerovnoměrně, a proto se obvykle rozlišuje mikrobiota kůže, dutiny ústní, dýchacích cest, urogenitálního traktu a mikrobiota gastrointestinálního traktu (Xu and Knight 2015).

### 3.2 Mikrobiota gastrointestinálního traktu

Gastrointestinální trakt člověka obsahuje  $10^{14}$  bakterií a více než tisíc druhů mikroorganismů. Složení a počet mikroorganismů se v různých částech GIT výrazně liší. Nejméně osídlený je žaludek, kde nízké pH žaludeční šťávy a proteolytické enzymy vytváří nepříznivé podmínky pro rozvoj mikrobioty. Nachází se tam pouze  $10^2$  KTJ (kolonie tvořící jednotky) /ml, tvořených zástupci rodů *Streptococcus*, *Stomatococcus* a *Sarcina*. Tenké střevo obsahuje  $10^4$  KTJ/ml. Proximální část tenkého střeva obsahuje převážně grampozitivní aerobní bakterie, např. laktobacily, streptokoky a stafylokoky, kdyžto v distální části převládají gramnegativní enterobakterie a další anaerobní bakterie (Sender et al. 2016). Mikrobiota tlustého střeva stanoví přibližně  $10^{13}$  KTJ/ml. To je nejpočetnější a nejvíc různorodý mikrobiální ekosystém v lidském těle. Většina bakterií tlustého střeva patří do rodů *Bacteroides*, *Clostridium* a *Bifidobacterium*, nižší četnost mají rody *Escherichia* a *Lactobacillus*. V tlustém střevu se taky vyskytují kvasinky *Candida* a *Saccharomyces*, mikroskopické houby a *Archea* (Newton et al. 2013).

Druhové složení mikrobioty GITu je individuální a záleží na různých faktorech. Vliv má genetické pozadí, věk jedince, environmentální faktory, dieta a užívané léky (Ashaolu et al. 2021). Například, příjem antibiotik se širokým spektrem účinků vede ke snížení množství populací zdraví prospěšných bakterií (rody *Bacteroides*, *Lactobacillus*) a ke snížení jejich metabolické aktivity (Newton et al. 2013). Vyvážená dieta s vysokým obsahem vlákniny naopak pomáhá udržovat normální složení střevní mikrobioty (Rajoka et al. 2017).

Dlouhodobě se předpokládalo, že kolonizace lidského těla mikroorganismy začíná při porodu, tedy před narozením je plod absolutně sterilní (Xu and Knight 2015). Až donedávna byla bakteriální kolonizace plodu nejčastěji vysvětlována infekcemi placenty, plodové vody a/nebo předčasným porodem (Walker et al. 2017). Avšak bylo zjištěno, že placenta, nitroděložní vody a pupečnicková krev obsahují bakterie rodu *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (Aagaard et al. 2014). Bakteriální kolonizace před samotným porodem (*in utero*) je zprostředkována plodovou vodou, kterou je dítě neustalé obklopeno. Mezi bakterie osidlující plod *in utero* patří zástupci rodů *Streptococcus* a *Enterococcus* (Nagpal et al. 2016). Klíčovou etapou pro vývoj mikrobioty dítěte je způsob porodu (Walker et al. 2017). Například, mikrobiota dětí narozených vaginálně připomíná mikrobiotu matky a je zastoupená bakteriemi řády *Bacteroidales* a *Enterobacteriales*, zatímco mikrobiota dětí narozených pomocí císařského řezu je podobná mikrobiotě kůže, je výrazně menší a obsahuje bakterie řády *Bacillales* a *Lactobacillales* (Akagawa et al. 2019). Vývoj střevní mikrobioty dítěte záleží taky na typu krmení (Akagawa et al. 2019; Yasmin et al. 2017) a regionálních rozdílech včetně hygienických podmínek a diety (Selma-Royo et al. 2021).

Akagawa et al. (2019) uvádí, že existuje silná závislost mezi složením mikrobioty a zdravotním stavem hostitele. Střevní mikrobiota napomáhá imunitnímu systému hostitele, fermentuje nestravitelné sacharidy, poskytuje energii ve formě mastných kyselin s krátkým řetězcem a chrání organismus před patogeny. Kvalitativní změna v normálním druhovém složení mikrobioty, tj. dysbióza, souvisí se vznikem různých nemocí, například onemocnění GIT, alergie, metabolického syndromu a *diabetes mellitus*.

Jedním ze způsobů udržování normálního kvalitativního a kvantitativního složení mikrobioty GITu je užívání probiotik (da Silva et al. 2021).

## 3.3 Probiotika

### 3.3.1 Charakteristika probiotických organismů

Organizace pro výživu a zemědělství/Světová zdravotnická organizace (Food and Agriculture Organization/World Health Organization; FAO/WHO) definuje probiotika jako živé mikroorganismy, které při konzumaci v určitém množství poskytují hostiteli zdravotní přínos. Hlavním zdrojem probiotik v dietě jsou fermentované potraviny, např. fermentované mléčné výrobky, nakládána zelenina a nápoje získané fermentací, jako je kombucha (Hill et al. 2014). Pojem "probiotika" se v současnosti používá zejména pro označení farmakologických přípravků nebo doplňků stravy, které obsahují kmeny jednoho nebo více zástupců normální lidské mikrobioty. Za nejčastěji používaná probiotika se považují bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Uvádí se, že jako probiotikum se mohou taky používat některé další mikroorganismy, např. kvasinky rodu *Saccharomyces* (Cordonnier et al. 2015). Podle složení se probiotické přípravky rozdělují na monoprobiotika, obsahující mikroorganismy stejného druhu a kmenu, polyprobiotika obsahující bakterie stejného druhu, ale různých kmenů a kombinována probiotika obsahující bakterie různých druhů (McFarland 2021). Aby potravina mohla být uváděna na trh se zdravotním tvrzením o přínosu obsažených v ní probiotických mikroorganismů, musí obsahovat životaschopné buňky z probiotických kultur ve množství alespoň  $10^6$ – $10^7$  KTJ v jedné porci (da Silva et al. 2021).

Významným faktorem výběru probiotických bakterií je zachování životaschopnosti mikroorganismů při průchodu trávicím traktem (Cremon et al. 2018). Aby užití probiotik mělo příznivý efekt na zdraví, probiotické mikroorganismy by měly přežít kyselé pH žaludeční šťávy, trávicí procesy v tenkém střevě a dostat se do tlustého střeva v dostatečném množství, aby byla možná kolonizace a proliferace (Thakur et al. 2016). Pro zajištění dostatečného přísunu probiotik do tlustého střeva v nejnižším účinném množství  $10^6$ – $10^7$  KTJ, dávka probiotik v potravinách nebo doplňcích stravy by měla být aspoň  $10^8$ – $10^9$  KTJ. Pro ochranu probiotických mikroorganismů před drsnými podmínkami GITu se používá proces mikroenkapsulace, což je zapouzdření bakteriálních buněk do ochranné matrice s řízeným uvolňováním probiotik za určitých podmínek a zadanou rychlostí. Mikro kapsle obsahují semipermeabilní nebo nepropustnou tenkou membránu, která je tvořena z bezpečných potravinářských aditiv, např. z alginátu, želatiny nebo pektinu, a taky mléčných bílkovin, např. kaseinu (Shori 2017). Sledování úrovně přežití volných a mikroenkapsulovaných probiotik druhů *Saccharomyces boulardii* and *Enterococcus faecium* ukázalo, že procento přežití volných a mikroenkapsulovaných probiotik při simulaci podmínek travení se významně lišilo. Při ošetření volných probiotik *S. boulardii* po dobu 30 minut procento přežití se rovnalo 29,19 %, u *E. faecium* 58,91 %. Míra přežití mikroenkapsulovaných *S. boulardii* ošetřených za stejných podmínek byla 89,62 %, mikroenkapsulovaných *E. faecium* 83,7 %, což ukazuje, že mikroenkapsulace zvýšila míru přežití *S. boulardii* o 60 % a *E. faecium* o 24 % (Qi et al. 2019). Mikroenkapsulace tak pomáhá zachovat životaschopnost většiny probiotik, a tím pádem zdravý přínosný efekt od jejich konzumace je vyšší (Shori 2017).

Další podmínkou použití probiotik je jejich nezávadnost a bezpečnost pro spotřebitele. Pro posouzení celkové bezpečnosti probiotik se bere v úvahu jejich původ, patogenita, virulence, a taky schopnost přijímat cizí DNA z prostředí a s tím spojená schopnost nosit geny antibiotické

rezistence (Koirala 2021). Antibiotickou rezistenci se rozumí odolnost bakterií vůči působení antibiotik. Probiotické kmeny bakterií mohou získat tuto vlastnost prostřednictvím horizontálního přenosu genů v důsledku příjmu cizí DNA z prostředí. Následně tyto geny mohou být přeneseny na patogenní mikroorganismy během interakce probiotik a patogenů ve střevě hostitele, což může způsobovat vážné problémy z hlediska léčby bakteriálních onemocnění (Abriouel 2015). Kromě toho se u probiotik sleduje jejich hemolytická aktivita, produkce peroxidu vodíku a schopnost produkovat biogenní aminy, např. histamin nebo tyramin, které mohou působit toxicky na organismus hostitele (Thakur et al. 2016).

Potraviny nebo doplňky stravy obsahující bezpečná a životaschopná probiotika tak mohou mít výrazný pozitivní vliv na zdraví spotřebitele (Hill et al. 2014).

### 3.3.2 Funkce probiotik

Probiotické organismy mají řadu pozitivních účinků na zdraví a působí na tělo hostitele komplexně. Probiotika mají antipatogenní vlastnosti a chrání organismus hostitele před škodlivými organismy a toxickými sloučeninami (da Silva et al. 2021). Působí taky jako antidiabetika a anticholesterolemika, čímž taky napomáhají při hypertenzi (Cremon et al. 2018). Probiotika se účastní procesu modulace střevní mikrobioty, imunitní modulaci a pozitivně ovlivňují centrální nervový systém hostitele (Hu et al. 2020). Účinky probiotik na zdraví jsou druhově a kmenově závislé. Některé druhy mají jedinečné vlastnosti, např. produkují druhově specifické bioaktivní látky s antimikrobiální aktivitou. Účinky probiotik záleží taky na době přetrvání v GITu a způsobu podání. Uvádí se, že kombinace různých probiotických organismů působí synergicky díky většímu rozsahu mechanismů působení (McFarland 2021).

Stejně jako i autochtonní (přirozená) mikrobiota GITu, probiotika kolonizují gastrointestinální trakt a tím přispívají k ochraně prostředí GITu před patogenními mikroorganismy a napomáhají imunitě hostitele (da Silva et al. 2021). Antipatogenní efekt probiotik se projevuje díky několika mechanismům. Prvním mechanismem je vytvoření tzv. „bariérového efektu“ osídlením GITu a následná konkurence probiotik s patogeny o vazebná místa a živiny (Camilleri 2021). Druhým mechanismem je regulace acidobazické rovnováhy GITu prostřednictvím produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA - short-chain fatty acids), především ethanové, propionové a butanové kyseliny. Probiotika metabolizují nestrávené nebo částečně strávené zbytky potravy, zejména složky rostlinných buněčných stěn (celulózu, hemicelulózu, pektin a lignin) a mucin na jednoduché sacharidy, které jsou následně fermentovány za vzniku SCFA. Tyto produkty metabolismu snižují pH střeva, vytváří příznivé podmínky pro rozvoj zdraví prospěšné mikrobioty a zároveň potlačují rozvoj patogenních mikroorganismů (Kerry et al. 2018). Například, octová kyselina vykazuje inhibiční účinky proti gramnegativním bakteriím jako *Helicobacter pylori* (Galdeano et al. 2019).

Kromě toho, SCFA jsou primárním zdrojem energie pro kolonocyty (epiteliální buňky sliznice tlustého střeva). Bylo prokázáno, že 70 % energetické spotřeby kolonocytů kryje máselná kyselina produkovaná převážně bakteriemi rodu *Ruminococcus* a *Faecalibacterium*. Navíc SCFA produkované střevní mikrobiotou tvoří přibližně 10 % denního energetického příjmu člověka, a taky zvyšují vstřebatelnost vápníku, železa a hořčíku (Markowiak-Kopeć and Śliżewska 2020). Pokles počtu bakterií produkujících SCFA často souvisí s zánětlivými

střevními onemocněními, syndromem dráždivého tračníku, *diabetes mellitus* 2. typu, obezitou nebo rakovinou (Kerry et al. 2018).

Probiotika stimulují a regulují imunitní odpovědi hostitele. Mechanismus působení probiotik na imunitu člověka je komplexní a není zcela objasněn (Hu et al. 2020). Jedním z mechanismů je již zmíněna konkurence probiotik s patogeny a soutěž o živiny a vazebná místa. Bylo prokázáno, že probiotika druhu *L. rhamnosus* a *L. plantarum* snižují přilnavost enteropatogenních druhů *Escherichia coli* ke stěně GITu (Galdeano et al. 2019). Také bylo zjištěno, že probiotika stimulují vrozenou a získanou imunitní odpověď indukci imunoglobulinu A (IgA) a podporují fagocytózu a modifikační reakce T-buněk (Hu et al. 2020). Dle Zhang et al. (2018) užívání kombinací probiotik *Lactobacillus paracasei*, *L. casei* a *L. fermentum* aktivuje interferony gamma (IFN- $\gamma$ ) v krvi a imunoglobuliny A (IgA) ve střevu, díky čemuž se snižuje riziko vzniku respiračních onemocnění.

Navíc probiotika ovlivňují metabolické procesy: regulují tvorbu tukové tkáně - adipogeneze, stimulují inzulínovou odpověď a normalizují hladiny lipoproteinů v krvi (Cremon et al. 2018). Průřezová studie (Lau et al. 2019) zahrnující 38 802 dospělých prokázala, že skupina lidí užívající probiotika v podobě doplňků stravy nebo mléčných výrobků měla nižší hodnoty Body Mass Index (BMI), stejně jako nižší krevní tlak a vyšší hladinu HDL (high density lipoprotein) v krvi. Tímto způsobem užívání probiotik bylo spojeno s nižší prevalencí obezity a hypertenzi. Výsledky randomizované dvojité zaslepené studie (Majewska et al. 2020) ukázaly, že užití obézními ženami polyprobiotik během 12 týdnů snížilo koncentraci homocysteinu v krvi, zlepšilo lipidový profil krve a parametry vykazující úroveň oxidačního stresu, což jsou faktory, které souvisí se zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění (KVO).

Probiotika mají řadu příznivých účinků na zdraví člověka a jsou vhodným doplňkem pro prevenci nebo léčbu některých neinfekčních onemocnění, např. *diabetes mellitus* 2. typu, obezity a zánětlivých onemocnění GITu. Pravidelná konzumace potravin obsahujících probiotika anebo užití probiotik v podobě doplňků stravy často souvisí s nižším rizikem vzniku tzv. civilizačních chorob a lepší odolnosti organismu vůči patogenům (Kerry et al. 2018).

