

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Vliv mykotoxinů na adhezi probiotických mikroorganismů

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika Pálenská

Obor studia: Výživa a potravin

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

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv mykotoxinů na adhezi probiotických mikroorganismů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, ochotu, přátelský přístup, a především trpělivost a čas, který mi v průběhu zpracování této práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala své rodině a partnerovi za podporu během celé doby studia.

Vliv mykotoxinů na adhezi probiotických mikroorganismů

Souhrn

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní s nepříznivým vlivem na savce prostřednictvím krmiv a potravin. Nejčastější kontaminanty rostlinných produktů jsou aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, fumonisiny, trichotheceny a plísně rodu *Alternaria* spp., známé také jako černá plíseň. Mykotoxiny kontaminují širokou škálu potravin, nejčastěji se jedná o obiloviny, ale také například ořechy a olejnatá semena, kávová a kakaová zrna, víno, koření či sušené ovoce. Na kontaminovaném substrátu se často vyskytuje více než jeden druh mykotoxinu. Choroby způsobené expozicí mykotoxinům jsou označovány jako mykotoxikózy a dochází k nim po konzumaci kontaminovaného krmiva nebo potravin, při kontaktu s pokožkou či inhalací. Dlouhodobý příjem může mít teratogenní, neurotoxické, mutagenní a karcinogenní účinky. Hospodářská zvířata vystavená mykotoxinům vstřebávají a akumulují toxiny v živočišných tkáních. Prostřednictvím masa, mléka a vajec tak mohou mykotoxiny následně přecházet do potravního řetězce člověka.

Z tohoto důvodu je snaha takto kontaminované produkty zbavovat mykotoxinů. Jedná se o fyzikální, chemické a biologické technologie. Účelem těchto metod je odstranit nebo inaktivovat mykotoxiny z potravin bez současné produkce toxických reziduí a ovlivnění nutriční hodnoty produktu. Jelikož jsou některé druhy plísní rezistentní vůči chemickému a tepelnému ošetření, upřednostňuje se detoxikace mykotoxinů pomocí biologické transformace. Pro detoxikaci mykotoxinů lze využít řadu mikroorganismů, mezi něž patří bakterie, kvasinky či plísně. Určité druhy bakterií, především bakterie mléčného kvašení, jsou schopny adsorbovat mykotoxiny adhezí ke komponentám jejich buněčné stěny.

Mykotoxiny se vyskytují ve zvýšeném množství ve střevu, kde ovlivňují jejich histomorfologii, složení mikrobioty a místní imunitní systém. V důsledku zvýšení toxických účinků střevních patogenů a narušení střevní rovnováhy mohou vyvolat chronická zánětlivá střevní onemocnění, jako je celiakie, Crohnova choroba či ulcerózní kolitida. Doposud však nejsou důkazy o tom, že by mykotoxiny měly vliv na adhezi probiotik v trávicím traktu.

Klíčová slova: Mykotoxiny; *Alternaria*; probiotika; dekontaminace; potraviny

The effect of mycotoxins on the adhesion of probiotic microorganisms

Summary

Mycotoxins are secondary metabolites of molds with an adverse effect on mammals through feed and food. The most common contaminants of plant products are aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, fumonisins, trichothecenes and fungi of the genus *Alternaria* spp., also known as black mold. Mycotoxins contaminate a wide range of food, especially grains, but also nuts and oil seeds, coffee and cocoa beans, wine, spices or dried fruit. Often more than one mycotoxin is found on a contaminated substrate. Diseases caused by exposure to mycotoxins are called mycotoxicosis and occurs after consumption of contaminated feed or food, by the dermal or inhalation routes. Long-term intake may have teratogenic, neurotoxic, mutagenic and carcinogenic effects. Livestock exposed to mycotoxins absorb and accumulate toxins in their animal tissues. Through meat, milk and eggs, mycotoxins then could permeate into human food chain.

For this reason, there is an effort to eliminate mycotoxins from contaminated products. These are physical, chemical and biological technologies. The purpose of these methods is to eliminate or inactivate mycotoxins from food without simultaneously producing toxic residues and affecting the nutritional value of the product. As some species of fungi are resistant to chemical and thermal treatment, detoxification of mycotoxins by biological transformation is preferred. Many microorganisms can be used to detoxify mycotoxins, including bacteria, yeast and fungi. Certain types of bacteria, especially lactic acid bacteria, are able to adsorb mycotoxins by adhesion to their cell wall components.

Mycotoxins are found in great amounts in the intestine, where they affect their histomorphology, microbiotic composition and local immune system. They can cause chronic inflammatory bowel diseases, such as celiac disease, Crohn's disease or ulcerative colitis, due to the increased toxic effects of intestinal pathogens and disturbed intestinal balance. However, there is currently no evidence about the effect of mycotoxins on the adhesion of probiotics in the gastrointestinal tract.

Keywords: Mycotoxins; *Alternaria*; probiotics; decontamination; foodstuffs

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Mykotoxiny.....	9
3.2	Zdroje mykotoxinů	10
3.2.1	Fusarium	10
3.2.2	Aspergillus.....	10
3.2.3	Penicillium	11
3.2.4	Alternaria.....	11
3.3	Nejvýznamnější zástupci mykotoxinů.....	13
3.3.1	Aflatoxiny.....	14
3.3.2	Ochratoxin A	15
3.3.3	Zearalenon	17
3.3.4	Fumonisiný.....	18
3.3.5	Deoxynivalenol.....	19
3.4	Dekontaminace mykotoxinů z potravin.....	20
3.4.1	Fyzikální dekontaminace	20
3.4.2	Chemická dekontaminace	21
3.4.3	Biologická dekontaminace.....	22
3.5	Adheze mykotoxinů k probiotickým mikroorganismům.....	22
3.6	Vliv mykotoxinů na střevní epitel	26
4	Závěr	30
5	Literatura	31

1 Úvod

K produkci mykotoxinů může docházet před nebo po sklizni, během zpracování krmiva, při jeho transportu či následném skladování. Ideální způsob prevence je kontrola zemědělských produktů ještě před jejich sklizní. Ta zahrnuje řádné zavlažování, kontrolu hmyzích škůdců, případnou aplikaci pesticidů, řádné hnojení a zajištění včasné sklizně. Následně je zapotřebí dodržovat vhodnou teplotu a vlhkost vzduchu po dobu skladování plodin, i samotnou délku skladování. Pokud se nepodaří zamezit produkci mykotoxinů, nabízí se řada fyzikálních, chemických a biologických dekontaminačních metod. V posledních letech je pozornost věnována především biodegradačním metodám s využitím probiotických mikroorganismů. Probiotika prokázala řadu příznivých účinků na zdraví lidí i zvířat, stejně tak byla potvrzena schopnost adheze mykotoxinů na buněčnou stěnu probiotických mikroorganismů. Nabízí se proto hypotéza, zda jsou mykotoxiny schopny ovlivňovat adhezi vlastních probiotik na střevní epitel.

2 Cíl práce

Bylo prokázáno, že mykotoxiny jsou alespoň částečně vázány na bakteriální buňky nekovalentním způsobem, což může sloužit jako mechanismus pro jejich odstranění ze střeva. Probiotika prokázaly velký potenciál při odstraňování mykotoxinů a mohou být použity jako výchozí kultury při fermentaci potravin a jako přísady při zpracování potravin. Cílem práce je vytvořit literární přehled vzájemného vlivu probiotik a mykotoxinů. Práce se zaměří především na rod *Alternaria ssp.*, také známý jako černá plíseň. Jedná se o rod celosvětově se vyskytujících hub, které mohou působit jako saprofyty i rostlinné patogeny. Více než sedmdesát sekundárních metabolitů produkuje několik druhů *Alternaria*, např. *A. alternata*. Nicméně molekulární struktura byla objasněna jen u několika toxinů.

3 Literární rešerše

3.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity vláknitých hub, především plísní. Významnými zdroji jsou zejména vláknité houby *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. Některé druhy hub mají schopnost produkovat více mykotoxinů najednou, zatímco určité mykotoxiny mohou být produkovány více než jedním druhem plísní (Abdallah et al. 2015). V současnosti je známo na 400 druhů mykotoxinů, avšak pouze některé z nich se staly předmětem zkoumání. Z ekonomického a bezpečnostního hlediska jsou významné především aflatoxiny (AF), ochratoxin A (OTA), zearalenon (ZEN), fumonisiny (FUM) a trichotheceny (TCT) - zejména deoxynivalenol (DON) (Smith et al. 2016).

Celosvětově jsou mykotoxiny přítomny zejména v obilninách určených pro potravinářské a krmivářské účely. Jedná se především o rýži, kukuřici, ječmen a pšenici. Jsou však k nalezení i v ořechách, olejnatých semenech, kávových zrnech, vínu a koření (Abdallah et al. 2015). V rámci průzkumu z let 2009 až 2011 se zjistilo, že až 81 % z více jak 7000 vzorků krmiv pocházejících z Ameriky, Evropy a Asie bylo kontaminováno minimálně jedním druhem mykotoxinu. V Polsku průzkum kontaminaci prokázal dokonce u 95 % testovaných vzorků (Ogunade et al 2017). Velké riziko tkví v současném výskytu více různých druhů mykotoxinů. Ve studii Guan et al. (2011) probíhající v Číně byl potvrzen souběžný výskyt ZEN a DON u 94 % vzorků, společný výskyt AFB1 se ZEN, DON a FUM byl až 32, 5 %. Protože současné regulace maximálních hodnot mykotoxinů v krmivu a potravinách nezohledňují jejich možný společný výskyt, mohou být toxické účinky mykotoxinů podceňovány.

Produkce mykotoxinů je závislá na řadě faktorů jako je prostředí před a po sklizni (především teplota a obsah vlhkosti), může k ní však docházet i během zpracování krmiva, při jeho transportu a následném skladování (Freitas et al. 2015). Plísně mají schopnost růst v širokém rozpětí podmínek od teploty pohybující se mezi 10 až 40 °C, rozpětí pH 4 a 8, s aktivitou vody vyšší než 0,7. Podmínky pro růst plísní a tvorbu mykotoxinů však nemusí být nutně stejné. Například plísně rodu *Fusarium* mohou agresivně růst při 25 až 30 °C a zároveň neprodukovat žádné toxiny, zatímco při teplotách pod bodem mrazu rostou minimálně a zároveň produkují velké množství mykotoxinů (Ogunade et al. 2017). V chladnějších měsících je výskyt mykotoxinů vyšší zejména vlivem dlouhodobého skladování krmiva pro hospodářská zvířata, což poskytuje příznivé podmínky pro růst hub schopných jejich produkce (Becker-Algeri 2016). Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization - FAO) poskytuje příručku k aplikaci analýzy rizik a stanovení kritických kontrolních bodů (Hazard Analysis and Critical Control Points- HACCP) pro prevenci a kontrolu mykotoxinů. Prevencí před sklizní může být řádné zavlažování, kontrola hmyzích škůdců, případná aplikace pesticidů, řádné hnojení a zajištění včasné sklizně. Kontrolu mykotoxinů v dodavatelském řetězci obilovin lze zlepšit pomocí prediktivních matematických modelů, regionálních dat výskytu mykotoxinů či údajů o počasí během sezóny k předpovědi rizika vzniku plísní (Whitlow et al. 2010).

Stejně jako krmiva, jsou často napadeny i potraviny určené pro lidskou spotřebu. Díky tomu mohou být takto napadené potraviny zdrojem vážných zdravotních problémů. Můžeme

se tak setkat s akutní intoxikací, která je způsobena vysokým příjmem potravy obsahující mykotoxiny. Případná chronická intoxikace je zapříčiněna dlouhodobým příjmem nízkých koncentrací mykotoxinů, které se v organismu postupně akumulují. To vede k teratogenním, mutagením a karcinogenním účinkům a dochází k oslabení imunitního systému (Gashaw 2016). Choroby, za které může expozice mykotoxinům ať z krmiva nebo potravin, označujeme jako mykotoxikózy. Ty vznikají jednak po konzumaci kontaminovaného krmiva či potravy, ale může k nim docházet i při kontaktu s pokožkou, případně inhalací (Zain 2011). V případě, že jsou kontaminovaným krmivem krmeni zdraví přežvýkavci, může docházet ke snížení rizika metabolizací mykotoxinů pomocí bachorových tekutin. Ty obsahují protozoální mikrobioty a bachorové bakterie, které umožňují degradaci mykotoxinů na jiné, méně škodlivé sloučeniny (Becker-Algeri et al. 2016). Pomocí těchto mikroorganismů může být transformována široká škála mykotoxinů, včetně OTA, ZEN a DON (Zhu et al. 2017). U aflatoxinů pak může být část přijímaného aflatoxinu B1 degradována na aflatoxikol (Ogunade et al. 2017). Tato ochranná bariéra však může být narušena právě dlouhodobým příjmem kontaminovaného krmiva. Pokud jsou zvířata krmena stravou kontaminovanou mykotoxiny, mohou se u nich projevit reprodukční problémy, snížený příjem krmiva a produkce mléka, imunosuprese až smrt (Zain 2011). Hospodářská zvířata, která byla vystavena mykotoxinům, představují budoucí hrozbu i pro člověka. Během trávení totiž dochází ke vstřebání mykotoxinů živočišnými tkáněmi, kde se poté akumulují. Následně tedy mohou přecházet do potravního řetězce člověka v podobě masa, mléka a vajec.

3.2 Zdroje mykotoxinů

3.2.1 *Fusarium*

Druhy *Fusarium* jsou rostlinné patogeny, které proliferyjí před sklizní a v růstu pokračují i po sklizni. Plísně tohoto rodu jsou spojeny s ekonomicky významnými chorobami způsobující ušní a stonkovou hnilobu kukuřice (Whitlow et al. 2010). Hlavními produkoványými mykotoxiny jsou fumonisiny, trichotheceny, zearalenol a skupina nově vznikajících mykotoxinů zahrnující beauvericin, enniatiny, fusaproliferin a moniliformin. Tyto mykotoxiny lze v potravinách nalézt samostatně nebo současně s jinými toxiny, například s aflatoxiny (Marin et al. 2013). Zejména *F. graminearum* je celosvětově se vyskytujícím škůdcem obilovin, negativně ovlivňuje jejich produkci v důsledku hniloby kořenů a stonků. Dokáže přežívat saprofytičky v půdě ve zbytcích plodin v řádu několika let (Leplat et al. 2013).

3.2.2 *Aspergillus*

Mezi hlavní mykotoxiny produkované *Aspergillus* spp. patří aflatoxiny, ochratoxiny, fumonisiny a gliotoxin. Rod zahrnuje přibližně 344 druhů a chemodiverzita mezi těmito druhy je velmi vysoká (Varga et al. 2015). *A. flavus* je saprofytická půdní houba, která produkci karcinogenního sekundárního metabolitu aflatoxinu kontaminuje před sklizňové a posklizňové semenné plodiny (Amaiike & Keller 2011). Naopak druh *A. niger* má široké využití v biotechnologickém průmyslu při výrobě citronové kyseliny. Kromě plísní dokáže citronovou kyselinu produkovat i řada kvasinek, například rody *Candida* a *Saccharomyces*, a to pomocí

n - alkanů a uhlohydrátů. Dnes již výroba pomocí kvasinek není ekonomická, proto je *A. niger* stále hlavním průmyslovým výrobcem této kyseliny (Max et al. 2010).

3.2.3 *Penicillium*

Plísně z rodu *Penicillium* spp. produkují kromě ochratoxinu A řadu dalších toxinů, jako je citrinin, patulin či roquefortin (Ismail & Papenbrock 2015). Plísně mají schopnost růst i za nízkých teplot, nízké hladiny kyslíku, vysoké koncentrace oxidu uhličitého a jsou odolné vůči organickým kyselinám a slabým konzervačním látkám. Dhakar et al. (2014) zkoumal vliv teploty, pH a toleranci soli na dvaceti pěti plísňových kulturách *Penicillium* spp., izolovaných ze vzorků půdy v nadmořských výškách Himalájí. Zjistilo se, že všechny izoláty rostly v teplotním rozmezí 4 až 37 °C (optimum 24 °C), byly proto považovány za psychrotolerantní. Všechny izoláty tolerovaly pH v rozmezí 2 až 14 (optimum 5-9), přičemž 7 izolátů tolerovalo také pH 1,5. Nakonec, 10 izolátů tolerovalo koncentraci soli nad 10 °C a dalších 10 vykazovalo toleranci nad 20 %.

Jedním z hlavních druhů plísní kolonizující skladované obilí je *P. verrucosum*, které zároveň produkuje ochratoxin A (Wawrzyniak & Waśkiewicz 2014). Naopak *P. roqueforti* běžně působí v chlazených skladovaných potravinách jako kazivé činidlo a využívá se v mlékárenství při výrobě sýrů s modrou plísní (Gillot et al. 2015). Zrání sýrů jako je Roquefort, Gorgonzola a další, vyžadují růst a enzymatickou aktivitu plísně *P. roqueforti*, které je zodpovědné za charakteristickou strukturu, modrozelené skvrny a aroma těchto druhů sýrů (García-Estrada & Martín 2016). Další průmyslově využívanou plísní je *P. camemberti* při výrobě povrchově zrajících sýrů (Le Dréan et al. 2010).

3.2.4 *Alternaria*

Alternaria spp. neboli čern zahrnuje přibližně 300 druhů hojně rozšířených v životním prostředí, především pak v půdě a vzduchu. Mezi nejčastěji uváděné druhy se řadí například *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. brassicae* a *A. infectoria* (Lee et al. 2015). *Alternaria* spp. je zároveň jedním z nejrozšířenějších mykotoxických rodů vyskytujících se v obilovinách po celém světě (Tralamazza et al. 2018). Navzdory tomu je jejich toxicita prostudována relativně málo, v porovnání s toxiny produkovanými jinými houbami, jako je *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (Patriarca & Pinto 2018).

Klasifikace rodu na základě morfologie konidií, jako jsou barva, tvar, velikost, septace a zdobení, je poměrně náročná, vzhledem k velké rozmanitosti druhů a značné podobnosti mezi blízkými taxony. Některé druhy jsou fytopatogeny způsobující onemocnění rostlin (obr. 1), další jako oportunistické saprofyty znehodnocují zemědělské produkty, zejména obilná zrna, ovoce a zeleninu, a to jak po sklizni, tak i během skladování. První známý popis *Alternaria* spp. z roku 1816 Neesem von Esenbeckem hovoří o jediném druhu *A. tenuis*, později označovaného jako *A. alternata* (Tralamazza et al. 2018).



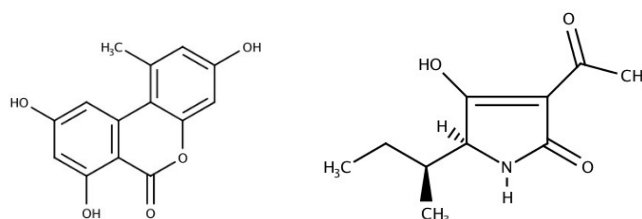
Obrázek 1: List popelivky napadený *Alternaria* spp.

Podle velikosti konidií lze rod rozdělit do dvou hlavních skupin; malé spory s velikostí konidií menší než 60 μm a velké spory s velikostí konidií v rozsahu 60 až 100 μm . Skupina malých sporů je známá jako rostlinné patogeny, alergeny a producenti mykotoxinů a jde o nejčastěji uváděnou skupinu v potravinách. Spory těchto plísní se řadí mezi nejčastější a nejsilnější vzdušné alergeny, navíc u citlivých jedinců mohou tyto alergeny vyvolat astma (Patriarca & Pinto 2018).

Druhy *Alternaria* spp. přirozeně kontaminují vzdušné části rostlin a přicházejí tak do styku s různorodou fungální a bakteriální komunitou. Ve sporách a myceliálních stěnách je přítomen melanin zvyšující odolnost plísní vůči UV záření a nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí (Venkatesh & Keller 2019), což přispívá k efektivní kolonizaci mnoha druhů rostlin. Dále byla zjištěna konkurenceschopnost mezi populacemi různých druhů mykotoxinů, a to díky možnosti produkovat účinné hydrolytické enzymy. Mezi tyto enzymy patří P-D-galaktosidáza, a-D-galaktosidáza, N-acetyl-P-D-glukosaminidáza, P-D-fukosidáza a P-D-xylosidáza. *A. tenuissima* může díky těmto enzymům rychle kolonizovat potravinové matrice při působení různých abiotických podmínek. Dále se prokázalo, že zvýšená populace *Alternaria* spp. na dozrávajících klasech pšenice se časově shodovala se snížením populací druhů *Fusarium* (Lee et al. 2015). V současné době neexistují žádné specifické regulace týkající se výskytu těchto toxinů v potravinách (Patriarca & Pinto 2018). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) však v roce 2012 uvedl, že toxiny produkované rodem *Alternaria* mají negativní dopad na lidské zdraví, a doporučil shromažďování údajů o relativní kontaminaci různých potravin v celé EU (Lee et al. 2015).

Mezi hlavní toxiny *Alternaria* spp. vyskytující se v potravinách patří alternariol (AOH - obr. 2), alternariol monomethyl ether (AME), altenuen (ALT), tenuazová kyselina (TEA) a altertoxiny (ATX) I, II a III. Uvedené toxiny mají na zvířata mutagenní a teratogenní účinky (Tralamazza et al. 2018). Výzkum prokázal, že TEA, AOH a AME jsou nejčastější toxiny vyskytující se v argentinské pšenici. Dále byly nalezeny vysoké koncentrace TEA u 27 % vzorků obilovin, rajčatových omáček, fíků, vína a slunečnicových semen (Lee et al. 2015). Hickert et al. (2015) se zabýval toxicitou TEA a výsledky ukazují, že má akutní toxické účinky na různé savce s rozdílnou hodnotou LD_{50} (*dosis letalis media* - úhyn 50 % testovaných jedinců do 24 hodin od expozice). U samic myší je hodnota LD_{50} 81 mg/kg tělesné hmotnosti a u samic potkanů je hodnota více jak 2x vyšší - hodnota LD_{50} je 168 mg/kg tělesné hmotnosti. Ještě vyšších hodnot LD byly zaznamenány u samců myší, a to dokonce 186 mg/kg tělesné hmotnosti. Na rozdíl od TEA nevykazují žádné silné akutní toxické účinky AOH a AME, prokazují však mutagenitu v buněčných kultivačních testech a vedou ke zlomům dvouřetězcových DNA. ATX způsobují zlomení řetězce DNA, přičemž ATX-II je popisován jako nejúčinnější látka mezi

altertoxiny. ALT vykazuje ve studii nejvyšší akutní toxicitu s hodnotou LD₅₀ 50 mg/kg tělesné hmotnosti u myši. Ve studii Asam et al. (2013) dva dospělí dobrovolníci (1 žena, 1 muž) požili 30 mg TEA obsažené v přirozeně kontaminovaných obilovinách (čirok, proso) a rajčatové šťávě. Následně byl pomocí testu na ředění stabilních izotopů (SIDA) vyhodnocen obsah TEA v moči. Po 6 hodinách došlo k vyloučení 54-81 % TEA močí, v závislosti na matici a dobrovolníkovi. Po 24 hodinách bylo vyloučeno 87-93 % požitého množství TEA, přičemž osud zbylých přibližně 10 % nebyl odhalen. Z těchto výsledků tedy nelze zcela vyloučit potenciální zdravotní riziko pro člověka.



Obrázek 2: Alternariol (vlevo) a tenuazová kyselina

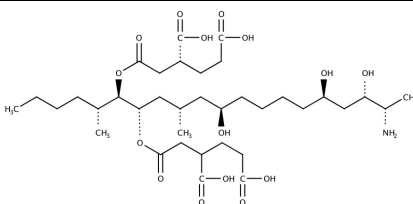
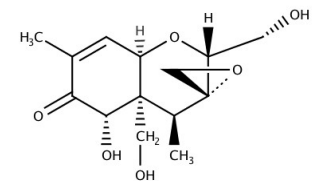
3.3 Nejvýznamnější zástupci mykotoxinů

Mezi významné mykotoxiny řadíme z hlediska bezpečnosti a prevalence v potravinách aflatoxiny (AF), ochratoxin A (OTA), zearalenon (ZEN), fumonisiny (FUM) a trichotheceny (TCT) - zejména deoxynivalenol (DON) (Marin et al. 2013; Smith et al. 2016). Chemická struktura těchto mykotoxinů a jejich účinky jsou popsány níže (tab.1).