### 3.3.3 Významné druhy probiotik

Jako probiotika se používají bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a také kvasinky rodu *Saccharomyces*. Druhy probiotik, které patří k rodům *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* se vyskytují jako část autochtonní mikrobioty GITu člověka, a proto jsou bezpečné a nejvíce používané jako součást potravin nebo doplňků stravy. Ačkoliv neexistují žádné univerzální probiotické kmeny, které by mohly splňovat všechny klinické požadavky na zdravotní přínos, pozitivní účinek na zdraví byl dobře prostudován a prokázán u probiotických druhů *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium* spp (Zhang et al. 2018).

#### ***Lactobacillus* spp**

*Lactobacillus* je rod gram pozitivních, fakultativně anaerobních nebo mikroaerofilních nesporulujících bakterií. Laktobacily mají tyčinkovitý tvar, jsou uspořádané v krátkých řetězcích nebo se vyskytují jednotlivě (Duar et al. 2017). Jejich hlavním produktem metabolismu při fermentaci mléka je kyselina mléčná, a proto laktobacily spadají do skupiny

bakterií mléčného kvašení (BMK) (Wang et al. 2021). Kromě mléčné kyseliny laktobacily jsou schopny produkovat peroxid vodíku a látky s antimikrobiální aktivitou, např. reuterin a laktocidin. Heterofermentativní druhy laktobacilů mohou také produkovat octovou kyselinu (Abriouel et al. 2015).

Optimálními podmínkami pro růst laktobacilů je teplotní rozmezí 30–40 °C a hodnoty pH 5,5–6,2, i když jsou schopny přežít při teplotě od 2 °C až do 53 °C a při rozmezí pH 3 až 8. Laktobacily kódují široké spektrum enzymů pro využití velkého množství substrátů včetně pentóz, sacharózy, laktózy, celobiózy, dusičnanů, citronové a jablečné kyseliny (Wang et al. 2021).

Laktobacily osídlují lidské tělo již v prvních týdnech života (Aagaard et al. 2014) a jsou přirozenou součástí mikrobioty dutiny ústní, GITu a genitálního traktu lidí (Salveti et al. 2012), mimoto jsou přítomny i v mateřském mléku (Xu and Knight 2015). Některé laktobacily se adaptovaly i na kyselé prostředí žaludku: *L. gastricus* a *L. gasseri* jsou součástí žaludeční mikrobioty (Delgado et al. 2013). Mnohem víc laktobacilů se ale nachází v tlustém střevu, kde převažují druhy *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus* a další (Rodríguez-Sánchez et al. 2021).

Podle amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drugs Administration, FDA) laktobacily jsou všeobecně považovány za bezpečné (Generally Recognized as Safe, GRAS), a proto jsou široce používány v potravinářském průmyslu (Abriouel et al. 2015). Využívají se při výrobě mléčných výrobků (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je typickou jogurtovou kulturou; *Lactobacillus acidophilus* je používán při výrobě acidofilního mléka), ke konzervaci potravin (např. při procesu kvašení zelí) a řada laktobacilů se používá jako probiotika (Duar et al. 2017).

Laktobacily mají pozitivní vliv na zdraví hostitele. Produkují určité enzymy, např.  $\beta$ -galaktosidázu štěpící laktózu a  $\alpha$ -glukosidázu štěpící škroby a disacharidy na glukózu a další produkty (Rodríguez-Sánchez et al. 2021); hydrolyzují žlučové soli a tím snižují hladinu cholesterolu v krevním séru (Kerry et al. 2018); produkují taky glutamát dekarboxylázu, která přeměňuje glutamát na  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu (GABA), která má zase mnoho fyziologických funkcí, jako je inhibice neurotransmise v centrálním nervovém systému, snížení krevního tlaku a analgetické účinky (Rodríguez-Sánchez et al. 2021; Yunes et al. 2016). *Lactobacillus gasseri* má prokázaný vliv na inhibici růstu tukové tkáně a omezení sekrece leptinu, čímž usnadňuje proces hubnutí (Kerry et al. 2018).

### ***Bifidobacterium* spp.**

*Bifidobacterium* je rod grampozitivních bakterií, zahrnující nepravidelné striktně anaerobní nesporulující tyčinky. Bifidobakterie představují běžné obyvatele GITu člověka a ostatních savců (Turroni et al. 2011). Bifidobakterie kolonizují lidské střevo již od narození a dostávají se do organismu z mateřského mléka (Xu and Knight 2015). Bifidobakterie představují 80 % mikrobioty GITu u kojenců, ale jejich množství klesá po ukončení kojení. U dospělých lidí množství bifidobakterií je konstantní a představuje 3-6 % celkového počtu mikroorganismů, u starších osob (> 65 let) se však počet bifidobakterií ubývá (O'callaghan and Van Sinderen 2016).

Mezi bifidobakteriemi a jejich hostitelem se mohou vyvinout různé vztahy. Některé druhy, např. *Bifidobacterium dentium*, jsou patogenní, kdyžto druhy *B. bifidum* a *B. breve* jsou zdraví

prospěšné. *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis* jsou běžně používané probiotické druhy (Turrone et al. 2011).

Ačkoliv bifidobakterie jsou běžnou součástí mléčných výrobků, nejsou bakteriemi mléčného kvašení. Na rozdíl od BMK, bifidobakterie metabolizují laktózu na mléčnou a octovou kyselinu v poměru 2:3, kdyžto BMK včetně laktobacilů produkují převážně mléčnou kyselinu (Nguyen et al. 2012).

Bifidobakterie mohou ovlivňovat složení střevní mikrobioty díky cross-feeding – schopnosti bifidobakterií spolupracovat mezi sebou pro degradaci velkých komplexů polysacharidu, zejména sacharidů rostlinného původu nebo mucinu. Pomocí extracelulární hydrolyzy bifidobakterie štěpí nestavitelné zbytky polysacharidů na mono- a oligosacharidy, které následně mohou být využité ostatními bakteriemi (Milani et al. 2016; O'callaghan and Van Sinderen 2016).

### Ostatní probiotické kmeny

Mezi ostatní probiotické mikroorganismy patří zástupce dalších rodů BMK, např. rod *Streptococcus* a *Lactococcus*, rody *Bacillus*, *Escherichia* a *Propionibacterium* (Azad et al. 2018) a taky některé druhy kvasinek, především z rodu *Saccharomyces* (Cordonnier et al. 2015).

*Escherichia coli* je gramnegativní bakterie z čeledi Enterobacteriaceae. Je běžným obyvatelům trávicího traktu člověka, kde se podílí na zachování homeostáze mikrobioty. Nejpoužívanější probiotický kmen je *Escherichia coli* Nissle (EcN) (Azad et al. 2018). Bylo prokázáno, že EcN mohou pozitivně ovlivňovat funkci imunitních buněk hostitele a stimulovat produkci lidského  $\beta$ -defensinu 2, který může chránit slizniční bariéru proti adhezi patogenních mikroorganismů (Diaz-Garrido et al. 2019; Hu et al. 2020). *Enterococcus* je rod grampozitivních bakterií, které tvoří přirozenou mikrobiotu GITu. Uvádí se, že enterokoky mají protinádorové účinky a napomáhají imunitnímu systému hostitele (Azad et al. 2018). *Saccharomyces* je zástupce probiotických kvasinek (Cordonnier et al. 2015). Studie ukázaly, že kvasinky rodu *Saccharomyces* mají vliv na metabolické procesy a mají schopnost předcházet zánětu podporou prozánětlivých imunitních funkcí a zvýšením produkce SCFA (Everard et al. 2014).

#### 3.3.4 Mechanismus působení probiotik

Pro dosažení zdravotního přínosu by mělo být účinné probiotikum schopno alespoň přechodně kolonizovat střevní sliznici, a proto schopnost adherovat (přilnout) ke sliznici střeva a následná dlouhodobá či krátkodobá kolonizace GITu je jedním z nejdůležitějších kritérií pro výběr probiotických kmenů (Argyri et al. 2013). V případě probiotik většinou mluvíme o adhezi ke vnitřnímu povrchu střeva (Behbahani et al. 2019).

Střevní sliznice je kryta epiteliální vrstvou, kde jsou přítomny absorpční, pohárkové a endokrinní buňky. Pohárkové buňky jsou rozptýleny mezi absorpčními buňkami a vylučují hlen, který se skládá z glykoproteinu mucinu, anorganických solí a malého množství imunoglobulinů (Monteagudo-Mera et al. 2019). Funkcí hlenu je ochrana buněk tenkého střeva před patogeny, toxiny a mechanické poškození. Hraje taky velkou roli v procesu adheze bakteriálních buněk (přičemž jak zdraví prospěšných probiotik, tak i patogenních

mikroorganismů) ke sliznici střeva (Han et al. 2021). Cukerné zbytky mucinu v hlenu mohou sloužit jako vazebná místa pro receptory na povrchu bakteriální membrány (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Mechanismy adheze nejsou zcela objasněny a vyžadují další výzkum, je ale známo, že adheze je multifaktoriální proces, který zahrnuje elektrostatické interakce, hydrofobní interakce a použití specifických bakteriálních struktur. Mechanismy adheze k povrchu GITu lze rozdělit na specifickou adhezi k povrchovým molekulám střevního epitelu a nespecifickou adhezi (de Wouters et al. 2015). Proces adheze se skládá z reverzibilního a stabilního stadia. Probiotika se nejdříve ulpívají na sliznici prostřednictvím nespecifického fyzického styku a hydrofobní interakce, čímž dochází k reverzibilní a slabé fyzické vazbě. Následně dochází ke specifické interakci mezi speciálními bakteriálními proteiny a komplementárními receptory sliznice střeva. Vytvoří se stabilní vazba bakterií na střevní epitelální buňky nebo hlen, čímž se ukončí úspěšná kolonizace GITu (Han et al. 2021).

Hlavními bakteriálními strukturami, které se účastní procesu adheze, jsou speciální adhezivní organely fimbrie. Fimbrie se skládají z proteinových podjednotek, mají průměr v rozmezí od 2 do 8 nm a jsou viditelné pouze elektronovým mikroskopem. Vyskytují se na povrchu bakteriálních buněk v desítkách až stovkách a jsou charakteristické pro gramnegativní bakterie, např. pro *E. coli*. Fimbrie umožňují bakteriím adherovat na povrch jiných buněk, hostitelských bílkovinných struktur a jiných látek. Pro usnadnění procesu adheze na povrchu fimbrií jsou často přítomny speciální proteiny, které se nazývají adheziny (Juge 2012).

Adheziny zprostředkovávají stabilní vazbu na sliznici, mají různorodou strukturu, a proto určují vysokou specifitu mikrobiální adheze (Behbahani et al. 2019). Příkladem adhezinu je mucin-vázající proteiny (mucus-binding proteins - MUB), z nichž nejlépe prostudovaným proteinem je MUB z *L. reuteri*. MUB obsahují typický signální peptid a kotvicí motiv LPxTG na C konci pro připojení k buněčné stěně pomocí kovalentní vazby. MUB přispívají adhezi prostřednictvím interakce se sacharidy hlenu. Bylo taky zjištěno, že k vazbě na složky hlenu dochází v rozmezí pH 3-7,4, nejlépe však při pH 4-5 (Juge 2012). Dalším příkladem adhezinu jsou proteiny vázající fibronectin (fibronectin-binding proteins - FBP). Fibronektiny jsou glykoproteiny, vyskytující se na povrchu buněčných membrán a v mezibuněčném prostoru. Vyskytují se ve dvou formách: rozpustný plazmatický fibronectin a nerozpustný buněčný fibronectin. Ve střevě člověka se nachází v nerozpustné formě. Fibronektiny hrají velkou roli v procesu buněčné adheze a pohybu buněk, jsou taky důležité pro hojení ran a embryonální vývoj. Na fibronektiny se pomocí FBP mohou vázat bakterie, přičemž přítomnost FBP je spojená jak se zvýšenou virulencí u patogenních druhů bakterií, tak i s vyšší adhezí probiotických bakterií (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Tvorba biofilmu je další formou adheze bakterií k substrátu. Biofilm je definován jako strukturované společenstvo mikroorganismů, vázané k určitému povrchu a obalené extracelulární matricí (Gómez et al. 2016). Přítomnost biofilmů je často spojená s patologickými procesy v organismu, protože jejich struktura činí patogeny odolnější vůči imunitní reakce hostitele a antimikrobiálním látkám (Monteagudo-Mera et al. 2019). Tvorba a vývoj biofilmu probiotickými bakteriemi ale může být výhodou z hlediska lepší adheze probiotik a jejich delšímu setrvání v organismu. Použití probiotických bakterií se schopností tvořit biofilm je předmětem výzkumu s perspektivou použití jako bezpečná ochrana



v potravinářství proti patogenům, např. proti *Listeria monocytogenes* nebo *Salmonella* (Gómez et al. 2016).

Schopnost adheze zahrnuje nejen přichycení bakterií k hostitelským buňkám, ale i k jiným bakteriálním buňkám stejného druhu (autoagregace) nebo odlišných druhů (koagregace). Tím pádem probiotika mohou poskytovat ochranu proti patogenům jejich koagregací a zabránění tvorby biofilmu patogeny. Studie prokázaly, že dva probiotické kmeny *L. reuteri* byly schopny agregovat společně s kvasinkami *Candida albicans* během tvorby biofilmu a inhibovat růst a množení těchto kvasinek (Jørgensen et al. 2017).

Adheze probiotických bakterií ke střevnímu epitelu hostitele ještě nezajišťuje interakci s hostitelem a následný zdravotní přínos. Přílnavost probiotik ke střevní sliznici ale může mít potenciální ochrannou roli proti enteropatogenům prostřednictvím kompetice o vazebná místa. Adheze mikroorganismů může zvýšit pravděpodobnost interakce s organismem hostitele, což má za následek dočasnou kolonizaci a prodloužení doby průchodu probiotik střevem. Dočasná kolonizace podporuje lokální působení metabolitů produkovaných probiotiky a imunomodulační účinky bakterií (Rocha-Mendoza et al. 2020).

Schopnost adheze probiotických organismů mohou zvyšovat například prebiotika, což jsou látky selektivně podporující růst a střevní mikrobioty (Monteagudo-Mera et al. 2019). Snížení adhezivních vlastností probiotik může být následkem jejich interakcí s mykotoxiny, které jsou jedněmi z nejvíce nebezpečných organických kontaminantů (Afshar et al. 2020).

### 3.4 Mykotoxiny

GIT funguje jako bariéra pro vstup látek z potravin do krevního řečiště a dalších orgánů, a proto je neustále vystavován celé řadě látek, mnoho z nichž mají vliv na adherenci střevní mikrobioty. Mezi látky negativně ovlivňující schopnost adherovat patří i mykotoxiny (Afshar et al. 2020).