Tab.1.a.: Nejvýznamnější mykotoxiny a jejich účinky

Mykotoxin	Struktura	Účinky	Zdroje
Aflatoxiny (AF)		Vysoce toxické, karcinogenní, mutagenní	Bbosa et al. (2013)
Ochratoxin A (OTA)		Imunosupresivní účinky, vazba na sérový albumin	Duarte et al. (2012), Mechoud et al. (2012)
Zearalenon (ZEN)		Vazba na estrogenové receptory, vyvolává reprodukční problémy	Marczuk et al. (2012)

Tab.1.b.: Nejvýznamnější mykotoxiny a jejich účinky

Mykotoxin	Struktura	Účinky	Zdroje
Fumonisin (FUM)		Narušují syntézu sfingolipidů a buněčnou aktivitu	Farhadi et al. (2019)
Deoxynivalenol (DON)		Poruchy GIT, vyvolává zvracení, reprodukční problémy	Ogunade et al. (2017)

3.3.1 Aflatoxiny

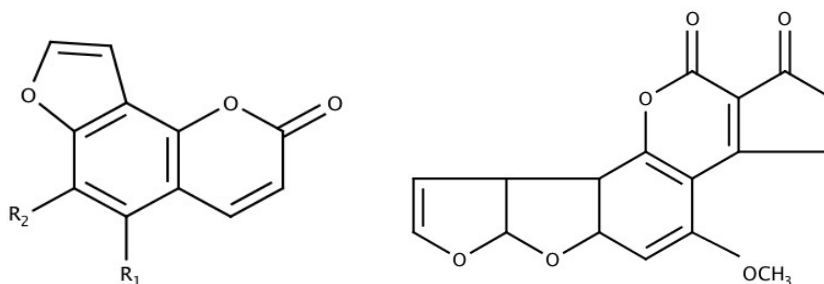
Tyto mykotoxiny se řadí do skupiny derivátů difuranokumarinu (obr. 3) produkované polyketidovou cestou kmeny rodu *Aspergillus*, nejčastěji se jedná o zástupce *A. flavus* a *A. parasiticus*. Jsou rozlišovány aflatoxiny B1, B2, G1 a G2, přičemž jejich toxický účinek na živé organismy klesá v pořadí AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 (Coppock et al. 2018). AFB1 je považován za nejúčinnější známý přírodní karcinogen a je obvykle hlavním aflatoxinem produkovaným toxigenními kmeny (Zain 2011). Označení aflatoxinů je odvozeno od barvy fluorescence pod UV zářením a jejich mobility během chromatografie na tenké vrstvě, přičemž typy B1 a B2 poskytují modrou fluorescenci (blue) a G1 a G2 žlutozelenou (yellow-green). Index 1 a 2 pak označuje hlavní a vedlejší sloučeniny. Za příznivých podmínek teploty a vlhkosti rostou tyto houby na určitých potravinách a krmivech, což vede k produkci aflatoxinů. Původně byly izolovány a identifikovány u kuřat, která v roce 1960 umírala na nekrózu jater po požití arašídové moučky kontaminované plísní. Aflatoxiny se vyskytují nejen ve zmíněných arašíděch, ale také v mandlích a dalších skořápkových plodech, v olejnatých semenech, v obilovinách jako je kukuřice, rýže a pšenice, a v neposlední řadě také v mléce (Bbosa et al. 2013).

Aflatoxiny mají celkově negativní dopad na zdraví lidí a zvířat, přičemž postihují především játra. Světová zdravotnická organizace (World Health Organization - WHO) v roce 1993 potvrdila karcinogenní potenciál aflatoxinů a klasifikovala je jako skupinu 1- karcinogenní pro člověka. AF přispívají k významnému zvýšení rizika rakoviny jater u lidí infikovaných hepatitidou B. Každoročně je v Číně a subsaharské Africe evidováno přibližně 250 000 úmrtí způsobených hepatocelulárním karcinomem. Za rizikové faktory je považován vysoký denní příjem AF (1,4 µg) a vysoký výskyt hepatitidy B. Aflatoxiny nalezené v tkáních dětí trpících Kwashiorkorovým a Reyerovým syndromem byly také považovány za faktor přispívající k těmto onemocněním. Reyerův syndrom vyvolává těžkou encefalopatii (narušení mozkových funkcí) a steatózu (ztučnění) jater, kdy dochází i k jejich zvětšení a ztvrdnutí. Kwashiorkor je syndrom těžkého nedostatku proteinů a nedostatečného přívodu energie (Zain, 2011).

Syntéza proteinů může být ovlivněna schopností aflatoxinů vázat se na buněčnou DNA. Aflatoxiny dále přispívají k výskytu thymické aplazie (vrozená absence brzlíku a příštítných

tělísek, s následným nedostatkem buněčné imunity; také známý jako DiGregorův syndrom) (da Rocha et al. 2014). U dětí v Gambii byla expozice aflatoxinu spojována se sníženými hladinami sekrečního imunoglobulinu A (IgA). Také funkční změny specifických podskupin lymfocytů korelující s vysokým příjmem aflatoxinů u dospělých jedinců z Ghany naznačují, že aflatoxiny mohou narušovat buněčnou imunitu a snižovat tak odolnost vůči infekcím (Zain, 2011).

Aflatoxiny jsou vysoce lipofilní a snadno se vstřebávají do organismu, obvykle gastrointestinálním traktem (GIT) při požití kontaminovaných potravin a respiračním traktem do krevního řečiště. Krevním oběhem jsou poté distribuovány do různých tkání, především do jater. Zde se následně metabolizují na reaktivní epoxidový meziprodukt, nebo navázáním hydroxylové skupiny vytvoří aflatoxin M1 (Bbosa et al. 2013). AFM1 jako hlavní kontaminant kravského mléka a mléčných výrobků následně negativně ovlivňuje zdraví lidí a zejména kojenců. Tato skutečnost je závažná z hlediska odolnosti AFM1 vůči zahřívacím procesům, jako je pasterizace (Alonso et al. 2013). U lidí a některých druhů zvířat jsou AF metabolizovány enzymy cytochromu P-450 (CYP 450) na vysoce toxický, mutagenní a karcinogenní aflatoxin-8,9-epoxid, který se váže na DNA a způsobuje tak poškození chromozomů (Ogunade et al. 2017). V játrech se vyskytují různé isoformy enzymů CYP 450, jež metabolizují aflatoxiny na reaktivní formy epoxidů, které se mohou vázat na proteiny a způsobit akutní toxicitu (aflatoxikózu), či při vazbě na DNA indukovat rakovinu jater (Bbosa et al. 2013). Aflatoxikóza je toxická hepatitida vedoucí ke žloutence, v těžkých případech končí smrtí. K opakovanému výskytu aflatoxikóz došlo v Keni (v letech 1981, 2001, 2004 a 2005), Indii a Malajsii (Zain 2011).



Obrázek 3: Struktura Furanokumarinu (vlevo) a Aflatoxinu B1

3.3.2 Ochratoxin A

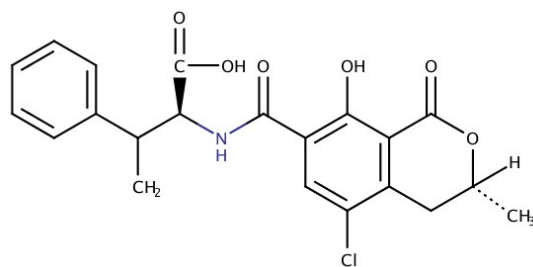
Ochratoxiny jsou produkovány zástupci rodu *Aspergillus*, především *A. ochraceus*, společně s plísněmi rodu *Penicillium*. V roce 1965 byl během výzkumu nových mykotoxinů popsán jako hlavní metabolit ochratoxin A (OTA). Chemická struktura OTA (obr. 4) je odvozena od skupiny isokumarinu napojené peptidovou vazbou na fenylalanin (da Rocha et al. 2014). Proto je OTA téměř nerozpustný ve vodě za kyselých a neutrálních podmínek pH, rozpouští se však ve většině organických rozpouštědel, jako je chloroform, ethanol, methanol a xylen. Právě díky hydrofobnosti může OTA přetrvávat ve zvířecích tkáních po dlouhou dobu (poločas > 35 dní) (Ropejko & Twaružek 2019). Schopnost produkovat OTA mají druhy *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. meleus* a *A. niger* a plísně *P. nordicum* a *P. verumum*. Průmyslové izoláty však nejsou producenty OTA, jelikož

druh *A. niger* má široké využití v průmyslu při výrobě enzymů a citronové kyseliny určené pro lidskou spotřebu (da Rocha et al. 2014).

OTA je přírodním kontaminantem mnoha druhů potravin, jako jsou kávová a kakaová zrna, obiloviny, arašídý, sušené ovoce, víno, drůbeží vejce a mléko. Ačkoliv bývá ve srovnání s dalšími mykotoxiny koncentrace OTA v potravinách relativně nízká (Ogunade et al. 2017), skutečná expozice OTA závisí na množství zkonsumovaných kontaminovaných potravin, přičemž i káva hraje v denním příjmu určitou roli (až 6 % dlouhodobé expozice) (Malir et al. 2013).

Po požití kontaminovaného krmiva se ochratoxiny akumulují převážně v játrech a ledvinách (Wang et al. 2019). U monogastrů může OTA způsobit poškození ledvin, dehydrataci, snížení imunitní odpovědi a snížení produkce (Gashaw 2016). Imunosupresivní účinky OTA byly prokázány jak *in vitro* tak i *in vivo* podmínkách. Studie na myších, které přijímaly OTA, došlo k depleci lymfoidních buněk a potlačení imunitní reakce. OTA také reguluje proliferaci lymfocytů v buňkách myšičího i lidského původu a poškozují neutrofilů, což následně narušuje produkci leukocytů a cytokinů (Mechoud et al. 2012). Wang et al. (2019) uvádí, že OTA narušuje funkci střevní bariéry potkanů a způsobuje změny střevní mikrobioty (relativní zastoupení *Bacteroidaceae* a *Lactobacillaceae*), čímž vyvolává zánět a nádorová onemocnění extraintestinálních orgánů, především jater. K zánětlivým procesům může kromě potkanů docházet i u dalších zvířat, dokonce i u člověka.

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer - IARC) klasifikovala OTA jako možný lidský karcinogen-skupina 2 B (Zain 2011). OTA může po požití vyvolávat hepatotoxické, neurotoxické, karcinogenní, teratogenní, imunotoxické a nefrotoxické účinky (Freire et al. 2019). Chronická expozice nízkým dávkám OTA se jeví více škodlivá, než akutní expozice vysoké dávce (Malir et al. 2016). Vzhledem k vysoké afinitě OTA k proteinům, především k sérovému albuminu, se OTA často vyskytuje v potravinách na bázi krve a ve výrobcích z jater, jako jsou paštiky a klobásy (Duarte et al. 2012). OTA se v důsledku bílkovinné afinity může vyskytovat i v mateřském mléce a následně se tak přenášet na kojence. To je značně znepokojivé, neboť děti jsou obecně vůči mykotoxinům více náchylné než dospělí kvůli jejich nižší tělesné hmotnosti a nižší detoxikační kapacitě. OTA je spolu s aflatoxinem M1 nejběžnější mykotoxin vyskytující se v mateřském mléce. Ve studii z roku 2008 uskutečněné na Slovensku, byl OTA detekován u 10ti z 32 analyzovaných vzorků, s maximální hodnotou 47.6 ng/l (Ropejko & Twaružek 2019). Dle studie Ostry et al. (2015) prováděné v České republice v letech 2011 až 2013 jsou nejvíce exponovanou skupinou děti ve věku 4 až 6 let. Zdroji expozice OTA pro děti jsou přitom obilné výrobky, cukrovinky, masné výrobky a ovocné šťávy. Maximální povolené limity OTA v EU pro potraviny na bázi obilovin a pro dětskou výživu činí 0,5 µg/kg (Smith et al. 2016).



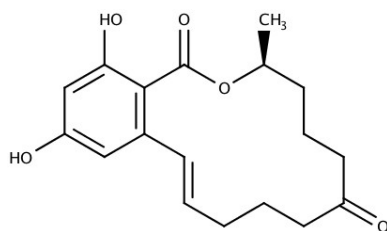
Obrázek 4: Ochratoxin A

3.3.3 Zearalenon

Jedná se o sekundární metabolity hub *Fusarium* spp., konkrétně *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichoides* a dalších. Podobně jako u ostatních mykotoxinů se zearalenon nejčastěji nachází v obilovinách, ale může se vyskytovat také v mléce (Abdallah et al. 2015). Společně se ZEN se celosvětově vyskytuje také deoxynivalenol (DON), a to nejčastěji v kukuřičné siláži (Dell'Orto et al. 2015). Zearalenon je tepelně stabilní, může však být částečně odstraněn v průběhu extruze obilovin (Gupta et al. 2018).

Zearalenon je primárně metabolizován v játrech na dva hydroxylové izomery α -zearalenol (α -ZOL) a β -zearalenol (β -ZOL), přičemž α -ZOL má až 3× silnější estrogenní účinky než samotný ZEN (Abdallah et al. 2015). Sekundárně mohou být tyto metabolity i samotný ZEN částečně konjugovány s glukuronovou kyselinou a následně vyloučeny žlučí ven z těla. Glukuronid ZEN může být také znovu absorbován a dále metabolizován střevními buňkami s následným vstupem do jater a do krevního oběhu (Sun et al. 2019). ZEN je rychle metabolizován již do 24 hodin, přičemž dosud uváděné míry vylučování jsou 9,4 % u člověka a 36,8 % u zvířat (Martins et al. 2020).

Klasifikace ZEN jako toxinu je poněkud nevhodná, přestože je biologicky aktivní, toxický je pouze výjimečně. Jeho struktura (obr. 5) se podobá estradiolu, z tohoto důvodu by lépe vyhovovala klasifikace nesteroidního hormonu nebo mykoestrogenu (da Rocha et al. 2014). Díky podobě estradiolu se metabolity ZEN vážou na estrogenové receptory, což vede k hyperestrogenismu. Následkem toho dochází k problémům s počítím, k potratům a dalším problémům, jako je tvorba ovariálních cyst. Na vysoké koncentrace ZEN v krmivu jsou nejcitlivější prasata, reprodukční problémy však byly pozorovány i u krav a ovcí (Marczuk et al. 2012). Koncentrace 1 až 5 μg ZEN na gram krmiva způsobuje u prasat mimo jiné hypertrofii mléčných žláz (Hsu et al. 2018). Co se týče účinků na člověka, expozice tomuto mykotoxinu byla spojena s některými případy předčasné puberty u dívek (Marroquín-Cardona et al. 2014). Jako vysvětlení se navrhuje možná kontaminace mléčných a masných výrobků anabolickým estrogenem zeranolem. Zeranol (α -ZAL) neboli syntetický laktón resorcylové kyseliny odvozený od ZEN, byl široce používán především v USA jako růstový stimulant ke zlepšení míry výkrmu skotu (Massart & Saggese 2010). Podle Abdallah et al. (2015) mohou metabolity ZEN také účinně stimulovat růst buněk mléčné žlázy u člověka a tím se podílet na rakovině prsu. Od roku 1989 byl v jihovýchodním Maďarsku pozorován zvýšený výskyt pacientů s předčasnou thelarche (počátek vývoje prsu, který často představuje začátek pubertálního vývoje). Estrogenní mykotoxiny byly detekovány u pěti z 36 pacientů s časnou thelarche, s hladinou ZEN v séru 18,9-103 $\mu\text{g/l}$ (Massart & Saggese 2010). U ZEN byl dále hlášen vyšší estrogenní relativní faktor než u bisfenolu A (BPA) (Martins et al. 2020). Studie Taheur et al. (2019) prokázala, že ZEN indukuje oxidační stres a apoptózu v diferenciovaných lidských embryonálních kmenových buňkách. Přesto nebyl ZEN Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny klasifikován jako lidský karcinogen (Marroquín-Cardona et al. 2014)



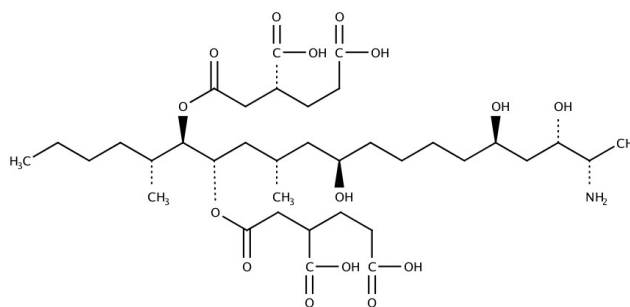
Obrázek 5: Zearalenon

3.3.4 Fumonisin

Tato skupina mykotoxinů byla objevena v roce 1988 jejich izolací v kulturách plísní rodu *Fusarium verticilloides*. Na rozdíl od většiny mykotoxinů mají fumonisinů necyklickou strukturu (obr. 6), jejíž řetězec je tvořen 19- případně 20- ti uhlíkovými aminopolyhydroxyalkyly, diesterifikovaný skupinami trikarboxylové kyseliny (propan-1,2,3-trikarboxylová kyselina) (Farhadi et al. 2019). FB lze nalézt v kukuřici a v potravinách na bázi kukuřice určených k lidské spotřebě, jako jsou snídaně cereálie (Smith et al. 2016). FB jsou produkovány i dalšími druhy, například *F. proliferatum*, *F. anthophilum* a *F. nygamai*, *Alternaria alternata* a *Aspergillus niger*. K příznivým faktorům pro sekreci fumonisinů patří horké suché období s následným působením vlhka, v kombinaci s poškozením obilovin hmyzími škůdci. Je známo více než 28 forem označovaných jako série A, série B, řady C a řady P. Fumonisin B je považován za nejvíce toxický, a to především FB1, produkováný zejména plísněmi *F. proliferatum* a *F. verticillioides* (Ogunade et al. 2017). Fumonisinů jsou na rozdíl od ostatních mykotoxinů rozpustné ve vodě, což ztěžuje jejich studium, existují tak obavy o existenci dalších doposud neobjevených forem (da Rocha et al. 2014).

Vzhledem k podobnosti strukturálního vzorce FB se sfinganinem a sfingosinem dochází prostřednictvím fumonisinů k inhibici sfingosin (sfinganin) N-acyltransferázy, čímž je narušena biosyntéza sfingolipidů a ceramidu (N-acylsfingosid; základní stavební jednotka všech sfingolipidů) (Farhadi et al. 2019). Ty se vyskytují ve větším množství v mozku a v nervové tkáni a jsou potřebné pro stavbu a fyziologickou činnost buněčné stěny, narušením jejich syntézy tedy dochází k vážným problémům souvisejících s buněčnou aktivitou (da Rocha et al. 2014, Ogunade et al. 2017). FUM inhibují vychytávání listové kyseliny prostřednictvím folátového receptoru a mohou se tak podílet na výskytu defektů nervové trubice (Zain 2011).

Fumonisinů také vykazuje karcinogenitu a hepatotoxicitu u potkanů a myši, způsobuje leukoencefalomalacii u koní a plicní edém u prasat (Whitlow et al. 2010). Ogunade et al. (2017) naopak uvádí degradovatelnost fumonisinů v bacheru (60 až 90 %), čímž je toxin méně účinný u přežvýkavců. FB1 byl klasifikován IARC a WHO jako skupina 2 B - možný karcinogen pro člověka (Zain 2011; Becker-Algeri et al. 2016). Ve studii Sun et al. (2011) bylo testováno 108 vzorků kukuřice ze tří částí Číny, přičemž ve městě Huaian, ve kterém byl vysoký výskyt rakoviny jícnu u lidí v letech 1999 až 2007, byla naměřena koncentrace FB1 2,6 mg/kg. Přítomnost fumonisinů v zrnech kukuřice je proto spojována s případy rakoviny jícnu, a to nejen v Číně, ale také v Africe a severovýchodní Itálii (da Rocha et al. 2014).



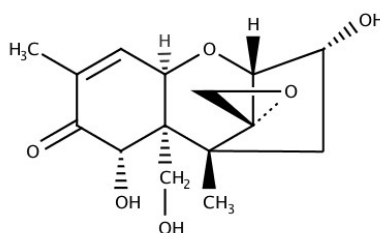
Obrázek 6: Struktura Fumonisinu B₁

3.3.5 Deoxynivalenol

Trichotheceny jsou definované jako seskviterpenoidy (deriváty terpenů skládající se ze tří isoprenových jednotek) klasifikované jako typ A nebo B v závislosti na přítomnosti ketoskupiny v poloze C-8 trichothecenového kruhu. Za nejvíce toxický je označován deoxynivalenol (DON) a nivalenol (NIV) běžně se vyskytující v kukuřici, ovsu, ječmeni a pšenici (Gil-Serna et al. 2014). Tyto mykotoxiny se řadí do skupiny B a jsou produkovány především druhy *Fusarium graminearum* a *F. culmorum* (Chen et al. 2019). Obzvláště DON je z hlediska bezpečnosti potravin vnímán jako problémový, jelikož se jedná o nejrozšířenější mykotoxin jak v Evropě tak i v Severní Americe (Adesso et al. 2017). Tolerovaná denní dávka DON byla stanovena na 1 µg/kg tělesné hmotnosti (Ren et al. 2019). Co se týče maximálních limitů v lidské výživě, pro chléb, pečivo, sušenky či snídaňové cereálie je povolené maximum 500 µg/kg, u kojenecké výživy je limit do 200 µg/kg (Smith et al. 2016).

Akutní intoxikace požitím trichothecenů souvisí s gastrointestinálními poruchami, podrážděním kůže a neuroendokrinními změnami. DON (obr. 7), také známý jako vomitoxin, je spojován s odmítáním krmiva, zvracením, průjmem a reprodukčními problémy (Ogunade et al. 2017). Nedávno se ukázalo, že imunitní systém je silně modulován expozicí trichotheceny a tyto mykotoxiny mají překvapivě imunosupresivní a imunostimulační účinky (Gil-Serna et al. 2019). DON může na buněčné úrovni interferovat s aktivním místem peptidyltransferázy na ribosomech a inhibovat syntézu proteinů (Taheur et al. 2019). Podle studie Foround et al. (2019) se jedná o ribosomální podjednotku 60S. U prasat, která jsou vůči DON nejcitlivější, byl zaznamenán také neurotoxický účinek, kdy změna koncentrace neurotransmiterů v hypothalamu, mozečku a čelní kůře vyvolává anorexii (Vila-Donat et al. 2018).

Dle Reisinger et al. (2019) jsou přežvýkavci schopni pomocí bachorové mikrobioty metabolizovat DON na de-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1). U dojného skotu dosahuje míra konverze 81-99 %. Dle Ogunade et al. (2015) však byla u mléčných krav při intoxikaci pozorována změna kvašení v bachoru a snížený tok proteinů do dvanáctníku.



Obrázek 7: Deoxynivalenol

3.4 Dekontaminace mykotoxinů z potravin

Jelikož jsou mykotoxiny významným kontaminantem krmiv a potravin s důsledky pro lidské zdraví, je snaha jejich negativní účinky eliminovat a zasažené produkty dekontaminovat. K těmto účelům se využívá různých metod, avšak ne všechny jsou zcela vhodné. Účinná metoda by měla mít schopnost mykotoxiny z potravin odstranit nebo je inaktivovat, a to bez produkce toxických reziduí a ovlivnění technologických vlastností, nutriční hodnoty a chutnosti produktů. Navrhované strategie by dále měly být realizovatelné ve velkém měřítku a tím pádem by měly být i relativně levné. Nabízí se hned několik fyzikálních, chemických i biologických technologií s prokázanou účinností (Čolovic et al. 2019).

3.4.1 Fyzikální dekontaminace

Za účelem dekontaminace a detoxikace potravin a krmiv kontaminovaných mykotoxiny se do krmiv může přidávat sorpční materiál, který snižuje absorpci mykotoxinů a jejich následnou distribuci do krve a cílových orgánů. Navázaný komplex mykotoxin-adsorbent musí být v trávicím traktu zvířete stabilní, aby mohly být navázané mykotoxiny odváděny močí a stolicí z těla ven (Jard et al. 2011). Tato metoda se řadí mezi fyzikální procesy, mezi něž dále patří například čištění zrn, ošetření gama zářením či studenou plazmou a řada tepelných úprav jako je extruze, vaření, konzervování, peletování, alkalické vaření atd. Při přípravě krmných směsí a při výrobě krmiv se využívá především procesu mletí, peletování a tepelné extruze. Tyto procesy mohou koncentrace mykotoxinů výrazně snížit, většinou však nedochází k jejich úplné eliminaci, jelikož mykotoxiny jsou obecně tepelně stabilní sloučeniny (Čolovic et al. 2019).

Mezi sorbanty přidávané ke krmivu se řadí například aktivní uhlí, které díky své pórovitosti účinně adsorbuje AFB₁, ZEN či DON ve vodném prostředí. Silikátová pojiva, především hydratované sodno-vápenaté hlinitokřemičitanu (HSCAS), absorbují aflatoxiny během trávicích procesů a činí je nedostupnými pro absorpci z GIT (Jard et al. 2011). Aflatoxiny mohou reagovat na více vazebných místech na částicích HCAS, a to jak v mezivrstvách, tak na okrajích a bazálním povrchu. Jiné mechanismy sorpce AFB₁ zahrnují chelataci nebo interakci s mezivrstevovými kationty (zejména Ca), nebo s kovy na okrajích částic (Vila-Donat et al. 2018). Účinnost HSCAS proti jiným mykotoxinům je však velmi omezená (Hsu et al. 2018). Dalším příkladem aluminosilikátů je bentonitový jíl, který může být přidán do krmiva pro zvířata ve formě granulí, prášku či pelet. Zároveň je modifikován vhodným sekvestrantem, jako jsou fosfátové a polyfosfátové soli, čímž dojde ke zvýšení inaktivační kapacity fylosilikátu (He & Zhou 2010). U bentonitu a montmorillonitu se prokázala schopnost 40 až 100 % adsorpce OTA obsaženého ve víně. Podobně zeolity jsou schopny v bachorové šťávě adsorbovat 100 % AFB₁. Využívá se také adsorpce některých syntetických polymerů, jako je cholestyramin a polyvinylpyrrolidon (PVP). U potakanů konzumujících OTA zvýšil cholestyramin vylučování OTA stolicí. Cholestyraminová pryskyřice je rovněž využívána v humánní medicíně při snižování cholesterolu prostřednictvím adsorpce žlučových kyselin a bylo prokázáno, že cholesterol adsorbuje ZEN a FB₁. (Jard et al. 2011). Zdá se však, že většina adsorbentů se váže pouze na omezenou skupinu mykotoxinů,

zatímco vykazuje velmi malou nebo žádnou vazbu na jiné. Nevýhodou u jílů je možná absorpce mikroživin a negativní vliv na biologickou dostupnost minerálů a stopových prvků, rovněž je zde riziko kontaminace přírodních jílů dioxiny a těžkými kovy (Vila-Donat et al. 2018). Dekontaminace pomocí sorbantů se tedy také nejeví jako zcela ideální.