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub (plísňí), které vyvolávají akutní nebo chronickou toxickou reakci již v malých koncentracích (Alshannaq and Yu 2017). Mykotoxiny jsou „chemickým obranným systémem“ mikroskopických hub. Chrání mikromycety před jinými organismy, pomáhají pronikat do hostitelských organismů a přispívají v konkurenci o potravu a přežití. Největšími producenti mykotoxinů jsou rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Některé mykotoxiny mohou být produkovány dvěma a více rody mikroskopických hub. Prakticky všechny mykotoxiny mohou způsobit jeden nebo více závažných zdravotních problémů (Omotayo et al. 2019).

Mykotoxiny kontaminují širokou škálu potravin a krmiv a vyvolávají vážné zdravotní problémy u lidí i zvířat. Mnoho mezinárodních orgánů a úřadů, např. americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), Světová zdravotnická organizace (WHO), Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) věnují velkou pozornost kontaminaci mykotoxiny a stanovují přísné limity (tab. 1) na jejich přítomnost v potravinách a krmivech (Alshannaq and Yu 2017). Nicméně problém kontaminace zemědělských produktů mykotoxiny je stále často ignorován v mnoha rozvojových zemích, např. hladina expozice mykotoxiny v Guatemale a částech Jižní Afriky překračuje limity stanovené WHO (Liew and Mohd-Redzwan 2018).

**Tabulka 1:** Hlavní mykotoxiny a limity pro jejich množství v potravinách (Alshannaq and Yu 2017)

Mykotoxin	Producent	Kontaminované potraviny	Limity pro EU (µg/kg) (2006)
Aflatoxiny B1, B2, G1	<i>Aspregillus flavus</i> , <i>A. Parasiticus</i>	Obiloviny (kukuřice, pšenice), ořechy	2–12 pro B1, 4–15 pro ostatní
Ochratoxin A	<i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Obiloviny, káva, kakao	2–10
Fumonisin B1, B2, B3	<i>Fusarium verticilliodes</i> , <i>F. proliferatum</i>	Kukuřice a kukuřičné výrobky	200–1000
Zearalenon	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Obiloviny, kukuřice	20–100
Deoxynivalenol	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Obiloviny a výrobky z nich	50–200
Patulin	<i>Penicillium expansum</i>	Jablka, jablečný džus	10–50

Z chemického hlediska mykotoxiny jsou nízkomolekulární sloučeniny (většinou méně než 1000 Da) s velmi rozmanitou molekulární strukturou (Alshannaq and Yu 2017). Jsou to látky termostabilní, odolávají širokému spektru faktorů vnějšího prostředí, chemického, fyzikálního a tepelného ošetření. Většina mykotoxinů je schopná přežít nízké pH žaludeční šťávy, vysokou teplotu a tlak pasterizace a sterilace (Afshar et al. 2020). Optimálními podmínkami pro vylučování mykotoxinů do prostředí je teplotní rozmezí 20 – 30 °C, rozsah vodní aktivity 0,85 – 0,99, pH 2,5 – 8 a přístup kyslíku (tab. 2).

**Tabulka 2:** Optimální teplota a vodní aktivita pro produkci vybraných mykotoxinů (Milani 2013)

Mykotoxin	Teplota (°C)	Vodní aktivita (Aw)
Aflatoxiny	33	0,99
Ochratoxiny	25-30	0,98
Fumonisin	15-30	0,9-0,995
Zearalenon	25	0,96
Deoxynivalenol	26-30	0,995
Citrinin	20-30	0,75-0,85

K produkci mykotoxinů dochází při růstu a proliferaci plísní za optimálních teplotních podmínek. Plísně produkují mykotoxiny a kontaminují zemědělské produkty před a po sklizni plodin nebo během zpracování a skladování. K expozici člověka mykotoxinům dochází buď přímo při konzumaci kontaminovaných produktů rostlinného původu nebo nepřímo při konzumaci potravin živočišného původu, které byly získány ze zvířat krměných kontaminovaným krmivem. Kromě příjmu mykotoxinů z potravin a expozice přes trávicí trakt, je možné se infikovat přes dýchací systém nebo pokožku (Alshannaq and Yu 2017).

Onemocnění vyvolaná mykotoxiny se nazývají mykotoxikózy (De Ruyck et al. 2020). Toxický účinek mykotoxinů je ovlivněn různými faktory, včetně typu mykotoxinu, dávkou, dobou expozice, věkem exponovaného jedince (mladší lidé jsou citlivější) a dalšími faktory. Navíc některé jedince jsou více náchylné k mykotoxikóze kvůli specifické mutaci genů pro

cytochrom p450, která zvyšuje metabolickou aktivitu (cytotoxicitu) mykotoxinů (Liew and Mohd-Redzwan 2018).

Mykotoxiny mohou způsobit akutní nebo chronické otravy (De Ruyck et al. 2020). Akutní toxicita se projevuje v krátkých časových intervalech po jednorázovém požití relativně vyšší dávky mykotoxinů. Nejčastěji se projevuje jako porucha funkce jater nebo ledvin, která může vést až ke smrti, nekróze nebo extrémní imunodeficienci (Liew and Mohd-Redzwan 2018). Chronická toxicita nastává po dlouhodobé expozici nízkým dávkám mykotoxinů a způsobuje hemoragické, karcinogenní, hepatotoxické, nefrotoxické, mutagenní a teratogenní účinky (Ostry et al. 2017).

Uvádí se, že i správné zemědělské, skladovací a zpracovatelské postupy nemohou zaručit absenci rizika kontaminace mykotoxiny (Alshannaq and Jae-Hyuk 2017). Odhaduje se, že 25 % světových plodin, zejména obilnin, je kontaminováno mykotoxiny (Liew and Mohd-Redzwan 2018).

### 3.5 Významné mykotoxiny

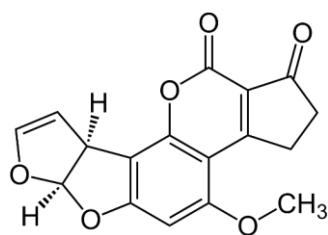
V současné době bylo identifikováno více než 400 druhů mykotoxinů. Za nejvíc nebezpečné se považují aflatoxiny (AF), ochratoxiny (OT), fumonisiny (FB), zearalenon (ZEA) a deoxynivalenol (DON) (Afshar et al. 2020).

#### Aflatoxiny

Aflatoxiny (AF) jsou skupinou strukturně příbuzných toxických sekundárních metabolitů mikroskopických hub produkovaných převážně druhu *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus* (Alshannaq and Yu 2017). Existuje více než 20 typů aflatoxinů, nejvýznamnější u nich jsou aflatoxiny B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1) a M2 (AFM2) (Ismail et al. 2018). Zatímco *A. flavus* produkuje pouze AFB1 a AFB2, *A. parasiticus* mohou produkovat AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2 (Alshannaq and Yu 2017).

Maximální hladiny aflatoxinů se většinou detekují v obilovinách, kořeni a v kravském mléce. Obiloviny a výrobky z nich jsou nejčastěji kontaminovány AFB1 (obr. 2), kdyžto v mléce se většinou nachází AFM1 a AFM2, což jsou hydroxylované metabolity AFB1, které byly biotransformovány jaterním mikrosomálním cytochromem P450. V mléce se mohou objevit v případě, když kráva je krmena potravou kontaminovanou AFB1 (Ismail et al. 2018). AFM1 lze také detekovat v některých mléčných výrobcích, jako je sýr, protože AFM1 je termostabilní, dobře se váže na kasein a je odolný vůči vysoké teplotě pasterace mléka (Alshannaq and Yu 2017).

AF představují bezbarvé až světle žluté krystalické sloučeniny. Mají schopnost fluorescence pod ultrafialovým zářením: vyzařují buď modře (AFB1 a AFB2) nebo zeleně (AFG1 a AFG2), od čehož byly odvozeny jejich názvy (modře = blue, zeleně = green). Jsou málo rozpustné ve vodě, ale dobře se rozpouští v organických polárních rozpouštědlech, např. v chloroformu, methanolu a dimethylsulfoxidu (Ostry et al. 2017).



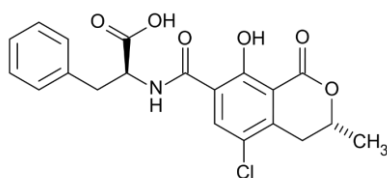
**Obrázek 2:** Aflatoxin B1

AF mohou způsobit jak akutní, tak i chronickou toxicitu. Jednorázová expozice relativně vyšší dávkou AF může vyvolat akutní aflatoxikózu, která se projevuje zvracením, bolestmi břicha, plicním a mozkovým edémem, kómatem, a dokonce i smrtí. Toxické účinky AF jsou způsobeny především vazbou bioaktivovaného AFB1-8,9-epoxidu na buněčné makromolekuly, zejména mitochondriální a jaderné nukleové kyseliny a nukleoproteiny, což má za následek obecné cytotoxické účinky (Alshannaq and Yu 2017). Dávky AF, které by mohly vést k akutní aflatoxikóze a představují riziko úmrtí u lidí se odhadují na 20–120 µg na 1 kg tělesné hmotnosti za den. Hodnoty LD50 se u různých druhů zvířat pohybují mezi 0,5–10 mg/kg tělesné hmotnosti. Úmrtnost u lidí s akutní aflatoxikózou se odhaduje na 27 % až 60 % (Gilbert-Sandoval et al. 2020). Akutní aflatoxikóza je však ve vyspělých zemích vzácná, i když běžně se vyskytuje v rozvojových zemích, zejména v Africe. Chronická toxicita vyvolána AF ale představuje globální problém (Ostry et al. 2017). AF mají prokázané chronické toxické účinky, včetně zvýšeného rizika rozvoje rakoviny jater u lidí (Gilbert-Sandoval et al. 2020). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer; IARC) zařazuje AF včetně AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 a AFM1 do první skupiny karcinogenů, což je skupina látek prokázáno karcinogenních pro člověka. AF způsobují hepatocelulární karcinom. Karcinogenita aflatoxinů je důsledkem genotoxického mechanismu účinku, který zahrnuje aktivaci metabolitů, tvorbu aduktů DNA a modifikaci genu TP53 (Ostry et al. 2017).

## Ochratoxiny

Ochratoxiny (OT) jsou mykotoxiny produkované plísněmi rody *Aspergillus* (*A. ochraceus*) a *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. viridicatum*). OT se detekují v široké škále zemědělských komodit, jako jsou obiloviny, především kukuřice, pšenice a ječmen, luštěniny, káva a víno. Ochratoxiny se taky vyskytují v krmivech, a proto se mohou nacházet i v produktech živočišné výroby. Hlavními formami jsou ochratoxin A (OTA), B (OTB) a C (OTC), z nichž nejvýznamnějším je OTA (Alshannaq and Yu 2017).

OT jsou bezbarvé krystalické látky, málo rozpustné ve vodě a středně rozpustné v polárních organických rozpouštědlech. Jsou odolné vůči vysokým teplotám. Zůstávají stabilní při zahřátí až na 150 °C, ke snížení jejich množství dochází při zahřátí na 200 °C po dobu minimálně 60 minut (Dahal et al. 2016). Mají velmi podobnou molekulární strukturu. OTB na rozdíl od OTA neobsahuje atom chloru, a proto jeho toxicita je nižší, OTC je ethylesterem OTA (Heussner and Bingle 2015).



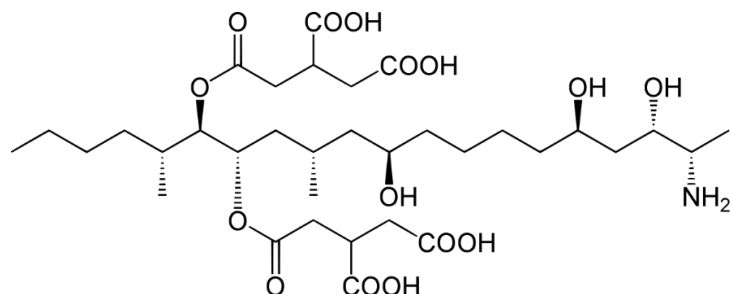
Obrázek 3: Ochratoxin A

Cílovým orgánem ochratoxinů jsou ledviny (Imaoka et al. 2020), vedle toho působí hepatotoxicky (Shin et al. 2019) a teratogenně (Alshannaq and Yu 2017). IARC zařazuje OTA (obr. 3) do skupiny 2B (možný lidský karcinogen) (Ostry et al. 2017).

Podle nařízení komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, nesmí množství OTA v produktech pocházejících z nezpracovaných obilovin překročit  $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , v pražených kávových zrnech nesmí překročit  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , maximální hodnota pro víno je  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Pro OTB a OTC limity nejsou stanovené.

### Fumonisin, Trichothecen a Zearalenon

Fumonisin (F) jsou sekundární metabolity plísňových hub rodu *Fusarium*, produkované převážně druhy *F. verticillioides* a *F. proliferatum* (Alshannaq and Yu 2017). V dnešní době je izolováno více než 28 F, které jsou klasifikovány do skupin A, B, C, P (např. B1, A2, C1, P1). Nejvýznamnější z nich z hlediska kontaminace potravin a toxicity je FB1 (obr. 4) (Braun and Wink 2018). Mykotoxiny ze skupin A, C a P tvoří pouze 5 % celkového množství F nalezených v potravinách (EFSA et al. 2018).



Obrázek 4: FB1

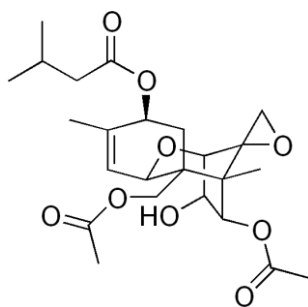
F jsou polyketidy, obsahující 2 postranní řetězce kyseliny propan-1,2,3-trikarboxylové esterifikované na aminopolyol. Na rozdíl od většiny mykotoxinů, F jsou látky hydrofilní povahy (Alshannaq and Jae-Hyuk 2017). Charakteristickým znakem těchto mykotoxinů je jejich strukturní podobnost se sfingolipidy. Sfungolipidy jsou součástí buněčných membrán, nervové tkáně a mozku, podílí se na buněčné signalizaci a ochraně buněk před vnějšími vlivy. Vstup fumonisinů do organismů narušuje metabolismus sfingolipidů a jejich syntézu (Loiseau et al. 2015; Riley and Merrill 2019). Kromě toho FB1 má prokazatelné hepatotoxické (Régner et al. 2019) a nefrotoxické (Hou et al. 2021) účinky a způsobuje plicní edém (Loiseau et al. 2015). IARC zařazuje FB1 a FB2 do skupiny 2B (možný lidský karcinogen) (Ostry et al. 2017).

Typickým zdrojem fumonisinů je kukuřice a kukuřičné výrobky. Ostatní obiloviny (např. pšenice, ječmen, rýže) jsou kontaminovány fumonisinami méně často. Fumonisinami jsou dále detekovány v čiroku, sóji, hrachu, černém čaji a léčivých rostlinách. Konzumace

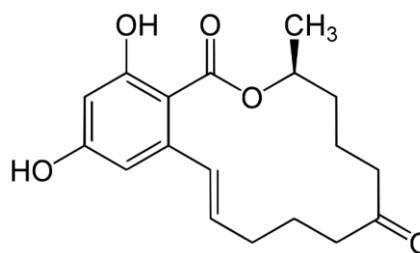
kontaminovaného krmiva hospodářskými zvířaty může způsobit výskyt reziduí fumonisinů v potravinách živočišného původu (Braun and Wink 2018).