Bosch et al. (2017) studovali účinnost studené atmosférické plazmy (CAPP) při degradaci DON, ZEN, FB1, AAL toxinu produkovaného *A. alternata* a dalších mykotoxinů, včetně enniatinů. Byla sledována kinetika rozkladu mykotoxinů vystavených výboji plazmy, přičemž všechny mykotoxiny byly v jejich čisté formě degradovány téměř úplně během 60 s. U mykotoxinů, které byly součástí plísňových kultur na povrchu rýže, se rychlost degradace v porovnání s čistými mykotoxiny bez přítomnosti matrice zpomalila. Navzdory tomu bylo dosaženo slibných výsledků degradace vybraných mykotoxinů.

Při degradaci mykotoxinů tepelným zpracováním záleží na několika faktorech, jako je druh mykotoxinu, jeho počáteční koncentrace v krmivu či potravíně, doba vystavení vysoké teplotě, pH, obsah vlhkosti atd. Vysokoteplotní procesy se jeví jako nejúčinnější způsob, přičemž využití extruze při teplotě vyšší než 150 °C dokáže snížit obsah ZEN a FUM. Při extruzi s teplotou nad 160 °C v kombinaci s 10 % glukózou může dojít ke snížení počáteční koncentrace fumonisinu B1 o 75-85 %. Jak již ale bylo řečeno, kromě snížení hladiny mykotoxinů může zároveň dojít ke zhoršení nutriční kvality krmiva (Čolovic et al. 2019).

3.4.2 Chemická dekontaminace

Chemické látky využívané k dekontaminaci lze rozdělit na alkalické sloučeniny (plynný amoniak, hydroxid sodný, hydroxid vápenatý), kyseliny (octová, fosforečná, mravenčí, propionová a sorbová kyselina), redukční činidla (hydrogensířičitan sodný, cukry D-glukóza a D-fruktóza) oxidační činidla (ozon, peroxid vodíku) a chlorační činidla či soli (Čolovic et al. 2019). Při použití chemických procesů a při tepelném zpracování však dochází ke ztrátě nutriční kvality potravin (Zhu et al. 2017). Problémem je také rezistence některých plísní proti chemickému ošetření a konzervačním látkám, například některé druhy *Penicillium* spp. mohou růst v přítomnosti sorbátu draselného, další plísně pak mají schopnost degradovat sorbát (Dalié et al. 2010). Chemické metody jsou navíc nákladné, málo účinné a nespecifické. Proto je upřednostňována detoxikace mykotoxinů pomocí biologické transformace (Jard et al. 2011).

V potravinářském průmyslu se běžně používá amoniak (NH₃) a hydroxid sodný (NaOH). Ve studii He & Zhou (2010) byly arašídý obsahující 30 ppb aflatoxinu ošetřeny 0,2% roztokem NaOH při 100 °C po dobu 10 minut a následně propláchnuty vodou na neutrální pH. Po tomto ošetření se arašídý zbarvily v závislosti na obsahu aflatoxinů, naměřená koncentrace AF byla 309 ppb u kontaminovaných arašídů, zatímco u dekontaminovaných nižší než 4 ppb. Arašídý s nízkou koncentrací AF mohly být dále zpracovány na produkty k lidské spotřebě.

K extrakci *Alternaria* spp. z pevných nebo kapalných matric se využívá extrakce pevná látka-kapalina (SLE; solid-liquid extraction) nebo kapalina-kapalina (LLE; liquid-liquid extraction) s organickými rozpouštědly, zejména acetonitrilu (ACN), ethylacetátu (EtOAc), methanolu (CH₃OH) a jejich směsí, například ACN + EtOAc. Rovněž se využívá přímé extrakce tuhou fází (SPE; solid-phase extraction) a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; metoda extrakce disperzní tuhou fází-extrakce látek méně polárních než voda), přičemž použité metody se liší v závislosti na analyzované potravíně. Pro extrakci

mykotoxinů z obilovin se využívá nejvíce postupu SLE (64 %), QuEChERS (18 %) a kombinace SLE-SPE (14 %) (Escrivá et al. 2017).

3.4.3 Biologická dekontaminace

Biologická transformace je definována jako degradace či enzymatická přeměna mykotoxinů na méně toxické sloučeniny. Pro detoxifikaci mykotoxinů lze využít řadu mikroorganismů a jejich enzymů, mezi něž patří bakterie, plísně či kvasinky. U snižování hladiny aflatoxinů se osvědčilo použití netoxigenních hub pro kompetitivní vyloučení toxigenních kmenů (Whitlow et al. 2010). Biologické transformační reakce zahrnují acetylaci, glukosylaci, kruhové štěpení, hydrolýzu, deaminaci a dekarboxylaci. Hlavním úkolem mikrobiální dekontaminace je zajistit bezpečnost potravin a zdraví lidí, kteří je konzumují (Hathout et al. 2014). Mikrobiální biodegradace prováděná za pomoci extra- či intracelulárních enzymů je nevratná, což eliminuje toxicitu AFB1. Nicméně modifikace jeho struktury může vést ke vzniku dalších potenciálně toxických molekul, například aflatoxikolu. Detoxikace AFB1 funguje na principu otevření laktonového kruhu sloučeniny pomocí mikrobiálních katabolických drah, změny struktury kumarinu, případně je odstraněna dvojná vazba z furanového kruhu. Biodegradační metody jsou v posledních desetiletích předměty studií a zdají se být slibnou metodou z hlediska účinnosti, specifčnosti a šetrnosti k životnímu prostředí (Solís-Cruz et al. 2018).

Mikrobiální fermentace, neboli kvašení, zlepšuje kvalitu potravin a současně prodlužuje jejich trvanlivost. Ke konzervačním účinkům dochází během fermentace v důsledku akumulace organických kyselin a alkoholů současně se snížením hladiny volných cukrů, vyčerpáním kyslíku a snížením pH (Blagojev et al. 2012). Při fermentaci potravin hraje důležitou roli schopnost bakterií mléčného kvašení produkovat mléčnou kyselinu, která pochází z pyruvátu (konečný produkt glykolýzy). Proto vyžaduje rychlá žádoucí produkce této kyseliny vysoký tok glykolýzy. Dalšími konečnými produkty kvašení může být ethanol, octová a mravenčí kyselina (Mozzi 2016). Během fermentace zároveň dochází ke snižování hladiny mykotoxinů, jeví se tedy jako účinná a levná strategie dekontaminace mykotoxinů v potravinách. Kontrola mykotoxinů během fermentace probíhá prostřednictvím různých mechanismů, mezi něž patří modifikace chemické struktury mykotoxinu, detoxikace či inaktivace a adheze k bakteriálním buněčným stěnám vedoucí ke snížení toxicity. Fermentační organismy včetně kvasinek a laktobacilů jsou tedy schopny adsorbovat mykotoxiny adhezí ke komponentám jejich buněčné stěny, tedy na β -glukany, glukomannany, peptidoglykany, polysacharidy a teichoovou kyselinu (Adebisi et al. 2019).

3.5 Adheze mykotoxinů k probiotickým mikroorganismům

Vzhledem k možnosti využití probiotik pro mikrobiální dekontaminaci mohou být fermentované potraviny zdrojem probiotik i pro člověka. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při podání v adekvátním množství poskytují hostiteli zdravotní přínos. Pomáhají zlepšovat obranyschopnost hostitele (imunomodulační účinky), obnovit střevní mikrobiální rovnováhu a mohou inaktivovat toxiny obsažené ve složkách potravin ve střevech (Patel et al. 2017). Dále probiotika pomáhají při léčbě gastrointestinálních chorob jako

je syndrom dráždivého tračníku, při zánětlivých střevních onemocněních, jako prevence vzniku vředů souvisejících s *Helicobacter pylori* i při alergických onemocněních (např. atopická dermatitida). Konzumace mléčných výrobků obsahujících probiotika snižuje hladinu cholesterolu v krvi, což může být prospěšné při prevenci obezity, cukrovky, kardiovaskulárních chorob a mozkové mrtvice. Probiotické organismy jako *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis* a *B. pseudocatenulatum* jsou navíc přirozenými producenty vitaminů skupiny B, zvyšují vstřebávání vitaminů a minerálních látek a stimulují tvorbu organických kyselin a aminokyselin. Dále mohou probiotické mikroorganismy produkovat enzymy jako je esteráza, lipáza a koenzymy A, Q, NAD a NADP (Markowiak & Śliżewska 2017). Kromě toho mohou mít probiotické bakterie antimutagenní a antikarcinogenní aktivitu. Při použití probiotik se očekává, že budou bezpečná z hlediska zdraví zvířat i pro následnou produkci živočišných produktů. Využívána je široká škála bakterií rodu *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptococcus* či některé druhy plísní a kvasinek, jako je *Aspergillus*, *Candida* a *Saccharomyces* (Solís-Cruz et al. 2018).

Interakcím probiotických bakterií s gastrointestinálními patogeny je věnována zvláštní pozornost, jelikož se jedná o jedno z kritérií pro výběr nových probiotik s využitím u člověka. Mezi známé mechanismy účinku probiotik na hostitele patří snížení luminálního pH, kompetice s patogeny o místo adheze a zdroje živin, sekrece antimikrobiálních látek, deaktivace toxinů a stimulace imunitního systému. Různé bakteriální kmeny stejného rodu a druhu přitom mohou mít na hostitele zcela odlišné účinky, stejně tak kombinace specifických probiotických kmenů může prokázat lepší účinek než jeden samotný kmen (Salminen et al. 2010).

Kvasinky kromě toho, že jsou důležité při fermentaci potravin, prokázaly řadu příznivých účinků na lidské zdraví. Mezi ně patří prevence a léčba střevních onemocnění, imunomodulační účinky, snížení hladiny cholesterolu v séru, antioxidační vlastnosti či antimutagenní aktivita. Kvasinky navíc obohacují potraviny prebiotiky, například fruktooligosacharidy. *Saccharomyces cerevisiae* je přirozenou součástí mikrobioty v potravinách a je hojně využívána jako startovací kultura ve fermentovaných potravinách a nápojích. Dalšími prospěšnými účinky kvasinek jsou zlepšení biologické dostupnosti minerálů hydrolýzou fytátu, biofortifikace folátu a detoxikace mykotoxinů díky povrchové vazbě na buněčnou stěnu kvasinek (Moslehi-Jenabian et al. 2010). Jejich buněčná stěna sestává hlavně z proteinů, lipidů a polysacharidů, přičemž glukany a mannany zde mají největší zastoupení (Vila-Donat et al. 2018). Esterifikovaný polymer glukanu či glukomannanu extrahovaný z buněčné stěny kvasinek se váže kromě AFB1 i s OTA a ZEN. Přidáním kvasnicového extraktu obohaceného glukomannanem do stravy prasat mohou být zmírněny negativní účinky ZEN i DON. Adsorpce FB1 kvasinkami nebo kvasinkovým extraktem je omezená (Jard et al. 2011).

Bakterie mléčného kvašení (BMK) je skupina fylogeneticky příbuzných mikroorganismů. Jedná se o gram-pozitivní, nesporulující bakterie, obvykle koky nebo tyčinky (Mozzi 2016). Dle Vila-Donat et al. (2018) jsou gram-pozitivní bakterie účinnější vůči nepolárním mykotoxinům (jako je ZEN) kvůli vyšší hydrofobitě jejich buněčného povrchu. BMK mají příznivý vliv na zdraví člověka produkcí antagonistických sloučenin, které jsou schopny kontrolovat patogenní bakterie a nežádoucí kazivou mikrobiotu. Jedná se o sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou organické kyseliny, reuterin, peroxid vodíku, sloučeniny bílkovin, hydroxylové mastné kyseliny a fenolické sloučeniny. Hlavním produktem

BMK při fermentaci uhlovodíků je mléčná kyselina, která je spolu s octovou kyselinou přidávána do potravin za účelem jejich bezpečné konzervace. Tyto kyseliny difundují přes membránu cílových organismů v jejich hydrofobní nedisociované formě, kdy následně redukuje cytoplazmatické pH a zastavují metabolické aktivity. Předpokládá se, že organické kyseliny působí na plazmatické membrány zvyšováním její propustnosti a neutralizací svého elektrochemického potenciálu, což vede k bakteriostázi (tlumení růstu či množení bakterií) a k usmrcení citlivých organismů. Tato hypotéza by mohla být vysvětlením citlivosti některých kultur plísní na organické kyseliny. U kmene *L. plantarum* 21B izolovaného z kvásku a pěstovaného v hydrolyzátu pšeničné mouky byla prokázána silná antimykotická aktivita proti *Penicillium corylophilum*, *P. roqueforti*, *P. expansum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* a *Fusarium graminearum*. Antimykotická aktivita byla částečně připisována produkcí fenylmléčné a 4-hydroxy-fenylmléčné kyseliny, přičemž k dosažení úplné inhibice růstu plísní bylo zapotřebí méně než 7,5 mg/ml fenylmléčné kyseliny (Dalié et al. 2010).

Mezi BMK řadíme rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* a *Streptococcus*. Rod *Bifidobacterium* bývá také přiřazován k BMK, díky jeho schopnosti produkce mléčné kyseliny. BMK mají důležitou funkci nejen při kvašení mléčných výrobků, masa a zeleniny, ale také například při výrobě vína, kávy, siláže a kvasnic. Kromě toho se přirozeně vyskytují v GIT obratlovců, včetně člověka. Nejvíce mikroorganismů se vyskytuje v tlustém střevě, udává se až 10^{12} mikrobů/g obsahu tlustého střeva (Stolaki et al. 2011).

Určité kmeny bakterií mléčného kvašení včetně bifidobakterií prokázaly účinnou vazbu na mykotoxiny v *in vitro* a *in vivo* podmínkách (Taheur et al. 2019). Vybrané druhy BMK se mohou v tekutých médiích vázat především na aflatoxiny. Přesný mechanismus účinku bakterií na aflatoxiny dosud nebyl objasněn, předpokládá se však, že za snížení biologické dostupnosti mykotoxinů může být zodpovědná fyzická adheze k polysacharidům a peptidoglykanům obsaženým v buněčné stěně bakterií (Elsanhoty et al. 2014). Je pravděpodobné, že síla interakce mezi mykotoxinem a BMK závisí na několika faktorech, jako je prostředí, konkrétní kmen bakterie a složení peptidoglykanové struktury (Corbo et al. 2018). Dle Jard et al. (2011) může kyselinová nebo tepelná inaktivace bakterií mléčného kvašení zvýšit účinnost adsorpce mykotoxinů. Tepelné ošetření je zodpovědné za denaturaci bakteriálních proteinů, zatímco působení kyseliny na polysacharidy může narušit glykosidické vazby s následným uvolněním monomerů. Kyselina dále může narušit strukturální integritu peptidoglykanu zvětšením pórů. Pravděpodobně právě tyto změny – denaturace proteinů a zvětšení pórů bakteriální buněčné stěny, ovlivňují vazebnou schopnost a hydrofobní povahu bakteriálního povrchu a zlepšují schopnost odstranění/neutralizace toxinů. (Corbo et al. 2018). Naopak přidání sloučenin NaOH, Na₂CO₃ a isopropanolu negativně ovlivňuje vazbu bakterie a mykotoxinu (Dalié et al. 2010).

První úvahy o schopnosti probiotik vázat mykotoxiny se objevily roku 1998, kdy El-Nezami et al. testovali tuto schopnost u pěti kmenů BMK a jednoho druhu *propionibacterium* společně s *Escherichia coli* při vazbě na aflatoxiny. Došli k závěru, že kmeny *Lactobacillus rhamnosus* GG a *L. rhamnosus* LC 705 okamžitě odstranily 80 % toxinu (Corbo et al. 2018). Dále se zjistilo, že životaschopné probiotické buňky prokázaly při odstranění AFB1 stejnou účinnost, jako buňky tepelně inaktivované (Vinderola & Ritieni 2014). *L. rhamnosus* CG se může vázat na deoxynivalenol a potencionálně omezit jeho biologickou dostupnost. Stejný kmen spolu s kmenem *L. rhamnosus* LC-705 jsou schopné

vázat i další mykotoxiny včetně aflatoxinů. Podle studie Oelschlaeger (2010) *in vitro* kmen GG snižuje absorpci aflatoxinu B1 a chrání před poškozením buněčné membrány i DNA. U potkanů byl tento kmen schopen modulovat absorpci AFB1 a zvýšit jeho fekální exkreci (Corbo et al. 2018). V *in vitro* podmínkách vazba AFB1 pomocí BMK byla popsána jako rychlý a reversibilní proces, závislý na konkrétním kmeni a dávce. Pro objasnění dekontaminace AFB1 pomocí BMK a *S. cerevisiae* byl navržen matematický model, který navrhuje přilnutí molekul AFB1 k povrchu mikroorganismu a bere v úvahu dva procesy – vazbu (adsorpci) a uvolnění (desorpci) aflatoxinu na a z vazebného místa na povrchu mikroorganismu. Tento model umožňuje odhadnout počet vazebných míst aflatoxinu B1 a účinnost buněk odstranit AFB1 z kapalného média. Bylo prokázáno, že schopnost různých kmenů zachytit AFB1 úzce souvisí s počtem vazebných míst určitého mikroorganismu, přičemž kvasinky *S. cerevisiae* se jeví jako nejúčinnější pro dekontaminaci AFB1 (Dalié et al. 2010). Dále byla popsána anti-fumonisinová aktivita u probiotického kmene *L. plantarum* MYS6. Ve studii Deepthi et al. (2017) byl tento kmen podáván kuřecím brojlerům spolu se stravou kontaminovanou FB1, přičemž výsledky po šesti týdnech prokázaly zlepšení krevního obrazu, hematokritu a obsahu hemoglobinu v krvi. Navíc došlo ke zmírnění hladiny markerů oxidačního stresu v séru a v jaterní tkáni.

Peptidoglykan obsažený v buněčných stěnách BMK, jako je *Micrococcus luteus* a *Bacillus subtilis*, se váže na alespoň jednu část trikarboxylové kyseliny ve struktuře fumonisinu B1 a zejména FB2 (Farhadi et al. 2019). Schopnost vybraných kmenů *Bacillus* produkovat a vylučovat velká množství extracelulárních enzymů (20-25 g/l) řadí tyto bakterie mezi nejvýznamnější producenty průmyslových enzymů. Například *B. licheniformis* izolovaný ze sóji byl ve studii Hathout et al. (2014) schopen po 48 hodinách odstranit 92,5 % OTA. Ve studii Cho et al. (2010) kmen *B. subtilis* degradoval 99 % ZEN v kapalném médiu. Autoři dále uvedli, že dekontaminace ZEN není nikdy úplná z důvodu přítomnosti jeho estrogenních metabolitů, například α -ZOL.

Snížení hladiny OTA je možné pomocí jogurtových bakterií a bifidobakterií. Pomocí *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* T4, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB-51 a *Bifidobacterium bifidum* došlo k úplné redukci hladiny OTA ve vzorcích mléka s původní koncentrací 0,05 a 0,1 mg OTA/l. U vzorků s 1,0 a 1,5 mg OTA/l došlo ke snížení o 36 a 26 %. Mechanismus odstranění OTA ze substrátu je jeho přeměna na isokumarin, známý jako ochratoxin α (OT α) a L- β fenylalanin narušením amidové vazby, která spojuje tyto dvě skupiny chemické struktury OTA. OT α je přinejmenším 1000 x méně toxický než OTA a jeho poločas rozpadu v těle je navíc kratší (9,6 h) než u OTA (103 h) (Blagojev et al. 2012).

Podávání mykotoxinů člověku zahrnuje etické, zdravotní a sociální otázky. Studie na lidech proto nelze provádět úmyslným podáváním mykotoxinů člověku, existují však populace, u kterých je zaznamenán zvýšený příjem potravin s přirozeným výskytem mykotoxinů, tedy mléka a mléčných výrobků, masa, ořechů, obilovin atd. V Egyptě byl zkoumán účinek směsi *L. rhamnosus* LC-705 a *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS na hladině AFB1 ve fekálních vzorcích dvaceti zdravých dobrovolníků. Jedenáct testovaných vzorků bylo pozitivní na AFB1 s hodnotami 1,8 až 6 μ g/kg stolice, přičemž po dvou týdnech užívání této směsi bakterií došlo k výraznému snížení hladiny mykotoxinu (Corbo et al. 2018). Další studie na lidech zahrnovala devadesát zdravých čínských mladých

mužů, kterým byly podávány stejné dva kmeny probiotik jako v předchozí zmíněné studii. Jako marker biologicky účinné dávky AFB1 bylo hodnoceno vylučování aduktu aflatoxinu B1-N7-guaninu močí, jelikož se zvýšeným vylučováním tohoto DNA aduktu je spojeno i zvýšené riziko rakoviny jater. V porovnání s kontrolní skupinou bylo u dobrovolníků, kterým byla podávána probiotika, pozorováno statistické snížení koncentrace močového AFB-N7-guaninu o 36 % ve 3. týdnu a o 55 % v 5. týdnu (Vinderola & Ritieni 2015).

3.6 Vliv mykotoxinů na střevní epitel

Doposud nejsou dostupné vědecké studie zabývající se vlivem mykotoxinů na adhezi probiotik na střevní epitel. Přesto se však ví, že probiotika ovlivňují mykotoxiny i střevní epitel. Předmětem studií je také negativní vliv mykotoxinů na funkce orgánů a tkání u zvířat i lidí, včetně střevního a imunitního systému.

Střevní epitel zahrnuje enterocyty, enteroendokrinní buňky a pohárkové buňky klků. Každou střevní epitheliální buňku mechanicky propojují desmozomy a adherentní spoje, těsné spoje dále regulují mezibuněčný prostor a selektivní transport paracelulárních iontových solutů. Nad buněčnou vrstvou epithelu leží složitá mikrobiota, působící jako bariéra blokující vstup patogenů, toxinů a cizích antigenů. Mimo to je epitel důležitým místem pro vstřebávání živin, včetně elektrolytů a vody prostřednictvím selektivně propustné membrány (Liew & Mohd-Redzwan 2018). První ochrannou bariérou vystavenou mykotoxinům je právě střevní epitel, střevní buňky jsou tedy vystaveny výrazně vyšším dávkám toxinů v porovnání s ostatními tkáněmi. Ve střevu mykotoxiny ovlivňují kromě trávení a příjmu živin také jejich histomorfologii, integritu střevní bariéry, složení mikrobioty a místní imunitní systém (Reisinger et al. 2019). Mykotoxiny rodu *Fusarium* mohou procházet střevním epitelem, dosáhnout systémového kompartmentu a následně ovlivnit imunitní systém. Imunomodulace indukovaná mykotoxiny může ovlivnit vrozenou a adaptivní imunitu v důsledku narušení funkce makrofágů a neutrofilů, sníženou aktivitou T a B-lymfocytů a produkcí protilátek. Důležitou součástí vrozeného imunitního systému jsou střevní epitheliální buňky, které jsou vzájemně těsně propojeny a pokryty hlenem produkovaným pohárkovými buňkami. Byl zjištěn variabilní účinek plísní *Fusarium* na zvýšení proliferace epithelových buněk a produkci hlenu u zvířat i lidí (Antonissen et al. 2014).

Jak již bylo řečeno, střevní epitel je schopen transformovat mykotoxiny na méně škodlivé metabolity ještě před jejich absorpcí do organismu. Více než 80 % AFs může být absorbováno GIT pasivním transportem, u TCT, OTA nebo FUM se absorpce pohybuje mezi 1 až 60 %. U OTA dochází k pasivnímu transportu jednoduchou difúzí, zatímco u DON paracelulární cestou (přes spoje mezi epithelovými buňkami). Některé mykotoxiny navíc prochází entero-hepatickou cirkulací, mohou se tedy reabsorbovat ze žluči a prodloužit tak retenční dobu v GIT (Smith et al. 2016).

Potenciální souvislost mezi expozicí některým mykotoxinům a chronickým zánětlivým střevním onemocněním, jako jsou celiakie, Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida, nebyla doposud dostatečně prozkoumána. I přes absenci epidemiologických studií však existují dostatečné údaje o možnosti vyvolání zánětlivých onemocnění střev u geneticky predisponovaných pacientů (Maresca et al. 2010). Rizikovým faktorem pro chronická zánětlivá onemocnění je potenciál mykotoxinů zvýšit toxické účinky střevních patogenů a změnit

rovnováhu střevní mikrobioty zvýšením počtu aerobních bakterií (Smith et al. 2016). Při reakci střevních buněk na mykotoxin jsou společně aktivovány imunitní buňky, čímž dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů a dalších bioaktivních sloučenin, které posilují a obnovují střevní bariéru. Střevní epithel si za normálního stavu udržuje mírný zánětlivý stav, který je však kontrolovaný, je proto nazýván „řízený zánět“. Reaktivní formy kyslíku (superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál) regulují redoxně citlivé signální dráhy a transkripční faktory, čímž zánět ve střevní tkáni udržují. Pokud však zánětlivé reakce probíhají neúměrně vlivem nadměrného stresu či prudkým reaktivním cyklem, dochází k narušení epithelové tkáně a dysfunkci střev. Typickým příkladem nekontrolovaného zánětu je již zmíněná Crohnova choroba či ulcerózní kolitida (Adesso et al. 2017).

Při *in vitro* testování interakcí probiotik s mykotoxiny se využívají eukaryotické epithelové buněčné linie, pěstované jako konfluentní (souvislé) monovrstvy na transmembránových filtrech (Vinderola & Ritieni 2015). Kadota et al. (2013) popisuje účinky DON a jeho acetylovaných derivátů 3-acetyldeoxynivalenolu (3ADON) a 15-acetyldeoxynivalenolu (15ADON) na buněčnou linii střevního epithelu Caco-2. 15ADON prokázal nejvyšší propustnost přes buněčnou monovrstvu buněčné linie Caco-2, přičemž tato buněčná linie byla rezistentní vůči DON a acetylovaným derivátům až do dávky 10 µg/ml. Výsledky navíc potvrdily značné ovlivnění funkce paracelulární bariéry tímto derivátem. Kromě toho byly zkoumány genové exprese indukované toxiny s následným účinkem na buněčnou linii Caco-2, přičemž nejvýznamnějším genem indukovaným DON a 15ADON byl prozánětlivý cytokin (interleukin) IL- 8.