Rod *Fusarium* je rovněž producentem trichotecenů (TCTC) a zearalenonu (ZEA). TCTC jsou taky produkovány rody *Acremonium*, *Trichoderma* a *Trichothecium* (Alshannaq and Jae-Hyuk 2017). Na základě charakteristik jejich funkčních skupin jsou TCTC klasifikovány do čtyř skupin (A, B, C a D) (Chen et al. 2020). V současné době je identifikováno více než 150 variant TCTC, ale pouze několik z nich má význam z hlediska kontaminace zemědělských produktů. Mezi ně patří T-2 toxin (T-2) (obr. 5), HT-2 toxin (HT-2), neosolaniol (NEO) a deoxynivalenol (DON). TCTC jsou tetracyklické seskviterpeny s 12,13 epoxy- skupinou. TCTC kontaminují především obiloviny a výrobky z nich. Mohou být přítomny i v sójových bobech, bramborech, slunečnicových semenech, arašidech a banánech (Alshannaq and Jae-Hyuk 2017). Toxicita TCTC se projevuje jako inhibice syntézy proteinů, produkce zánětlivých cytokinů, porucha funkce GITu a imunologické poruchy. Vyšší toxicitu mají T-2 a HT-2 toxiny, zatímco DON se považuje za méně toxický (Lebrun et al. 2015).

ZEA (obr. 6) je produkován především druhy *F. graminearum* a *F. semitectum*. Nejvíce kontaminovanými ZEA jsou obiloviny. Chemickou strukturou je podobný lidskému estrogenu, a proto má silnou estrogení aktivitu a soutěží s lidským estrogenem za vazebná místa na estrogenových receptorech, což má za následek poruchu reprodukčního systému: neplodnost, atrofie vaječníku a další (Rai et al. 2020).



Obrázek 5: T-2 toxin

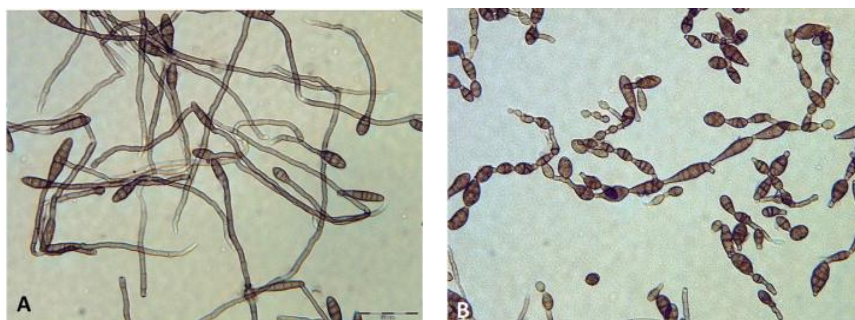


Obrázek 6: ZEA

### 3.6 Mykotoxiny rodu *Alternaria*

Vzhledem k vysokému výskytu v čerstvých a zpracovaných potravinách a kvůli významným toxickým účinkům na zdraví člověka mykotoxiny produkované rodem *Alternaria* získávají stále větší zájem (Crudo et al. 2021).

*Alternaria* je rod toxikogenních mikroskopických hub. Většina zástupců tohoto rodu jsou saprofyty a rostou na jakýchkoli organických substrátech, nejběžnějšími z nich jsou druhy *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*, *A. brassicicola* a *A. solani* (Tralamazza et al. 2018). Rod *Alternaria* zahrnuje vláknité mikromycety vytvářející tmavě černé kolonie. Rozmnožuje se nepohlavními spory, které se nazývají konidie (obr. 7) (Andersen et al. 2015).



**Obrázek 7:** Konidie: A - *A. vaccinia*, B – *A. tomaticola* (Andersen et al. 2015)

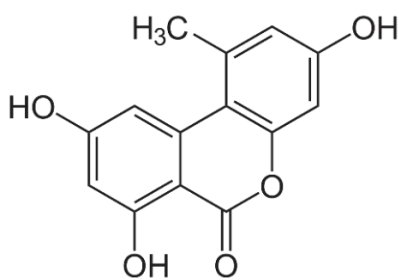
*Alternaria* je známý rostlinný patogen, který vyvolává řadu chorob rostlin, např. černou hnilobu rajčat, šedou hnilobu citrusových plodů a tečkovanou skvrnitost obilovin (Gotthardt et al. 2019). Způsobuje choroby u skoro 400 druhů rostlin, z nichž *A. alternata* infikuje téměř 100 druhů (Tralamazza et al. 2018). Je schopná růst a produkovat toxiny při nízkých teplotách (tab. 3), a proto kontaminuje potraviny i během přepravy a skladování v chladírenských podmínkách. Produkce mykotoxinů závisí na konkrétním druhu plísně, substrátu, na kterém roste, a faktorech vnějšího prostředí, z nichž dva nejdůležitější jsou vodní aktivita a teplota (Zhao et al. 2022).

**Tabulka 3:** Rozmezí teploty, vodní aktivity a pH pro klíčení, růst a produkci toxinů u rodu *Alternaria* (Lee et al. 2015)

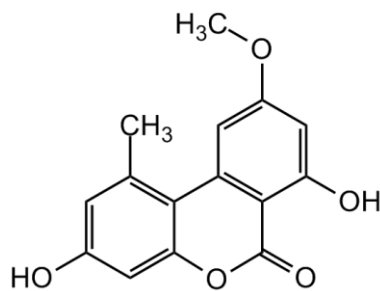
Faktory	Klíčivost	Růst	Produkce toxinů
Teplota (°C)	1-35	< 1 a > 35	<10 a >35
Vodní aktivita ( <i>A<sub>w</sub></i> )	0,84-0,995	< 0,85	< 0,90
pH	2,5-10	< 2,5 a > 10	< 2,5 a > 9

V současné době je známo více než 70 alternariových toxických metabolitů, z nichž se v potravinách nejčastěji vyskytuje alternariol (AOH), alternariolmonomethylether (AME), kyselina tenuazonová (TeA) a altenuen (ALT) (Tralamazza et al. 2018). *Alternaria* kontaminuje širokou škálu potravin rostlinného i živočišného původu. Nejvyšší množství AOH byly detekovány v pohance a rajčatech, AME nejčastěji kontaminuje ořechy a olejnatá semena, TeA nejvíc kontaminuje rajčata a výrobky z nich a má nejvyšší naměřené hodnoty ze všech alternariových mykotoxinů (EFSA et al. 2016).

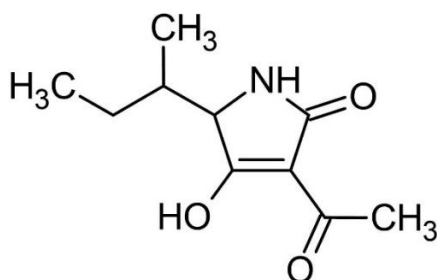
Z chemického hlediska alternariové mykotoxiny mají velmi rozmanitou strukturu. Vyskytují se ve formě dusíkatých sloučenin, steroidů, fenolů a dalších. Relevantní z toxikologického hlediska mykotoxiny lze klasifikovat jako skupinu dibenzo- $\alpha$ -pyronů, zahrnující AOH, AME a ALT, a deriváty tetramové kyseliny, jako je TeA (Tralamazza et al. 2018).



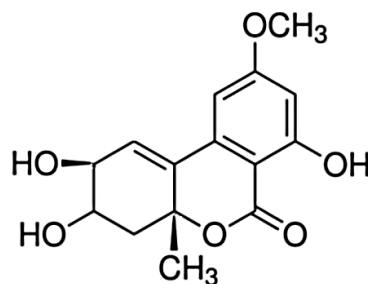
Obrázek 8: AOH



Obrázek 9: AME



Obrázek 10: TeA



Obrázek 11: ALT

AOH, AME a ALT zůstávají stabilní při kyselém pH, ale mohou být snadno degradovány v alkalickém prostředí. Alkalické podmínky však nejsou pro zpracování potravin běžné, a proto tyto mykotoxiny jsou ve většině případů odolné vůči zpracování (Puntscher et al. 2019). Studie Estiarte et al. (2018) zkoumala stabilitu dvou mykotoxinů *Alternaria* (AOH a AME) v rajčatových produktech v podmínkách simulujících komerční potravinářské zpracování. Hodnocenými výrobními fázemi bylo skladování syrových plodů při několika teplotních režimech (25, 30 a 35 °C), mytí rajčat a tepelné zpracování. Bylo zjištěno, že ke snížení koncentraci AOH došlo při skladování, ale pouze v tom případě, když rajčata byla skladována při teplotě 35 °C. U AME stačilo 12 hodin ke snížení počáteční koncentrace, bez ohledu na teplotu, při které byly vzorky skladovány. Během tepelného ošetření (80–110 °C) výsledky ukázaly, že zahřívání vzorků rajčat na 100 a 110 °C významně ovlivnilo stabilitu AOH, ale AME byl odolný vůči působení vysokých teplot.

Toxické účinky alternariových mykotoxinů jsou stále předmětem výzkumu (Gotthardt et al. 2019). AOH má genotoxické (Aichinger et al. 2019), imunotoxické (Huang et al. 2021), mutagenní a karcinogenní účinky (Schuchardt et al. 2014). Existuje předpoklad souvislosti mezi expozicí AOH a karcinomem jícnu (Xue et al. 2019). Poškození DNA indukované AOH je spojeno s oxidačním stresem a interakcí s topoizomerázami DNA. Uvádí se, že AOH působí jako inhibitor topoizomerázy I a II a v důsledku toho indukuje dvouřetězcové poškození DNA a následný vznik bodových mutací (Schuchardt et al. 2014).

Vzhledem k podobnosti chemické struktury AOH, AME a ALT a estradiolu, tyto mykotoxiny mohou ovlivnit hladiny progesteronu, estradiolu a expresi progesteronových receptorů. AOH může zvýšit hladiny těchto hormonů. Sekrece progesteronu a životaschopnost buněk jsou negativně ovlivněny jak AOH, tak AME, ale ne TeA. Kromě toho AOH a AME snižují množství klíčového enzymu v syntéze progesteronu, tj. enzymu štěpícího boční řetězec cholesterolu P450 (Aichinger et al. 2019).



TeA uplatňuje svůj toxický účinek prostřednictvím inhibice uvolňování nově vytvořených proteinů z ribozomů. Studie na zvířatech (potkani, myši, psi a opice) prokázaly schopnost TeA způsobovat zvracení, slinění, tachykardii, krvácení a hemoragickou gastroenteropatii, a proto lze předpokládat, že se toxicita TeA projevuje podobně u lidí (Gotthardt et al. 2019).

### 3.6.1 Vstup mykotoxinů do gastrointestinálního traktu

Mykotoxiny pronikají do těla člověka přes vdechovaný vzduch, kontakt s pokožkou, nejčastěji však vstupují do organismu při konzumaci kontaminovaných potravin rostlinného nebo živočišného původu (Omotayo et al. 2019).

Po absorpci mykotoxinů následuje jejich biotransformace a vyloučení z těla. Biotransformace mykotoxinů je definována jako všechny komplexní modifikace, které mění strukturu mykotoxinů chemickými reakcemi v těle. Biotransformace zahrnuje dvě odlišné fáze, a to fázi I a fázi II. Biotransformace umožňuje metabolitům vytvořeným během fáze I vstoupit do konjugačních procesů (fáze II), kdy toxické sloučeniny budou převedeny na neaktivní hydrofilní sloučeniny a následně vyloučeny močí. Ve fázi I může být mykotoxin oxidován, redukován nebo hydrolyzován. Reakce fáze II jsou známé jako konjugační reakce, které poskytují více hydrofilních funkčních skupin. Biotransformace vede ke snížení toxicity mykotoxinů, některé přeměny však mohou vést ke vzniku metabolitů s vyšší toxicitou, což je proces známý jako bioaktivace (Tran et al. 2020). Například, čistá forma AFB1 nemá žádnou mutagenní aktivitu. Biotransformace této sloučeniny prostřednictvím epoxidační reakce mění AFB1 na silně karcinogenní sloučeninu, která může rychle reagovat s DNA a RNA a vést k bodovým mutacím. Většina aflatoxinů je vylučována mezi 72 až 96 hodinami po expozici, přičemž játra a ledviny zadržují metabolity po delší dobu ve srovnání s jinými tkáněmi (Sobral et al. 2022). Mykotoxiny rodu *Alternaria* mají nízkou absorpci a vysokou rychlost vylučování (Puntscher et al. 2019). AOH je za 24 hodiny po vstupu do organismu vyloučeno fekálně 85–91 % a močí až 9 % (Schuchardt et al. 2014). Rychlé a téměř úplné vylučování močí bylo potvrzeno i u TeA. Předpokládaná nízká absorpce však neeliminuje toxikologické účinky vyvolané akutní nebo chronickou expozicí mykotoxinům (Puntscher et al. 2019).

K dosažení toxických účinků musí být mykotoxiny extrahované z potravinové matrice, absorbovány ve střevě a být dostupné v účinné koncentraci (De Ruyck et al. 2020). Tyto faktory zahrnuje pojem biologická dostupnost, což je množství mykotoxinů, které projde střevní bariérou v nezměněné formě a bude biologicky aktivní. Biodostupnost může sloužit indikátorem maximální absorpce toxinů, což je nejhorší scénář hodnocení rizika expozice mykotoxinům. Ve skutečnosti mohou být mykotoxiny v potravinách degradovány nebo modifikovány metabolickými procesy v lidském těle a pouze část původního obsahu může projít střevní membránou a dostat se do krevního řečiště (Tran et al. 2020).

Biologická dostupnost mykotoxinů je ovlivněna jejich rozpustností ve vodě (Sobral et al. 2022), potravinovou maticí, ve které se nachází, a její látkovým složením (Meca et al. 2012), přítomnosti dalších mykotoxinů a jejich interakcí (Sobral et al. 2022). Mykotoxiny přijímané s potravou obsahující vlákninu mají sníženou biodostupnost (Meca et al. 2012). Vliv kombinací mykotoxinů na jejich biodostupnost je pro každý mykotoxin odlišné. AFB1 má vyšší biologickou dostupnost (67,3 %) pokud je přijat najednou s OTA, než pokud je přijat izolovaně. Biologická dostupnost OTA je naopak nižší, pokud jídlo bylo kontaminované víc než jedním

mykotoxinem (52,8 %) v porovnání s izolovanou formou (72,4 %) (Sobral et al. 2022). Dalším faktorem ovlivňujícím biodostupnost mykotoxinu je jejich interakce s mikrobiotou trávicího traktu (Afshar et al. 2020).