Studie Adesso et al. (2017) se zaměřila na vliv NIV a DON na střevní buňky, kdy došlo ke zvýšení zánětlivé odpovědi v netumorigenní střevní epitheliální buněčné linii IEC-6. Zánětlivá odpověď zahrnovala produkci tumor-nekrotického faktoru- α (TNF- α), expresi indukované syntázy oxidu dusnatého (iNOS) a cyklooxygenázy-2 (COX-2), tvorbu nitrotyrosinu a uvolnění reaktivních forem kyslíku (ROS). Bylo potvrzeno, že TNF- α je jedním z hlavních patogenních cytokinů vyskytující se ve zvýšeném množství v krevním séru pacientů se zánětlivým onemocněním střev.

Toxické účinky FB1 na buněčnou střevní linii HT-29 byly studovány Minervini et al. (2014). V důsledku inhibice syntázy ceramidu a následným narušením metabolismu lipidů, FB1 zvýšil peroxidaci lipidů a hladinu volného sfinganinu ve střevních epitheliálních buňkách, což vedlo k indukci apoptózy. FB1 dále vyvolal snížení syntézy IL-8. Jelikož je tento interleukin zodpovědný za řízení opravných procesů během poranění střevní sliznice a cytotoxického stresu, jeho inhibice může vést ke zhoršenému vylučování bakterií ze střevního traktu. Při zvýšeném příjmu FB1 tak může docházet ke kolonizaci střev patogeny, například *Escherichia coli*.

Cano-Sancho et al. (2015) studoval synergické účinky DON a OTA na buněčnou linii Caco-2 a potenciální ochranné účinky antioxidantu resveratrolu (RES), přirozeně se vyskytujícího například v červeném víně. Pro vyhodnocení cytotoxických účinků toxinů byl měřen oxidační stres projevený zvýšenou produkcí ROS v buněčné linii. Navzdory antioxidantním vlastnostem resveratrolu byla při jeho molární koncentraci 20 µM zvýšena hladina ROS. Společná expozice obou mykotoxinů dále významně zvýšila cytotoxicitu, která však nebyla doprovázena zvýšenou hladinou ROS. Cytotoxicita indukovaná DON proto nebyla připisována oxidačnímu stresu, nýbrž jeho schopností indukovat apoptózu narušením

mitochondriálních funkcí a uvolněním cytochromu c do plazmy s následnou aktivací kaspázy-9 a kaspázy-3.

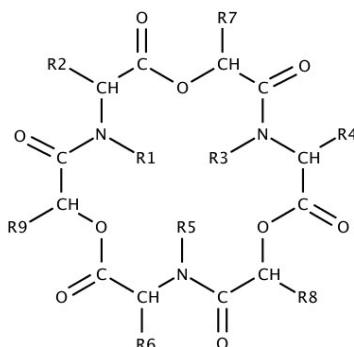
Cílem studie Gao et al. (2016) bylo zkoumat cytotoxicitu AFM1, OTA, ZEN a α -ZOL, jednotlivě či v kombinaci, na buněčnou linii Caco-2. Po 72 h expozici byl u OTA a AFM1 prokázán shodný toxický účinek, který byl vyšší než u zbylých dvou mykotoxinů. Kombinace všech čtyř mykotoxinů vykazovala nejvyšší cytotoxicitu, přičemž kombinace obsahující AFM1 měly tendenci mít větší toxické účinky, než kombinace bez jeho přítomnosti, AFM1 se tedy jevil jako nejvíce toxický. Převládající mechanismus účinku AFM1 a OTA je oxidativní poškození DNA. Po 24 h expozici může být jejich antagonistický účinek při nízkých koncentracích vysvětlen konkurencí o glutathion (GSH) v buňkách. Při vyšších koncentracích naopak AFM1 a OTA vykazují synergické účinky a díky jejich lipofilní struktuře může dojít k jejich začlenění do buněčných membrán.

Studie Liew & Mohd-Redzwan (2018) se zaměřila na vzájemný vliv mykotoxinů na střevní epitel. U trichothečenů byla zjištěna indukce nekrotických lézí v GIT, u vepřů, drůbeže a potkanů byla pozorována redukce výšky střevních klků. Trichothece dále zvýšily permeabilitu střeva *in vivo* i *in vitro* snížením exprese proteinů v těsných spojeních střevních buněk. Dále redukovaly počet pohárkových buněk produkujících mucin, který se primárně podílí na funkci střevní bariéry. AFB1 v závislosti na dávce může ovlivnit složení střevní mikrobioty, konkrétně u brojlerů došlo ke snížení počtu LAB při dávce 1 ppm. Také OTA snižuje diverzitu střevní mikrobioty, zejména rod *Bacteroides*, přičemž zástupci rodu *Lactobacillus* se proti OTA jeví jako nejvíce odolné, hrají proto důležitou roli při jejich detoxikaci z potravin.

Ve studii Mechoud et al. (2012) byla hodnocena schopnost *L. reuteri* CRL 1098 a *L. acidophilus* CRL 1014 předejít imunotoxickým účinkům OTA v periferních krevních mononukleárních buňkách (PBMC). Jako parametr buněčné odpovědi byla hodnocena inhibice produkce TNF- α a interleukinu IL-10 a indukce apoptózy v PBMC. Studie dokazuje schopnost OTA inhibovat produkci cytokinů v lymfocytech a neutrofilech. Předpokládá se, že inhibice syntézy proteinů pomocí OTA odpovídá za většinu jeho toxických účinků, což nepřímo narušuje aktivitu buněčných enzymů podílejících se na produkci cytokinů. Podáním *L. reuteri* došlo ke snížení inhibičního účinku OTA na produkci TNF- α o 29 %, zatímco *L. acidophilus* zcela zvrátil inhibiční účinek OTA a zároveň produkci TNF- α osminásobně navýšil. Ani jeden z laktobacilů neprokázal schopnost potlačit inhibici IL-10. Oba laktobacily však zvrátily apoptózu v PBMC indukovanou OTA o 32 %. Díky antiapoptické aktivitě lze předpokládat schopnost těchto kmenů laktobacilů redukovat i mutagenní změny v buňkách vyvolané OTA.

I přes absenci vědeckých studií ohledně ovlivnění adheze probiotických organismů mykotoxiny, existují studie zabývající se antimikrobiálními účinky mykotoxinů vůči jiným plísním a bakteriím. Studie Roig et al. (2014) testovala antimikrobiální účinky enniatinů vůči probiotickým kmenům BMK, *S. cerevisiae* a *Bacillus subtilis*. Enniatiny (EN) jsou charakterizovány jako N-methylované cyklohexadepsipeptidy (obr. 8) a jedná se o sekundární metabolity některých plísní rodu *Fusarium*, jako je *F. subglutinans*, *F. proliferatum* a *F. tricinctum*. Vůči široké škále plísní naopak působí antimykoticky, jedná se například o zástupce *F. sporotrichoides*, *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* a další. EN dále vykazují antimikrobiální aktivitu vůči kvasinkám

a některým druhům bakterií. Biologická aktivita těchto sloučenin může být vysvětlena jejich schopností selektivně zvyšovat tok iontů alkalických kovů přes biologické membrány (Sebastià et al. 2011).



Obr.8.: Obecná chemická struktura enniatinů

Studie prokázala antimikrobiální aktivitu jednotlivých zástupců enniatinů A, A1, A2, B, B1 a B4 vůči testovaným mikroorganismům v závislosti na kmenu, druhu toxinu a jeho dávce. EN B1 lze považovat za jednu z nejúčinnějších sloučenin. Zajímavostí však je, že žádný z testovaných kmenů nevykazoval antimikrobiální aktivitu vůči *B. subtilis*. Co se týče BMK, růst všech testovaných kmenů byl ovlivněn alespoň jedním EN (Roig et al. 2014). Ve studii Sebastià et al. (2011) enniatiny J1 a J3 zabránily růstu patogenních bakterií *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* a dalším. Z těchto zjištění je zřejmé, že některé kmeny mykotoxinů mohou mít za určitých podmínek i pozitivní vliv na zdraví. Co se týče účinku EN J1 a J3 na BMK, nejtoxičtější účinek byl pozorován u *B. bifidum*, přesto byla bakterie schopna adherovat 32,5 % aflatoxinu M1.

4 Závěr

- Za účelem eliminace negativních důsledků mykotoxinů se jeví jako ideální metoda biodegradace mikroorganismy, a to z hlediska účinnosti, specifčnosti a šetrnosti k životnímu prostředí. Zejména bakterie mléčného kvašení prokázaly schopnost adsorbovat mykotoxiny adhezí na peptidoglykany a polysacharidy obsažené v jejich buněčné stěně. Příjem probiotických organismů přináší řadu dalších pozitivních účinků, jako je prevence a léčba průjmových i zánětlivých střevních onemocnění, obnova střevní mikrobiální rovnováhy či snížení hladiny cholesterolu v krvi.
- Střevní epithel je první ochrannou bariérou vystavenou mykotoxinům a je schopen mykotoxiny transformovat na méně škodlivé metabolity. Ve střevu je za normálních okolností udržován mírný zánětlivý stav, působením mykotoxinů však může dojít k narušení epithelové tkáně a rozvoji chronických střevních zánětlivých onemocnění. Interakci probiotik a mykotoxinů se věnuje řada studií s využitím eukaryotických epithelových buněčných linií, příkladem může být buněčná linie Caco-2. Mykotoxiny NIV, DON a OTA prokázaly zvýšení zánětlivé odpovědi střevních buněk zahrnující produkci prozánětlivých cytokinů.
- K dnešnímu dni nejsou dostupné studie zaměřené na vliv mykotoxinů na adhezi probiotik, existují však studie zabývající se účinky mykotoxinů na růst probiotik. Určité druhy enniatinů mohou zabránit růstu patogenních bakterií, jako je *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium* či *Escherichia coli*. Jelikož jsou mykotoxiny schopné ovlivnit růst mikroorganismů, je možné se domnívat, že mohou ovlivnit i schopnost adheze toxinů ke komponentám buněčné stěny probiotik. Domníváme se, že by tomuto tématu měla být věnována další pozornost, která by dala podnět ke vzniku studií dané problematiky.

5 Literatura

- Abdallah MF, Girgin G, Baydar T. 2015. Occurrence, Prevention and Limitation of Mycotoxins in Feeds. *Animal Nutrition and Feed Technology* **15**: 471-490.
- Adebisi JA, Kayitesi E, Adebo OA, Changwa R, Njobeh PB. 2019. Food fermentation and mycotoxin detoxification: An African perspective. *Food Control* **106**: 106731.
- Adesso S, Quaroni A, Popolo A, Severino L & Marzocco S. 2017. The Food Contaminants Nivalenol and Deoxynivalenol Induce Inflammation in Intestinal Epithelial Cells by Regulating Reactive Oxygen Species Release. *Nutrients* **9**: 1343.
- Alassane-Kpembé I, Puel O, Oswald IP. 2014. Toxicological Interactions between the Mycotoxins Deoxynivalenol, Nivalenol and their Acetylated Derivates in Intestinal Epithelial Cells. *Archives of Toxicology* **89**: 1337-1346.
- Alonso VA, Pereyra CM, Keller LAM, Dalcero AM, Rosa CAR, Chiacchiera SM, Cavaglieri LR. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology* **115**: 637-643.
- Amaike S, Keller NP. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 107-133.
- Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vanderbroucke V, Li S, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Croubels S. 2014. The Impact of Fusarium Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. *Toxins* **6**: 430-452.
- Asam S, Habler K, Rychlik M. 2013. Determination of tenuazonic acid in human urine by means of a stable isotope dilution assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**: 4149-4158.
- Bbosa GS, Kitya D, Lubega A, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW, Kyegombe DB. 2013. Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. IntechOpen Limited, United Kingdom. Available at <https://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/review-of-the-biological-and-health-effects-of-aflatoxins-on-body-organs-and-body-systems> (accessed December 2019).
- Becker-Algeri TA, Castagnaro D, de Bortoli K, de Souza C, Drunkler DA, Badiale-Furlong E. 2016. Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science* **81**: 544-552
- Blagojev N, Škrinjar M, Vesković-Moračanin S, Šošo V. 2012. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters* **17**: 7219-7226.
- Boenisch MJ, Schäfer W. 2011. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology* **11**: 110.
- Bosch LT, Pfohl K, Avramidis G, Wieneke S, Viöl W, Karlovsky P. 2017. Plasma-Based Degradation of Mycotoxins Produced by *Fusarium*, *Aspergillus* and *Alternaria* Species. *Toxins* **9**: 97.