### 3.6.2 Interakce mykotoxinů se střevní mikrobiotou

Vzhledem k tomu, že se mykotoxiny ve většině případů dostávají do organismu s potravou (Omotayo et al. 2019), GIT je prvním místem účinků mykotoxinů a taky místem jejich absorpce, která následně vede k systémové expozice mykotoxinům (Guerre 2020). Střevní mikrobiota proto představuje důležitý most mezi mykotoxiny a organismem hostitele (Jin et al. 2021).

Význam interakce mykotoxinů a střevní mikrobioty je možné vysvětlit několika důvody. Za prvé, střevní bakterie jsou schopny modifikovat toxický účinek mykotoxinů (Guerre 2020). Tyto změny nastávají díky různým mechanismům (tab. 4), z nichž nejčastějším je chemická transformace mykotoxinů enzymy přítomnými v buňkách bakterií nebo vylučovanými bakteriálními buňkami do střeva (Piotrowska 2021). Následky těchto přeměn se liší v závislosti na vzniklých metabolitech. Většinou mykotoxinů se hydrolyzují na méně toxické sloučeniny, jsou ale známe případy tzv. aktivace mykotoxinů, když metabolické procesy vedou ke vzniku více toxické sloučeniny (Tran et al. 2020).

**Tabulka 4:** Působení mikroorganismů na vybrané mykotoxiny (Piotrowska 2021)

Mikroorganismus	Mykotoxin	Mechanismus působení
<i>A. niger</i>	OTA	Biotransformace
<i>L. brevis</i>	OTA	Vazba na buněčnou stěnu
<i>L. plantarum</i>	ZEA	Vazba na buněčnou stěnu
<i>S. cerevisiae</i>	OTA	Vazba na buněčnou stěnu

Mezi probiotické mikroorganismy, které jsou schopny eliminovat nebo snižovat toxický účinek mykotoxinů patří BMK (nejčastěji *Lactobacillus* spp.) a kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) (Chlebicz and Śliżewska 2020). Při výzkumu (Crudo et al. 2021) interakci směsi 11 mykotoxinů produkovaných rodem *Alternaria* (včetně AOH, AME a TeA) a vybraných střevních bakterií bylo zjištěno, že bakteriální kmeny osidlující GIT člověka vykazují schopnost adsorbovat alternariové mykotoxiny a tím pádem snižovat jejich biologickou dostupnost a následnou toxicitu pro organismus. Uvádí se, že se mykotoxiny měly tendenci hromadit převážně uvnitř gramnegativních bakterií a jejich schopnost pronikat dovnitř bakteriálních buněk přímo souvisela s jejich lipofilitou.

Na druhou stranu interakce mykotoxinů s probiotiky negativně ovlivňuje složení střevní mikrobioty. V nezávislosti na tom, jestli mykotoxiny působí přímo na bakteriální buňky anebo nepřímo vytváří nepříznivé podmínky pro růst a rozvoj střevních bakterií, důsledkem je změna rovnováhy a následná dysbióza (Guerre 2020). Dysbióza vyvolána mykotoxiny může vést k

narušení střevní bariéry, zhoršení imunitní odpovědi, což může nakonec vést k systémové toxicitě a infekčním onemocněním. Dysbióza může taky být zodpovědnou za řadu chronických onemocnění, např. kolorektálního karcinomu a degenerativních onemocnění nervového systému. Podávání probiotických kultur pomáhá obnovit složení střevní mikrobioty a snížit negativní účinek mykotoxinů (Liew and Mohd-Redzwan 2018).

Dalším účinkem střevní mikrobioty je schopnost některých částí bakterií, především buněčné stěny, vázat mykotoxiny (Guerre 2020). Vazba mykotoxinů na buněčnou stěnu bakterií snižuje adsorpci toxinů, brání jejich průniku přes bariéru GITu do krevního řečiště a snižuje riziko toxického působení na organismus (Ghadaksaz et al. 2022). Jednotlivé druhy mikroorganismů mají odlišné složení buněčné stěny a jako následek různou adsorpční schopnost. Adsorpční kapacitu probiotik ovlivňují i další faktory, jako je koncentrace mikroorganismů a mykotoxinů, teplota a hodnoty pH (Luo et al. 2020). Například, snížení pH během fermentace jogurtu vedlo k většímu poklesu koncentrace AFM1 díky jejímu navázání na buněčnou stěnu BMK (Elsanhoty et al. 2014). Studie *in vitro* (Chlebicz and Śliżewska 2020) ukázala, že *L. rhamnosus*, *paracasei*, *reuteri*, *plantarum* a *pentosus* jsou schopny pomocí vazby na svoji buněčnou stěnu snížit koncentraci ZEA na 57 %, FB1 a FB2 na 51 %, T-2 na 62 %, DON na 30 % a AFB1 na 60 %.

Existuje jen málo informací o interakci mykotoxinů s probiotiky bezprostředně ve střevě, a proto je zapotřebí, aby toto téma bylo prozkoumáno dalšími studiemi (Liew and Mohd-Redzwan 2018). Z tohoto důvodu nás zajímalo, jaký vliv mají mykotoxiny rodu *Alternaria* na adhezi laktobacilů v *in vitro* modelu lidského střeva.

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Pro testování byly použity modely buněčných linií lidského kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2, které byly zakoupeny od American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, USA); bakteriální druhy *L. plantarum* a *L. gasei* a mykotoxiny AOH a AME zakoupeny od Sigma-Aldrich.

### 4.2 Metoda

#### 4.2.1 Kultivace buněčných linií

Nádorové buňky kolorektálního karcinomu linií Caco-2 a HT29 byly kultivovány v DMEM médiu 10% FBS, 1% roztoků penicilinu a streptomycinu, 1% pyruvátu sodného, 1% hydrogenuhličitanu sodného a 1% neesenciálních aminokyselin. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích s přidavkem 15 ml výše zmíněného média. Lahve byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou při teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Kultivace probíhala přibližně 7 dní, kdy každý druhý den docházelo k výměně media za čerstvé. Po 7 dnech kultivace byly buňky propláchnuty roztokem PBS, díky čemuž došlo k odstranění starého média. Po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu přibližně 3 minut. Následně byly vzorky 10 minut centrifugovány při 200 × g. Staré médium bylo odstraněno a buňky byly ředěny v médiu novém. Z této suspenze bylo odebráno 0,5 ml média s buňkami, které se přidaly k 15 ml nového média v kultivační lahvi a následovala další kultivace. Buněčná suspenze v poměru 1:10 byla přidána do nové kultivační láhve s čerstvým médiem a umístěna do CO<sub>2</sub> kultivačního boxu s teplotou 37 °C. Zbytek buněčné suspenze byl následně naředěn na požadované koncentrace pro založení 96-ti jamkových destiček.

#### 4.2.2 Založení 96-jamkových destiček

Z buněčné suspenze, která byla důkladně rozpuštěna, bylo odebráno 100 µl suspenze do zkumavky typu Eppendorf a smícháno se 100 µl tripanové modře. Následně bylo odebrán µl suspenze a nanášeno Bürkerovu komůrku na skleněné destičce. Destička byla vložena do přístroje na počítání buněk EVE – NanoEnTek a byla zjištěna přesná koncentrace buněk v 1 ml suspenze.

Následně byly buněčné linie naředěny médiem na konečnou koncentraci  $1 \times 10^5$  pro samostatné buněčné linie (Caco-2 buňky, HT29 buňky). Buněčná suspenze byla pipetována do 96-jamkové destičky v množství 200 µl a umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru s řízenou atmosférou při teplotě 37 °C s 5% CO<sub>2</sub> po dobu 3 dnů. Po 3 dnech došlo k plné konflucenci monovrstvy a buněčné kultury tak byly připraveny k testování.

#### 4.2.3 Příprava barviva

Pro přípravu barviva bylo naváženo 1 mg fluoresceinu isothiokyanátu (FITC). Barvivo bylo rozpuštěno ve 2,5 ml sodium bikarbonátu, výsledná koncentrace stanovila 400 µg/ml. Pro dosažení dostatečného rozpuštění barviva byl roztok vložen do ultrazvuku.

#### 4.2.4 Příprava bakteriální suspenze a barvení laktobacilů

Laktobacily byly pěstovány v MRS bujónu při 37 °C za anaerobních podmínek po dobu 24 hodin. Následně bylo odebráno 5 ml narostlé kultury do centrifugační zkumavky. Suspenze byla z centrifugována při 1000 × g otáčkách po dobu 10 minut, 3x promyta v PBS a následně rozmíchána v 5 ml PBS.

Ke každému kmenu po finálním rozpuštění pelety bylo pipetováno 312,5 µl předem připraveného FITC (konečná koncentrace byla 25 µg/ml), zkumavky byly vloženy do inkubátoru na 30 minut za tmy. Po inkubaci byly suspenze opět z centrifugovány při 1000 x g otáčkách, 3x propláchnuty pomocí PBS s následným rozpuštěním v 5ml stejného pufru.

#### 4.2.5 Testování adheze

Před přidáním bakteriální suspenze bylo z každé jamky destičky odstraněno staré médium a jednotlivé jamky byly dvakrát opatrně promyty pomocí 100 µl PBS. Do každé jamky bylo následně napipetováno 90 µl LAC media a přidáno 10 µl laktobacilů označených pomocí FITC.

Destička byla následně inkubována po dobu 90 minut v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Následně bylo médium s probiotiky a mykotoxiny odstraněno a monovrstvy buněčných linií byly 3× promyty 100 µl PBS pro odstranění nenaadherovaných probiotik. Potom bylo do nich opět napipetováno 100 µl PBS. Následně byla destička měřena na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při vlnové délce excitace 490 nm a emise 525 nm.

Pro výpočet adherovaných bakterií byl použit následující vzorec:

$$\text{Adherence (\%)} = \frac{\text{průměr samotných laktobacilů}}{\text{průměr laktobacilů s testovaným vzorkem}} \times 100$$

#### 4.2.6 Statistická analýza

Data byla vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Pro vyhodnocení byla použita oboustranná analýza rozptylu – ANOVA s následným použitím Tukeyho testu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné v hladině významnosti  $p \leq 0,05$ .

## 5 Výsledky

Cílem této práce bylo zjistit, zda přítomné mykotoxiny rodu *Alternaria* – AOH a AME ovlivní adhezivní vlastnosti probiotických bakterií *L. plantarum* a *L. gasseri*. Adherence byla vyjádřena jako procento bakterií adherovaných k počátečnímu počtu bakterií v médiu. K testování byly použity buněčné linie Caco-2 a HT29. Stanovení celkové adheze bylo provedeno dle metody, která je uvedena v kapitole 4.2.

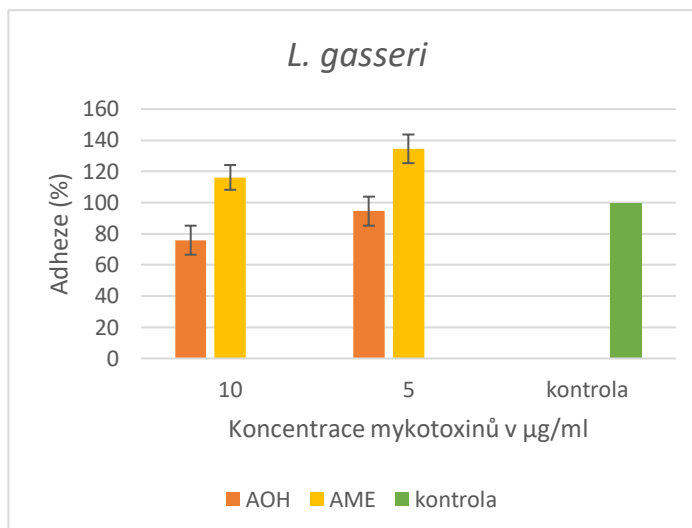
### 5.1 Adheze probiotik s mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích

Na buněčné linii Caco-2 většina vzorků *L. gasseri* a *L. plantarum* s přidávanými mykotoxiny rodu *Alternaria* adherovala méně, než kontrolní vzorky (tab. 5). Hodnoty adheze *L. gasseri* s AOH v koncentraci 10 µg/ml v průměru klesly o 24,11 % a s 5 µg/ml AOH o 5,49 % v porovnání s kontrolou bez AOH. Adheze *L. gasseri* s AME v koncentraci 10 µg/ml se zvýšila o 17,89 % a s 5 µg/ml AME až o 24,74 % oproti kontrolnímu vzorku bez AME (obr. 12). Hodnota adheze *L. plantarum* s AOH v koncentraci 10 µg/ml klesla o 24,87 % a o 6,12 % s přidávaným mykotoxinem v koncentraci 5 µg/ml v porovnání s kontrolou *L. plantarum* bez AOH. O něco méně hodnoty adheze *L. plantarum* klesly s 10 µg/ml AME, a to o 5,63 % a s 5 µg/ml AME o 10,78 % oproti kontrolnímu vzorku probiotika bez mykotoxinu AME (Obr. 13). Přidání mykotoxinů zvýšilo adhezi *L. gasseri* v porovnání s kontrolou, a to s přidáním AME v koncentraci 10 µg/ml o 16,17 % a s AME v koncentraci 5 µg/ml o 34,51 %.

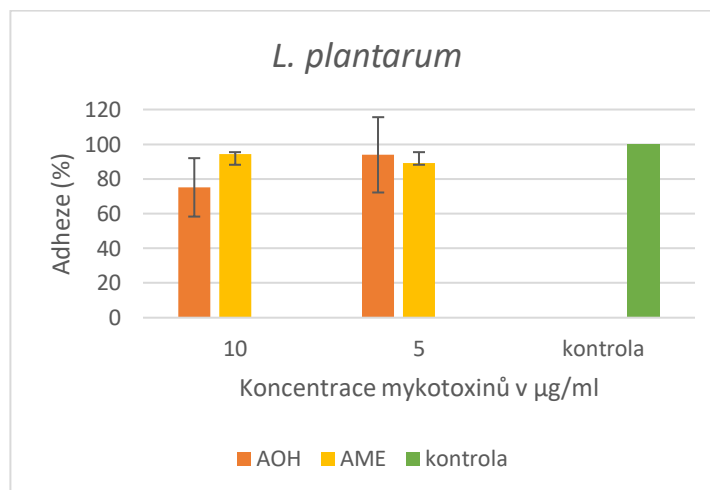
**Tabulka 5:** Výsledné adheze (průměr ± SD %) laktobacilů na Caco-2 buněčných liniích.

Mykotoxin	Koncentrace µg/ml	<i>L. gasseri</i>	<i>L. plantarum</i>
AOH	10	75,89 ± 7,95	75,13 ± 16,84
	5	94,51 ± 11,32	93,88 ± 21,71
AME	10	116,17 ± 19,72	94,37 ± 12,37
	5	134,51 ± 15,57	89,22 ± 22,69

Na těchto buněčných liniích byly zjištěny statisticky významné rozdíly adheze mezi *L. gasseri* s 10 µg/ml mykotoxinu AOH a kontrolním vzorkem bez přidávaných mykotoxinu, *L. gasseri* s 5 µg/ml AOH a *L. gasseri* s 10 µg/ml AME. Statisticky významné rozdíly byly taky zjištěny mezi *L. plantarum* s 10 µg/ml AOH a *L. plantarum* s 5 µg/ml AOH, a taky *L. plantarum* s přidávaným AME ve stejné koncentraci (tab. 7).



**Obrázek 12:** Adheze *L. gasseri* s přidáními mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether



**Obrázek 13:** Adheze *L. plantarum* s přidáními mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether

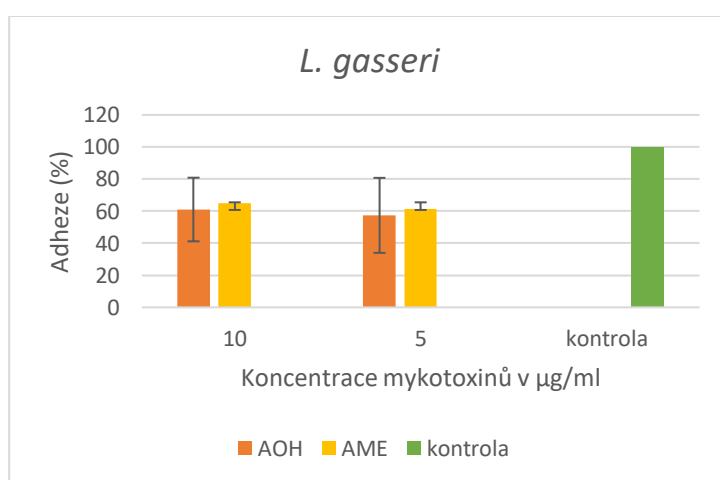
## 5.2 Adheze probiotik s mykotoxiny na HT29 buněčných liniích

Na HT29 buněčné linii obě probiotika adherovaly méně, než na Caco-2 buněčných liniích. Ke snížení adheze v porovnání s kontrolou došlo u všech vzorků (tab. 6). U *L. gasseri* hodnoty adheze s 10 µg/ml AOH klesly o 38,98 % a s 5 µg/ml AOH o 42,63 % oproti *L. gasseri* v kontrolním vzorku bez AOH. S 10 µg/ml AME hodnoty adheze *L. gasseri* klesly o 35,2 % a s 5 µg/ml AME až o 38,56 % oproti kontrole bez přítomnosti AME (obr.14). Hodnoty adheze *L. plantarum* po přidání 10 µg/ml AOH klesly o 26,91 % a po 5 µg/ml o 24,03 % v porovnání s kontrolním vzorkem bez AOH. Stejně tak po přidání AME v koncentraci 10 µg/ml hodnota adherence *L. plantarum* klesla o 23,7 % a po přidání 5 µg/ml AME o 30,45 % oproti kontrolnímu vzorku tohoto probiotika bez AME (obr. 15).

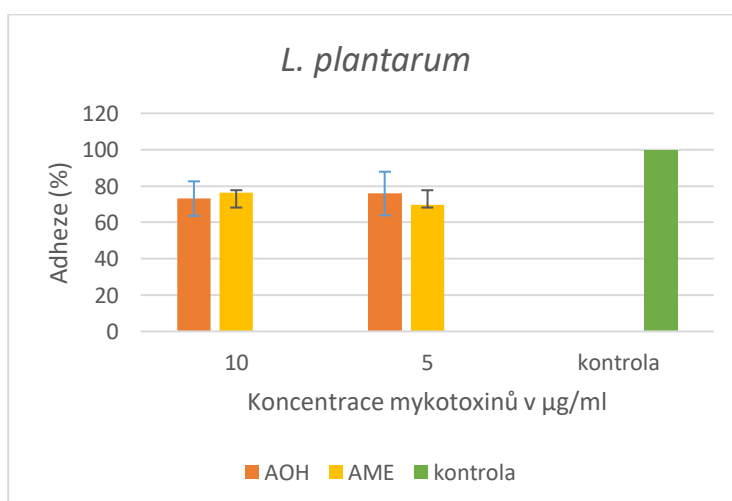
**Tabulka 6:** Výsledná adheze (průměr ± SD %) laktobacilů na HT29 buněčných liniích

Mykotoxin	Koncentrace µg/ml	<i>L. gasseri</i>	<i>L. plantarum</i>
AOH	10	61,02 ± 19,84	73,09 ± 9,49
	5	57,37 ± 23,39	75,86 ± 12,03
AME	10	64,8 ± 25,26	76,3 ± 12,09
	5	61,44 ± 14,99	69,55 ± 25,89

Stejně jako na Caco-2 buněčné linii, také na těchto buněčných liniích byly zjištěny statisticky významné rozdíly adheze, a to u *L. gasseri* v kontrolním vzorku bez přidaných mykotoxinů a *L. gasseri* s mykotoxinem AME v koncentraci 5 µg/ml, a taky u kontrolního vzorku a *L. plantarum* s AOH 10 µg/ml a vzorku s 5 µg/ml AME (tab. 7).



**Obrázek 14:** Adheze *L. gasseri* s přidanými mykotoxiny na HT29 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether



**Obrázek 15:** Adheze *L. plantarum* s přidanými mykotoxiny na HT29 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether



**Tabulka 7:** Statistické vyhodnocení adheze – Tukeyho metoda. Hladina významnosti  $p \leq 0,05$

**Tukeyův test pro významné rozdíly; proměnná adheze**

<b>Buněčné linie Caco-2</b>					
<b>Kmen+mykotoxin</b>	<i>L. gasseri</i> + AOH 10	<i>L. gasseri</i> + AOH 5	<i>L. gasseri</i> + AME 10	<i>L. gasseri</i> + AME 5	<i>L. gasseri</i> + 0 (kontrola)
<i>L. gasseri</i> + AOH 10	***	***	***		***
<i>L. gasseri</i> + AOH 5	***			***	N
<i>L. gasseri</i> + AME 10	***			***	N
<i>L. gasseri</i> + AME 5		***	***		N
<i>L. gasseri</i> + 0 (kontrola)	***	N	N	N	
	<i>L. plantarum</i> + AOH 10	<i>L. plantarum</i> + AOH 5	<i>L. plantarum</i> + AME 10	<i>L. plantarum</i> + AME 5	<i>L. plantarum</i> + 0 (kontrola)
<i>L. plantarum</i> + AOH 10		***	***		N
<i>L. plantarum</i> + AOH 5	***			***	N
<i>L. plantarum</i> + AME 10	***			N	N
<i>L. plantarum</i> + AME 5		***	N		N
<i>L. plantarum</i> + 0 (kontrola)	N	N	N	N	
<b>Buněčné linie HT29</b>					
<b>Kmen+mykotoxin</b>	<i>L. gasseri</i> + AOH 10	<i>L. gasseri</i> + AOH 5	<i>L. gasseri</i> + AME 10	<i>L. gasseri</i> + AME 5	<i>L. gasseri</i> + 0 (kontrola)
<i>L. gasseri</i> + AOH 10		N	N		N
<i>L. gasseri</i> + AOH 5				N	N
<i>L. gasseri</i> + AME 10	N			N	N
<i>L. gasseri</i> + AME 5		N	N		***
<i>L. gasseri</i> + 0 (kontrola)	N	N	N	***	
	<i>L. plantarum</i> + AOH 10	<i>L. plantarum</i> + AOH 5	<i>L. plantarum</i> + AME 10	<i>L. plantarum</i> + AME 5	<i>L. plantarum</i> + 0 (kontrola)
<i>L. plantarum</i> + AOH 10		N	N		***
<i>L. plantarum</i> + AOH 5	N			N	N
<i>L. plantarum</i> + AME 10	N			N	***
<i>L. plantarum</i> + AME 5		N	N		N
<i>L. plantarum</i> + 0 (kontrola)	***	N	***	N	

Jednotlivé kmeny spolu s přidávanými mykotoxiny v koncentracích 5 µg/ml nebo 10 µg/ml. V případě 0 se jedná o kontrolní vzorek bez přidávaných mykotoxinů. (\*\*\*) – mezi vzorky existuje statisticky významný rozdíl na hladině  $p < 0,05$ ; N – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl na hladině  $p < 0,05$ )

## 6 Diskuze

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity mikroskopických hub, které kontaminují potraviny rostlinného a živočišného původu. Expozice mykotoxinům představuje velké zdravotní riziko pro spotřebitele (De Ruyck et al. 2020). Negativní účinek mykotoxinů se nejčastěji projevuje jako karcinogenita, hepatotoxicita, nefrotoxicita, mutagenita a teratogenita (Ostry et al. 2017).

Do těla člověka se mykotoxiny mohou dostávat přes vdechovaný vzduch, kontakt s pokožkou, nejčastěji však vstupují do organismu při konzumaci kontaminovaných potravin (Omotayo et al. 2019). V poslední době mykotoxiny, včetně mykotoxinů rodu *Alternaria*, jsou často detekovány v čerstvých a zpracovaných potravinách a krmivech, a je velice pravděpodobné, že expozice těmto mykotoxinům vede ke změně střevní mikrobioty (Crudo et al. 2021). EFSA (2016) uvádí, že k nejvyšší hladině expozice alternariového mykotoxinu AOH u evropské populace dochází při konzumaci ovoce a zeleniny, k nejvyšší hladině expozice AME dochází při konzumaci rostlinných olejů, převážně slunečnicového. Maximální tolerovatelná denní dávka u těchto mykotoxinů stále není stanovena. Při hodnocení (De Ruyck et al. 2020) denní expozice mykotoxinům u dospělé evropské populace bylo zjištěno, že průměrný denní příjem AOH stanovil 699 ng a průměrný příjem AME stanovil 218 ng. V přepočtu se jednalo o průměrnou dávku 9,78 ng/kg hmotnosti u AOH a 2,98 ng/kg hmotnosti u AME. EFSA (2016) naznačuje, že nejvíc exponovanou skupinou evropské populace jsou batolata a děti ve věku od 3 do 10 let. Předpokládaná hladina denní expozice AOH u batolat je v rozmezí 3,8 až 71,6 ng/kg, u dětí ve věku od 3 do 10 let se tyto hodnoty pohybují v rozmezí 2 až 54,4 ng/kg/den. Expozice AME je o něco nižší a pohybuje se v rozmezí 3,4 až 38,8 ng/kg/den u batolat a 1,6 až 34,4 ng/kg/den u ostatních dětí.

Při perorálním vstupu do těla, GIT je prvním místem, se kterým mykotoxiny přichází do styku (Guerre 2020). Do kontaktu tak přichází i se střevní mikrobiotou, která GIT osidluje (De Ruyck et al. 2020). Při interakci mykotoxinů se střevní mikrobiotou dochází k ovlivnění adhezenčních vlastností bakterií a tím i jejich schopnosti ulpívat na stěnu GITu (Galdeano et al. 2019). Adheze umožňuje symbiózu mezi organismem hostitele a probiotickými bakteriemi, tím pádem umožňuje i zdravotní přínos, který probiotické bakterie poskytují (de Wouters et al. 2015), a to stimulace a regulace imunitní odpovědi hostitele (Galdeano et al. 2019), ovlivnění metabolických procesů v těle (Cremon et al. 2018) a ochrana před patogeny (Kerry et al. 2018).

Za účelem zjištění adhezenčních vlastností probiotických bakterií (*L. plantarum* a *L. gasseri*) po přidání mykotoxinů rodu *Alternaria* (AOH a AME) ve dvou různých koncentracích (5 a 10 µg/ml) v naší práci byly použity buněčné linie odvozené z kolorektálního adenokarcinomu, a to Caco-2 a HT29. Při porovnání (Laparra and Sanz 2009) procentuálních hodnot adheze probiotických mikroorganismů k těmto buněčným liniím bylo zjištěno, že bakterie adherují více ke Caco-2 buněčným liniím, než k HT29, což bylo vidět i v našem případě. Průměrné hodnoty adheze laktobacilů k Caco-2 buněčné linii v naší práci se pohybovaly v rozmezí 75,13 % až 134,51 %, kdyžto rozmezí adheze k HT29 buňkám bylo 61,02 % až 76,3 %. Lapparra and Sanz vysvětlují tyto rozdíly odlišnými molekulárními strukturami vybraných buněčných linií, které se účastní procesu adheze.

Adheze laktobacilů a jiných probiotik byla sledovaná v minulých letech provedením testů *in vitro* s použitím Caco-2, HT29 i jiných buněčných linií. V roce 1994 (Greene and Klaenhammer) byla zkoumaná schopnost vybraných kmenů laktobacilů adherovat k Caco-2

buněčným liniím a faktory, které mohou mít vliv na jejich adhezenci. Bylo zjištěno, že laktobacily izolované ze střeva člověka, a to *L. acidophilus* a *L. gasseri* adherovaly k buněčným liniím více, než *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolované z mléka. Byl taky pozorován významný vliv pH prostředí na adhezenci laktobacilů. Upravení pH kultivačního média na 4.2 oproti neupravenému médiu 6.5 vedlo ke zvýšení adheze u všech zkoumaných kmenů. Dále bylo zjištěno, že úroveň adheze je přímo úměrná množství KTJ přidaných do Caco-2. Tyto výsledky potvrzuje jiná studie (Tuomola and Salminen 1998), která navíc pozorovala významné rozdíly mezi adhezenčními schopnostmi jednotlivých kmenů laktobacilů. Při testování adheze 12 kmenů laktobacilů nejvyšší schopnost adherence v porovnání s kontrolou byla naměřena u *L. casei* a stanovila  $14.4 \pm 3.9$  %. Nejnižší adherence byla naměřena u *L. casei* var. *rhamnosus* a stanovila pouze  $2.6 \pm 0.69$  %. Z těchto výsledků bylo usouzeno, že pokud *in vitro* podmínky testu mohou být srovnatelné se situací *in vivo*, pětikrát vyšší množství *L. casei* var. *rhamnosus* by mělo být konzumováno v porovnání s *L. casei*, aby stejné množství bakterií adherovalo ke střevní sliznici. Toto tvrzení ale nebere v úvahu jiné faktory, které mají vliv na adhezenci probiotik k enterocytům, např. vliv mykotoxinů.

To, že expozice mykotoxinům ovlivňuje množství, složení a diverzitu střevní mikrobioty, naznačují četné studie (Crudo et al. 2021; Guo et al. 2014; Liew et al. 2018). Piotrowska et al. (2014) zkoumali vliv dvou mykotoxinů ZEA a DON na mikrobiotu tlustého střeva prasat, která byla rozdělena do čtyř skupin: podání ZEA, ZEA a DON najednou, DON a kontrolní skupiny. Experiment trval 42 dnů, mykotoxiny byly podávány v koncentraci 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hmotnosti. Sledoval se počet aerobních mezofilních bakterií, bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a BMK. Bylo zjištěno, že expozice mykotoxinům vedla ke změně množství aerobních mezofilních bakterií a *Enterobacteriaceae*, ale žádné statisticky významné změny ve množství BMK nebyly pozorovány. Jiná studie (Wang et al. 2016), sledující vliv AFB1 na změny složení střevní mikrobioty potkanů, prokázala negativní vliv tohoto mykotoxinu na diverzitu mikrobioty. V porovnání s kontrolní skupinou fylogenetická diverzita fekální mikrobioty potkanů měla pokles od 2 až do 78 %, přičemž diverzita se snižovala s vyšší koncentrací AFB1. Největší vliv mykotoxin měl na kmen *Lactobacillus*. K opačným výsledkům došla jiná studie (Guo et al. 2014), která zkoumala vliv OTA na složení střevní mikrobioty potkanů. Tento mykotoxin byl podáván ve dvou koncentracích (0,7 a 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hmotnosti) a po 28 dnech byl extrahován genetický materiál bakterií ze vzorků stolice. Bylo zjištěno, že podání OTA výrazně snížilo množství všech sledovaných rodů s výjimkou rodu *Lactobacillus*. Guo et al. uvádí, že *L. casei* a *L. plantarum* byly odolné vůči inhibičnímu účinku mykotoxinu, a proto použití laktobacilů by mohlo být vhodnou strategií pro odstranění mykotoxinů.

K podobným výsledkům došli i Kankaanpää et al. (2000) při zkoumání vlivu mykotoxinu AFB1 na adhezenční schopnosti *L. rhamnosus* GG. Adheze byla sledována na Caco-2 buněčné linii po přidání mykotoxinů v koncentraci 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Adheze daného probiotika klesla o 25 % v porovnání s kontrolou a tím pádem došlo k odstranění 78,5 % mykotoxinů. V naší práci se adheze *L. gasseri* ke Caco-2 buňkám po přidání AOH ve stejné koncentraci snížila o 5,49 %, adheze *L. plantarum* klesla o 6,12 %. AME ve stejné koncentraci měl větší vliv na snížení adheze laktobacilů. V případě *L. gasseri* se jednalo o snížení adheze o 24,74 %, adheze *L. plantarum* klesla o 10,78 % oproti kontrole. Je ale potřeba brát v úvahu, že v našem případě se jednalo o jiné druhy laktobacilů a mykotoxinů. Interakce s AFB1 byla zkoumána (Liew et al. 2018) i s jinými zástupci rodu *Lactobacillus*, a to s *L. casei* Shirota. Táto studie sledovala

schopnost *L. casei* Shirota, a to živých bakterií, teplem ošetřených bakterií a buněčné stěny bakterií, navázat AFB1 v různých koncentracích (2 do 10 µg/ml). Nejvyšší schopnost navázání mykotoxinu, a to až 98 %, vykazovaly živé bakteriální buňky. Podobných výsledků bylo dosaženo při testování interakce *L. paracasei* a mykotoxinu ZEA (Złoch et al. 2020).

Tian et al. (2022) zkoumali navázání mykotoxinu AFB1 na různé kmeny *L. plantarum* a zjistili, že rozdíly mohou být dané rozmanitostí struktur buněčných stěn, hlavně polysacharidů a kyseliny teichoové. Tak kmen *L. plantarum* T3 vykazoval nejvyšší míru adsorpce 68,5 %, nejnižší adsorpce byla naměřena u *L. plantarum* S12 a stanovila 15,97 %. Kromě toho, Tian et al. zkoumali různé faktory, které mohou ovlivnit vazbu mykotoxinů na povrch bakteriálních buněk. Byla porovnána míra adsorpce živých a teplem usmrcených buněk *L. plantarum* T3 a zjistilo se, že účinnost odstraňování AFB1 se zvýšila z 68,5 % u živých bakterií na 84 % u mrtvých buněk. Tian et al. vysvětluje tento rozdíl odlišností povrchu mrtvé bakteriální buňky a zvětšení její plochy pro kontakt s toxinem. Podobný jev pozorovala i Piotrowska (2014), když sledovala interakci vybraných kmenů laktobacilů s OTA. Adsorbce OTA živými buňkami v PBS médiu byla 14,8 % až 26,4 %, kdyžto teplem inaktivované bakterie vázaly OTA v rozmezí 46,2 % až 59,8 %. Výsledky z předložených studií poukazují na to, že interakce mykotoxinů s probiotickými organismy vede ke snížení adhezních schopností probiotik a zároveň k navázání mykotoxinů na bakteriální buňky, snížení jejich adsorbce a zvýšení jejich exkrece, což naznačuje potenciální roli probiotik jako detoxikačních činidel (Liew et al. 2018).

Poznátky z výše uvedených studií, stejně jako i výsledky naše práce, poukazují na to, že mykotoxiny (včetně AOH a AME z rodu *Alternaria*) mají vliv na adhezní schopnosti probiotik (včetně kmenu *Lactobacillus*) v gastrointestinálním traktu člověka, což je v souladu s naší hypotézou. Kromě toho, snížení adheze probiotik vede ke změně složení střevní mikrobioty, což se následně projevuje jako dysbióza a spojené s ní zdravotní komplikace (Crudo et al. 2021). Jak uvádí Wang et al. (2016) a Guo et al. (2014), ovlivněním diverzity střevní mikrobioty může docházet k poruchám imunitní odpovědi hostitele, narušení střevní bariéry a zvýšenému riziku vzniku infekčních a neinfekčních onemocnění.

Vzhledem k dobře známému vztahu složení mikrobioty a zdraví hostitele, je potřeba, aby další studie prozkoumali *in vivo* vliv mykotoxinů, včetně alternariových, na různé kmeny probiotických bakterií a zhodnotili spojené s tím riziko pro zdraví člověka. Je taky zapotřebí, aby byla prostudována role střevní mikrobioty v modulaci negativního efektu mykotoxinů na zdraví hostitele (Crudo et al. 2021).

## 7 Závěr

V této diplomové práci byl prokázán vliv mykotoxinů rodu *Alternaria*, a to AOH a AME, na adhezní schopnosti probiotických kmenů *L. gasseri* a *L. plantarum* na buňky v *in vitro* modelu Caco-2 a HT29. Hypotéza tvrdící, že po styku probiotických bakterií s mykotoxiny může docházet ke změně adhezních vlastností bakterií, byla potvrzena konkrétně u vzorků *L.gasseri* na Caco-2 linii s přidáním AOH v koncentraci 10 µg/ml, *L. gasseri* na HT29 s přidáním AME v koncentraci 5 µg/ml a u *L. plantarum* na HT29 s AOH v koncentraci 10 µg/ml a AME ve stejné koncentraci.

Ve dvou případech došlo ke zvýšení hodnot adheze, a to u vzorků *L. gasseri* na Caco-2 buněčné linii, kde se hodnoty adheze zvýšily oproti kontrole po přidání AME v koncentraci 10 µg/ml o 16,17 % a po přidání AME v koncentraci 5 µg/ml o 34,51 %.

S ohledem na častý výskyt mykotoxinů v potravinách a jejich významné negativní účinky na lidské zdraví, včetně škodlivého vlivu na střevní mikrobiotu, je toto téma stále aktuální a vyžaduje další výzkum. Je potřeba, aby byly prostudovány interakce jiných mykotoxinů se zástupci mikrobioty GITu člověka, a taky jejich synergický vliv na probiotické organismy. Vazba mykotoxinu na povrch buněčných stěn probiotických bakterií potenciálně může chránit organismus hostitele před expozicí a následným toxickým efektem mykotoxinů, a proto je zapotřebí, aby byly prostudovány další možnosti použití probiotik jako detoxikačních činidel.

## 8 Literatura

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine* 6(**237**):237ra265-237ra265.
- Abriouel H, Muñoz MdCC, Lerma LL, Montoro BP, Bockelmann W, Pichner R, Kabisch J, Cho G-S, Franz CM, Gálvez A. 2015. New insights in antibiotic resistance of lactobacillus species from fermented foods. *Food Research International* **78**:465-481.
- Afshar P, Shokrzadeh M, Raeisi SN, Ghorbani-HasanSaraei A, Nasiraii LR. 2020. Aflatoxins biotransformation strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon* **178**:50-58.
- Aichinger G, Krüger F, Puntschner H, Preindl K, Warth B, Marko D. 2019. Naturally occurring mixtures of alternaria toxins: Anti-estrogenic and genotoxic effects in vitro. *Archives of toxicology* **93**:3021-3031.
- Akagawa S, Tsuji S, Onuma C, Akagawa Y, Yamaguchi T, Yamagishi M, Yamanouchi S, Kimata T, Sekiya S-i, Ohashi A. 2019. Effect of delivery mode and nutrition on gut microbiota in neonates. *Annals of Nutrition and Metabolism* **74**:132-139.
- Alshannaq A, Yu J-H. 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health* **14**:632.
- Andersen B, Nielsen KF, Pinto VF, Patriarca A. 2015. Characterization of alternaria strains from argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology* **196**:1-10.
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas K-AG, Tsakalidou E, Nychas G-JE, Panagou EZ, Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology* **33**:282-291.
- Ashaolu TJ, Ashaolu JO, Adeyeye SA. 2021. Fermentation of prebiotics by human colonic microbiota in vitro and short-chain fatty acids production: A critical review. *Journal of Applied Microbiology* **130**:677-687.
- Azad M, Kalam A, Sarker M, Li T, Yin J. 2018. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: An overview. *BioMed research international*. 2018.
- Behbahani BA, Noshad M, Falah F. 2019. Inhibition of escherichia coli adhesion to human intestinal caco-2 cells by probiotic candidate lactobacillus plantarum strain 115. *Microbial pathogenesis* **136**:103677.
- Braun MS, Wink M. 2018. Exposure, occurrence, and chemistry of fumonisins and their cryptic derivatives. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **17**:769-791.
- Camilleri M. 2021. Human intestinal barrier: Effects of stressors, diet, prebiotics, and probiotics. *Clinical and translational gastroenterology* **12**.
- Chen P, Xiang B, Shi H, Yu P, Song Y, Li S. 2020. Recent advances on type a trichothecenes in food and feed: Analysis, prevalence, toxicity, and decontamination techniques. *Food Control* **118**:107371.
- Chlebicz A, Śliżewska K. 2020. In vitro detoxification of aflatoxin b 1, deoxynivalenol, fumonisins, t-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus lactobacillus and saccharomyces cerevisiae yeast. *Probiotics and antimicrobial proteins* **12**:289-301.
- Cordonnier C, Thévenot J, Etienne-Mesmin L, Denis S, Alric M, Livrelli V, Blanquet-Diot S. 2015. Dynamic in vitro models of the human gastrointestinal tract as relevant tools to

- assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota. *Microorganisms* **3**:725-745.
- Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. 2018. Pre-and probiotic overview. *Current opinion in pharmacology* **43**:87-92.
- Crudo F, Aichinger G, Mihajlovic J, Varga E, Dellafiora L, Warth B, Dall'Asta C, Berry D, Marko D. 2021. Interactions of alternaria mycotoxins, an emerging class of food contaminants, with the gut microbiota: A bidirectional relationship. *A Toxicological Evaluation of the Interactions between Alternaria Mycotoxins, Food Constituents and Gut Microbiota: Implications for Human Health* **129**.
- da Silva MN, Tagliapietra BL, do Amaral Flores V, dos Santos Richards NSP. 2021. In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science* **4**:320-325.
- Dahal S, Lee HJ, Gu K, Ryu D. 2016. Heat stability of ochratoxin a in an aqueous buffered model system. *Journal of food protection* **79**:1748-1752.
- De Ruyck K, Huybrechts I, Yang S, Arcella D, Claeys L, Abbeddou S, De Keyzer W, De Vries J, Ocke M, Ruprich J. 2020. Mycotoxin exposure assessments in a multi-center european validation study by 24-hour dietary recall and biological fluid sampling. *Environment international* **137**:105539.
- de Wouters T, Jans C, Niederberger T, Fischer P, Rühls PA. 2015. Adhesion potential of intestinal microbes predicted by physico-chemical characterization methods. *PLoS One* **10**:e0136437.
- Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. 2013. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microbial ecology* **65**:763-772.
- Diaz-Garrido N, Fábrega M-J, Vera R, Giménez R, Badia J, Baldomà L. 2019. Membrane vesicles from the probiotic nissle 1917 and gut resident escherichia coli strains distinctly modulate human dendritic cells and subsequent t cell responses. *Journal of Functional Foods* **61**:103495.
- Duar RM, Lin XB, Zheng J, Martino ME, Grenier T, Pérez-Muñoz ME, Leulier F, Gänzle M, Walter J. 2017. Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus lactobacillus. *FEMS microbiology reviews* **41**:S27-S48.
- EFSA, Arcella D, Eskola M, Gómez Ruiz JA. 2016. Dietary exposure assessment to alternaria toxins in the european population. *EFSA Journal* **14**:e04654.
- EFSA, Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, Bignami M, Brüschweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B, Dinovi M, Edler L. 2018. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *EFSA Journal* **16**:e05242.
- Elsanhoty RM, Salam SA, Ramadan MF, Badr FH. 2014. Detoxification of aflatoxin m1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food control* **43**:129-134.
- Estiarte N, Crespo-Sempere A, Marín S, Ramos A, Worobo R. 2018. Stability of alternariol and alternariol monomethyl ether during food processing of tomato products. *Food chemistry* **245**:951-957.
- Everard A, Matamoros S, Geurts L, Delzenne NM, Cani PD. 2014. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade

- inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. *MBio* **5**:e01011-01014.
- Galdeano CM, Cazorla SI, Dumit JML, Vélez E, Perdígón G. 2019. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism* **74**:115-124.
- Ghadaksaz A, Nodoushan SM, Sedighian H, Behzadi E, Fooladi AAI. 2022. Evaluation of the role of probiotics as a new strategy to eliminate microbial toxins: A review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **1**-14.
- Gilbert-Sandoval I, Wesseling S, Rietjens IM. 2020. Predicting the acute liver toxicity of aflatoxin b1 in rats and humans by an in vitro–in silico testing strategy. *Molecular nutrition & food research* **64**:2000063.
- Gotthardt M, Asam S, Gunkel K, Moghaddam AF, Baumann E, Kietz R, Rychlik M. 2019. Quantitation of six alternaria toxins in infant foods applying stable isotope labeled standards. *Frontiers in microbiology* **10**:109.
- Greene JD, Klaenhammer TR. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human caco-2 cells. *Applied and environmental microbiology* **60**:4487-4494.
- Guerre P. 2020. Mycotoxin and gut microbiota interactions. *Toxins* **12**:769.
- Guo M, Huang K, Chen S, Qi X, He X, Cheng W-H, Luo Y, Xia K, Xu W. 2014. Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin a and gut microbiota. *Toxicological Sciences* **141**:314-323.
- Gómez NC, Ramiro JM, Quecan BX, de Melo Franco BD. 2016. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (lab) biofilms for the control of listeria monocytogenes, salmonella typhimurium, and escherichia coli o157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology* **8**:63.
- Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z, Liu J, Lv L, Ling Z, Berglund B. 2021. Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **11**:609722.
- Heussner AH, Bingle LE. 2015. Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins* **7**:4253-4282.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* **11**:506–514
- Hou L, Yuan X, Le G, Lin Z, Gan F, Li H, Huang K. 2021. Fumonisin b1 induces nephrotoxicity via autophagy mediated by mtorc1 instead of mtorc2 in human renal tubule epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* **149**:112037.
- Hu R, Lin H, Li J, Zhao Y, Wang M, Sun X, Min Y, Gao Y, Yang M. 2020. Probiotic escherichia coli nissle 1917-derived outer membrane vesicles enhance immunomodulation and antimicrobial activity in raw264. 7 macrophages. *BMC microbiology* **20**:1-13.
- Huang C-H, Wang F-T, Chan W-H. 2021. Alternariol exerts embryotoxic and immunotoxic effects on mouse blastocysts through ros-mediated apoptotic processes. *Toxicology Research* **10**:719-732



- Imaoka T, Yang J, Wang L, McDonald MG, Afsharinejad Z, Bammler TK, Van Ness K, Yeung CK, Rettie AE, Himmelfarb J. 2020. Microphysiological system modeling of ochratoxin a-associated nephrotoxicity. *Toxicology* **444**:152582.
- Ismail A, Gonçalves BL, de Neeff DV, Ponzilacqua B, Coppa CF, Hintzsche H, Sajid M, Cruz AG, Corassin CH, Oliveira CA. 2018. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International* **113**:74-85.
- Jin J, Beekmann K, Ringø E, Rietjens IM, Xing F. 2021. Interaction between food-borne mycotoxins and gut microbiota: A review. *Food Control* **126**:107998.
- Juge N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in microbiology* **20**:30-39.
- Jørgensen MR, Kragelund C, Jensen PØ, Keller MK, Twetman S. 2017. Probiotic lactobacillus reuteri has antifungal effects on oral candida species in vitro. *Journal of oral microbiology* **9**:1274582.
- Kankaanpää P, Tuomola E, El-Nezami H, Ahokas J, Salminen SJ. 2000. Binding of aflatoxin b1 alters the adhesion properties of lactobacillus rhamnosus strain gg in a caco-2 model. *Journal of Food Protection* **63**:412-414.
- Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin H-S, Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis* **26**:927-939.
- Laparra JM, Sanz Y. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* **49**:695-701.
- Lau E, Neves JS, Ferreira-Magalhães M, Carvalho D, Freitas P. 2019. Probiotic ingestion, obesity, and metabolic-related disorders: Results from nhanes, 1999–2014. *Nutrients* **11**:1482.
- Lebrun B, Tardivel C, Félix B, Abysique A, Troadec J-D, Gaigé S, Dallaporta M. 2015. Dysregulation of energy balance by trichothecene mycotoxins: Mechanisms and prospects. *Neurotoxicology* **49**:15-27.
- Liew W-P-P, Mohd-Redzwan S. 2018. Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **8**:60.
- Liew W-P-P, Nurul-Adilah Z, Than LT, Mohd-Redzwan S. 2018. The binding efficiency and interaction of lactobacillus casei shirota toward aflatoxin b1. *Frontiers in microbiology* **9**:1503.
- Loiseau N, Polizzi A, Dupuy A, Therville N, Rakotonirainy M, Loy J, Viadere J-L, Cossalter A-M, Bailly J-D, Puel O. 2015. New insights into the organ-specific adverse effects of fumonisin b1: Comparison between lung and liver. *Archives of toxicology* **89**:1619-1629.
- Luo Y, Liu X, Yuan L, Li J. 2020. Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology* **96**:127-134.
- Majewska K, Kręgielska-Narożna M, Jakubowski H, Szulińska M, Bogdański P. 2020. The multispecies probiotic effectively reduces homocysteine concentration in obese women: A randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of clinical medicine* **9**:998.
- Markowiak-Kopec P, Śliżewska K. 2020. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients* **12**:1107.

- McFarland LV. 2021. Efficacy of single-strain probiotics versus multi-strain mixtures: Systematic review of strain and disease specificity. *Digestive diseases and sciences* **66**:694-704.
- Meca G, Meneghelli G, Ritieni A, Mañes J, Font G. 2012. Influence of different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor fusarium mycotoxin beauvericin. *Food and chemical toxicology* **50**:1362-1368.
- Milani C, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, van Sinderen D, Ventura M. 2016. Genomics of the genus bifidobacterium reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:980-991.
- Milani J. 2013. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Veterinari Medicina* **58**:405–411.
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology* **103**:6463-6472.
- Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. 2016. Sensitive quantitative analysis of the meconium bacterial microbiota in healthy term infants born vaginally or by cesarean section. *Frontiers in microbiology* **7**:1997.
- Newton DF, Macfarlane S, Macfarlane GT. 2013. Effects of antibiotics on bacterial species composition and metabolic activities in chemostats containing defined populations of human gut microorganisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**:2016-2025.
- Nguyen TMP, Lee YK, Zhou W. 2012. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. *Food Chemistry* **130**:866-874.
- O'callaghan A, Van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in microbiology* **7**:925.
- Omotayo OP, Omotayo AO, Mwanza M, Babalola OO. 2019. Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological research* **35**:1-7.
- Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y. 2017. Mycotoxins as human carcinogens—the iarc monographs classification. *Mycotoxin research* **33**:65-73.
- Piotrowska M. 2014. The adsorption of ochratoxin a by lactobacillus species. *Toxins* **6**:2826-2839.
- Piotrowska M. 2021. Microbiological decontamination of mycotoxins: Opportunities and limitations. *Toxins* **13**:819.
- Piotrowska M, Śliżewska K, Nowak A, Zielonka Ł, Żakowska Z, Gajęcka M, Gajęcki M. 2014. The effect of experimental fusarium mycotoxicosis on microbiota diversity in porcine ascending colon contents. *Toxins* **6**:2064-2081.
- Puntscher H, Aichinger G, Grabher S, Attakpah E, Krüger F, Tillmann K, Motschnig T, Hohenbichler J, Braun D, Plasenzotti R. 2019. Bioavailability, metabolism, and excretion of a complex alternaria culture extract versus altertoxin ii: A comparative study in rats. *Archives of toxicology* **93**:3153-3167.
- Qi W, Liang X, Yun T, Guo W. 2019. Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. *Journal of food science and technology* **56**:1398-1404.

- Rai A, Das M, Tripathi A. 2020. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical reviews in food science and nutrition* **60**:2710-2729.
- Rajoka MSR, Shi J, Mehwish HM, Zhu J, Li Q, Shao D, Huang Q, Yang H. 2017. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Science and Human Wellness* **6**:121-130.
- Riley RT, Merrill AH. 2019. Ceramide synthase inhibition by fumonisins: A perfect storm of perturbed sphingolipid metabolism, signaling, and disease [s]. *Journal of lipid research* **60**:1183-1189.
- Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Miyagusuku-Cruzado G, Giusti MM, Jiménez-Flores R, García-Cano I. 2020. Growth of lactic acid bacteria in milk phospholipids enhances their adhesion to caco-2 cells. *Journal of Dairy Science* **103**:7707-7718.
- Rodríguez-Sánchez S, Ramos IM, Seseña S, Poveda JM, Palop ML. 2021. Potential of lactobacillus strains for health-promotion and flavouring of fermented dairy foods. *LWT* **143**:111102.
- Régnier M, Polizzi A, Lukowicz C, Smati S, Lasserre F, Lippi Y, Naylies C, Laffitte J, Bétoulières C, Montagner A. 2019. The protective role of liver x receptor (lrx) during fumonisin b1-induced hepatotoxicity. *Archives of toxicology*. 93(2):505-517.
- Salveti E, Torriani S, Felis GE. 2012. The genus lactobacillus: A taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins* **4**:217-226.
- Schatzmayr G, Streit E. 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: Facts and figures. *World Mycotoxin Journal* **6**:213-222.
- Schuchardt S, Ziemann C, Hansen T. 2014. Combined toxicokinetic and in vivo genotoxicity study on alternaria toxins. *EFSA Supporting Publications* **11**:679E.
- Selma-Royo M, García-Mantrana I, Calatayud M, Parra-Llorca A, Martínez-Costa C, Collado MC. 2021. Maternal diet during pregnancy and intestinal markers are associated with early gut microbiota. *European Journal of Nutrition* **60**:1429-1442.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology* **14**:e1002533.
- Shin HS, Lee HJ, Pyo MC, Ryu D, Lee K-W. 2019. Ochratoxin a-induced hepatotoxicity through phase i and phase ii reactions regulated by ahr in liver cells. *Toxins*. 11(7):377.
- Shori AB. 2017. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI journal of biosciences* **24**:1-5.
- Sobral MMC, Gonçalves T, Martins ZE, Bäuerl C, Cortés-Macías E, Collado MC, Ferreira IM. 2022. Mycotoxin interactions along the gastrointestinal tract: In vitro semi-dynamic digestion and static colonic fermentation of a contaminated meal. *Toxins* **14**:28.
- Thakur N, Rokana N, Panwar H. 2016. Probiotics, selection criteria, safety and role in health and. *Journal of Innovative Biology January* **3**:259-270.
- Tian M, Zhang G, Ding S, Jiang Y, Jiang B, Ren D, Chen P. 2022. Lactobacillus plantarum t3 as an adsorbent of aflatoxin b1 effectively mitigates the toxic effects on mice. *Food Bioscience* **49**:101984.
- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase CHT, de Oliveira Rocha L. 2018. Toxigenic alternaria species: Impact in cereals worldwide. *Current opinion in food science* **23**:57-63.
- Tran VN, Viktorová J, Ruml T. 2020. Mycotoxins: Biotransformation and bioavailability assessment using caco-2 cell monolayer. *Toxins* **12**:628.

- Tuomola EM, Salminen SJ. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy lactobacillus strains to caco-2 cell cultures. *International journal of food microbiology* **41**:45-51.
- Turroni F, Van Sinderen D, Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus bifidobacterium. *International journal of food microbiology* **149**:37-44.
- Vertzoni M, Augustijns P, Grimm M, Koziolok M, Lemmens G, Parrott N, Pentafragka C, Reppas C, Rubbens J, Van Den Abeele J. 2019. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An ungap review. *European journal of pharmaceutical sciences* **134**:153-175.
- Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJ. 2017. The prenatal gut microbiome: Are we colonized with bacteria in utero? *Pediatric obesity* **12**:3-17.
- Wang J, Tang L, Glenn TC, Wang J-S. 2016. Aflatoxin b1 induced compositional changes in gut microbial communities of male f344 rats. *Toxicological Sciences* **150**:54-63.
- Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, Bai X, Xie J, Wang Y, Geng W. 2021. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**:612285.
- Xu Z, Knight R. 2015. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *British Journal of Nutrition* **113**:S1-S5.
- Xue KS, Tang L, Sun G, Wang S, Hu X, Wang J-S. 2019. Mycotoxin exposure is associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma in huaian area, china. *Bmc Cancer* **19**:1-10.
- Yasmin F, Tun HM, Konya TB, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Subbarao P. 2017. Cesarean section, formula feeding, and infant antibiotic exposure: Separate and combined impacts on gut microbial changes in later infancy. *Frontiers in pediatrics* **5**:200.
- Yunes R, Poluektova E, Dyachkova M, Klimina K, Kovtun A, Averina O, Orlova V, Danilenko V. 2016. Gaba production and structure of gadb/gadc genes in lactobacillus and bifidobacterium strains from human microbiota. *Anaerobe* **42**:197-204.
- Zhang H, Yeh C, Jin Z, Ding L, Liu BY, Zhang L, Dannelly HK. 2018. Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. *Synthetic and systems biotechnology* **3**:113-120.
- Zhao X, Liu D, Yang X, Zhang L, Yang M. 2022. Detection of seven alternaria toxins in edible and medicinal herbs using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry: X* **13**:100186.
- Złoch M, Rogowska A, Pomastowski P, Railean-Plugaru V, Walczak-Skierska J, Rudnicka J, Buszewski B. 2020. Use of lactobacillus paracasei strain for zearalenone binding and metabolism. *Toxicon* **181**:9-18.

## 9 Seznam tabulek a obrázků

### 9.1 Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Hlavní mykotoxiny a limity pro jejich množství v potravinách .....	18
<b>Tabulka 2:</b> Optimální teplota a vodní aktivita pro produkci vybraných mykotoxinů.....	18
<b>Tabulka 3:</b> Rozmezí teploty, vodní aktivity a pH pro klíčení, růst a produkci toxinů u rodu <i>Alternaria</i> .....	23
<b>Tabulka 4:</b> Působení mikroorganismů na vybrané mykotoxiny .....	26
<b>Tabulka 5:</b> Výsledné adheze (průměr ± SD %) laktobacilů na Caco-2 buněčných liniích....	30
<b>Tabulka 6:</b> Výsledná adheze (průměr ± SD %) laktobacilů na HT29 buněčných liniích.....	32
<b>Tabulka 7:</b> Statistické vyhodnocení adheze – Tukeyho metoda .....	33

### 9.2 Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Gastrointestinální trakt člověka .....	9
<b>Obrázek 2:</b> Aflatoxin B1 .....	20
<b>Obrázek 3:</b> Ochratoxin A .....	21
<b>Obrázek 4:</b> FB1 .....	21
<b>Obrázek 5:</b> T-2 toxin .....	22
<b>Obrázek 6:</b> ZEA .....	22
<b>Obrázek 7:</b> Konidie: A - <i>A. vaccinia</i> , B – <i>A.tomaticola</i> .....	23
<b>Obrázek 8:</b> AOH .....	24
<b>Obrázek 9:</b> AME .....	24
<b>Obrázek 10:</b> TeA.....	24
<b>Obrázek 11:</b> ALT .....	24
<b>Obrázek 12:</b> Adheze <i>L. gasseri</i> s přidanými mykotoxiny na Caco-2 .....	31
<b>Obrázek 13:</b> Adheze <i>L. plantarum</i> s přidanými mykotoxiny na Caco-2 .....	31
<b>Obrázek 14:</b> Adheze <i>L. gasseri</i> s přidanými mykotoxiny na HT29 .....	32
<b>Obrázek 15:</b> Adheze <i>L. plantarum</i> s přidanými mykotoxiny na HT29 .....	32

## **10 Seznam použitých zkratek a symbolů**

**AF** Aflatoxiny B1, B2, G1, G2, M1, M2

**AFB1** Aflatoxin B1

**ALT** Altenuen

**AME** Alternariol monomethyl ether

**AOH** Alternariol

**BMI** Body mass index

**BMK** Bakterie mléčného kvašení

**DON** Deoxynivalenon

**DNA** Deoxyribonukleová kyselina

**EFSA** Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)

**FAO** Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)

**FB1** Fumonisin B1

**GIT** Gastrointestinální trakt

**HDL** Vysokodenzitní lipoprotein

**HT-2** HT-2 toxin

**IARC** Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (The International Agency for Research on Cancer)

**KTJ** Kolonie tvořící jednotky

**LDL** Nízkodenzitní lipoprotein

**OT** Ochratoxiny A, B

**OTA** Ochratoxin A

**PBS** Fosfátový pufr

**SCFA** Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

**T-2** T-2 toxin

**TeA** Tenuazonová kyselina

**TCTC** Trichoheceny A, B, C, D

**WHO** Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

**ZEA** Zearalenon