- Cano-Sancho G, González-Arias CA, Ramos AJ, Sanchis V, Fernández-Cruz ML. 2015. Cytotoxicity of the mycotoxins deoxynivalenol and ochratoxin A on Caco-2 cell line in presence of resveratrol. *Toxicology in Vitro* **29**: 1639-1646.
- Coppock RW, Christian GR, Jacobsen BJ. 2018. Aflatoxins. *Veterinary Toxicology*: 983-994.
- Corbo MR, Campaniello D, Speranza B, Altieri C, Sinigaglia M, Bevilacqua A. 2018. Neutralisation of toxins by probiotics during the transit into the gut: challenges and perspectives. *International Journal of Food Science & Technology*. **53**: 1339-1351.
- Cortés G, Carvajal M, Méndez-Ramírez I, Ávila-González E, Chilpa-Galván N, Castillo-Urueta P, Flores CM. 2010. Identification and quantification of aflatoxins and aflatoxicol from poultry feed and their recovery poultry litter. *Poultry science* **89**: 993-1001.
- Cortinovis C, Pizzo F, Spicer LJ, Caloni F. 2013. Fusarium mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals- A review. *Theriogenology* **80**: 557-564.
- Čolovic R, Puvača N, Cheli F, Avantaggiato G, Greco D, Duragic O, Kos J, Pinotti L. 2019. Decontamination of Mycotoxin-Contaminated Feedstuffs and Compound Feed. *Toxins* **11**: 617
- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. 2010. Lactic acid bacteria- Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control* **21**: 370-380.
- Da Rocha MEB, Freire F, Maia F, Guedes MIF, Rondina D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* **36**: 159-165.
- Deepthi BV, Somashekaraiah R, Rao KP, Deepa N, Dharanesha NK, Girish KS, Sreenivasa Y. 2017. Lactobacillus plantarum MYS6 Ameliorates Fumonisin B1- Induced Hepatorenal Damage in Broilers. *Frontiers in Microbiology* **8**: 2317.
- Dell'Orto V, Baldi G, Cheli F. 2015. Mycotoxins in silage: checkpoints for effective management and control. *World Mycotoxin Journal* **8**: 603-617.
- Dhakar K, Sharma A, Pandey A. 2014. Cold, pH and salt tolerant Penicillium spp. inhabit the high altitude soils in Himalaya, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**: 1315-1324.
- Duarte SC, Lino CM, Pena A. 2012. Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *The Veterinary Journal* **192**: 286-292.
- 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.
- Escrivá L, Oueslati S, Font G, Manyes L. 2017. Alternaria Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. *Journal of Food Quality* 1-20.
- Fan K, Cheng X, Guo W, Liu X, Zhang Z, Yao Q, Nie D, Yao B, Han Z. 2020. Ochratoxin A in human blood plasma samples from apparently healthy volunteers in Nanjing, China. *Mycotoxin Research*. doi:10.1007/s12550-020-00387-8.

- Farhadi A, Nowrozi H, Kachuei R. 2019. Metabolism, Toxicity, Detoxification, Occurrence, Intake and Legislation of Fumonisin-A Review. *Journal of Pharmaceutical Research International* **29**: 1-35.
- Foround NA, Baines D, Gagkaeva TY, Thakor N, Badea A, Steiner B, Bürstmayr M, Bürstmayr H. 2019. Trichothecenes in Cereal Grains- An Update. *Toxins* **11**: 634.
- Freire L, Furtado MM, Guerreiro TM, da Graça JS, da Silva BS, Oliveira DN, Catharino RR, Sant'Ana AS. 2019. The presence of ochratoxin A does not influence *Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics but leads to the formation of modified ochratoxins. *Food and Chemical Toxicology* **133**: 110756.
- Freitas TE, Felicio JD, Chiebao DP, Felicio RC, González E. 2015. Monitoring of Mycotoxins in Feed for Goats and Their Residues in Milk. *Journal of Agricultural Science* **7**: 100-106.
- Gao YN, Wang JQ, Li SL, Zhang YD, Zheng N. 2016. Aflatoxin M1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology* **96**: 79-89.
- García-Estrada C, Martín JF. 2016. Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 8303-8313.
- Gashaw M. 2016. Review on Mycotoxins in Feeds: Implications to Livestock and human health. *Journal of agricultural research* **5**: 137-144.
- Gil-Serna J, Vázquez C, Patiño B. 2019. Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. *International Microbiology* **23**: 89-96.
- Gillot G, Jany JL, Coton M, Le Floch G, Debaets S, Ropars J, López-Villavicencio M, Dupont J, Branca A, Giraud T, Coton E. 2015. Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity. *PLOS ONE* **10**: e0129849 DOI:10.1371/journal.pone.0129849
- Guan S, Gong M, Yin Y, Huang R, Ruan Z, Zhou T, Xie M. 2011. Occurrence of mycotoxins in feeds and feed ingredients in China. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **9**: 163-167.
- Gupta RC, Mostrom MS, Evans TJ. 2018. Zearalenone. *Veterinary Toxicology* 1055-1063.
- Hathout AS & Aly SE. 2014. Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology* **64**: 905- 919.
- He J, Zhou T. 2010. Patented Techniques for Detoxification of Mycotoxins in Feeds and Food Matrices. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* **2**: 96-104.
- Hickert S, Bergmann M, Ersen S, Cramer B & Humpf H-U. 2016. Survey of *Alternaria* toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach. *Mycotoxin research* **32**: 7-18.

- Hsu TCH, Yi PJ, Lee TY, Liu JR. 2018. Probiotic characteristics and zearalenone-removal ability of a *Bacillus licheniformis* strain. *PLoS ONE* **13**: e0194866 DOI: 10.1371/journal.pone.0194866
- Huang X, Xiao Z, Kong F, Chen AJ, Perrone G, Wang Z, Wang J, Zhang H. 2019. Diversity and ochratoxin A-fumonisin profile of black *Aspergilli* isolated from grapes in China. *World Mycotoxin Journal* **13**: 225-234.
- Chen Y, Kistler HC, Ma Z. 2019. *Fusarium graminearum* Trichothecene Mycotoxins: Biosynthesis, Regulation, and Management. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 15-39.
- Cho KJ, Kang JS, Cho WT, Lee CH, Ha JK, Song KB. 2010. *In vitro* degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Letters* **32**: 1921-1924.
- Ismail A, Papenbrock J. 2015. Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture* **5**: 492-537.
- Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarc'h A, Lebrihi A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants* **28**: 1590-1609.
- Kadota T, Furusawa H, Hirano S, Tajima O, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. 2013. Comparative study of deoxynivalenol, 3-deoxynivalenol, and 15-deoxynivalenol on intestinal transport and IL-8 secretion in the human cell line Caco-2. *Toxicology in Vitro* **27**: 1888-1895.
- Le Dréan G, Mounier J, Vasseur V, Arzur D, Habrylo O, Barbier G. 2010. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *Journal of Food Microbiology* **138**: 100-107.
- Lee HB, Patriarca A, Magan N. 2015. *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology* **43**: 93-106.
- Leplat J, Friberg H, Abid M, Steinberg Ch. 2013. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **33**: 97-111.
- Liew WPP, Mohd-Redzwan S. 2018. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**: 60.
- Malir F, Ostry V, Dofkova M, Roubal T, Dvorak V, Dohnal V. 2013. Ochratoxin A levels in blood serum of Czech women in the first trimester of pregnancy and its correspondence with dietary intake of the mycotoxin contaminant. *Biomarkers* **18**: 673-678.
- Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. 2016. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins* **8**: 191.
- Marczuk J, Obremski KJ, Lutnicki K, Gajecka M & Gajecki M. 2012. Zearalenone and deoxynivalenol mycotoxicosis in dairy cattle herds. *Polish journal of veterinary sciences* **15**: 365-372.
- Maresca M., Fantini J. 2010. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicon* **56**: 282-294.

- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* **60**: 218-237.
- Markowiak P, Śliżewska K. 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Symbiotics on Human Health. *Nutrients* **9**: 1021.
- Marroquín-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD & Hayes AW. 2014. Mycotoxins in a changing global environment—a review. *Food and Chemical Toxicology* **69**: 220-230.
- Martins C, Torres D, Lopes C, Correia D, Goios A, Assunção R, Alvito P, Vidal A, De Boevre M, De Saeger S, Nunes C. 2020. Food Consumption Data as a Tool to Estimate Exposure to Mycoestrogens. *Toxins* **12**: 118.
- Massart F, Saggese G. 2010. Oestrogenic mycooxin exposures and precocious pubertal development. *International Journal of Andrology* **33**: 369-376.
- Max B, Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Converti A, Domínguez JM. 2010. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**: 862-875.
- Mechoud MA, Juarez GE, de Valdez GF, Rodriguez AV. 2012. *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 differently reduce in vitro immunotoxic effect induced by Ochratoxin A. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 4310-4315.
- Minervini F, Garbetta A, D'Antuono I, Cardinali A, Martino NA, Debellis L, Visconti A. 2014. Toxic Mechanisms Induced by Fumonisin B1 Mycotoxin on Human Intestinal Cell Line. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **67**: 115-123.
- Moslehi-Jenabian S, Lindegaard L, Jespersen L. 2010. Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* **2**: 449-473.
- Mozzi F. 2016. Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*: 501-508.
- Oelschlaeger TA. 2010. Mechanisms of probiotic actions-A review. *International Journal of Medical Microbiology* **300**: 57-62.
- Ogunade I, Martinez C, Queiroz OCM, Jiang Y, Drouin P, Wu F, Vyas D, Adesogan AT. 2017. Mycotoxins in Silage: Occurrence, Effects, Prevention and Mitigation. *Journal of Dairy Science* **101**: 4034-4059.
- Patriarca A, Pinto VF. *Alternaria*. 2018. Reference Module in Food Science 1-8.
- Perczak A, Goliński P, Bryła M, Waśkiewicz A. 2018. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **69**: 32-45.
- Pinto VF, Patriarca A. 2017. *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in molecular biology (Clifton NJ)* **1542**: 13-32.
- Reisinger N, Schürer-Waldheim S, Mayer E, Debevere S, Antonissen G, Sulyok M, Nagl V. 2019. Mycotoxin Occurrence in Maize Silage- A Neglected Risk for Bovine Gut Health? *Toxins* **11**: 577
- Ren D, Diao E, Hou H, Xie P, Mao R, Dong H, Qian S. Cytotoxicity of Deoxynivalenol after Being Exposed to Gaseous Ozone. *Toxins* **11**: 639.

- Roig M, Meca G, Marín R, Ferrer E, Mañes J. 2014. Antibacterial activity of the emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins A, A1, A2, B, B1, and B4 on probiotic microorganisms. *Toxicon* **85**: 1-4.
- Ropejko K, Twarużek M. 2019. The occurrence of ochratoxin A in human body fluids- review. *Toxin Reviews* 1-14.
- Rychlik M, Lepper H, Weidner C & Asam S. 2016. Risk evaluation of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in foods for adults and infants and subsequent risk management. *Food Control* **68**: 181-185.
- Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. 2010. Interaction of probiotics and pathogens- benefits to human health? *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 157-167.
- Sebastià N, Meca G, Soriano JM, Mañes J. 2011. Antibacterial effects of enniatins J1 and J3 on pathogenic and lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **49**: 2710-2717.
- Schatzmayr G, Streit E. 2013. Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal* **6**: 213-222.
- Smith MC, Madec S, Coton E, Hymery N. 2016. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins* **8**: 94.
- Solís-Cruz B, Patlan DH, Hargis BM, Tellez G. 2018. Control of Aflatoxicosis in Poultry Using Probiotics and Polymers. In book: *Fungi and Mycotoxins- Their Occurrence, Impact on Health and the Economy as well as Pre- and Postharvest Management Strategies*. Available from: <https://www.intechopen.com/books/mycotoxins-impact-and-management-strategies/control-of-aflatoxicosis-in-poultry-using-probiotics-and-polymers> (accessed February 2020)
- Stolaki M, De Vos W, Kleerebezem M, Zoetendal E. 2011. Lactic Acid Bacteria in the Gut. *Lactic Acid Bacteria* 385-401.
- Sun D, Li CH, Zhou S, Zhao Y, Gong YY, Gong Z, Wu Y. 2019. Determination of Trace Zearalenone and Its Metabolites in Human Serum by a High-Throughput UPLC-MS/MS Analysis. *Applied Sciences* **9**: 741.
- Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Zhang Y, Xie Y, Zhang H, Tang L, Wang J-S. 2011. Co-contamination of aflatoxin B⁺ and fumonisin B⁺ in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Additives & Contaminants: Part A* **28**: 461-470.
- Taheur FB, Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Salah-Abbès JB, Chaieb K. 2019. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon* **160**: 12-22.
- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase C, Rocha LO. 2018. Toxicogenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Current Opinion in Food Science* **23**: 57-63.
- Varga J, Baranyi N, Chandrasekaran M, Vágvölgyi C, Koscubé S. 2015. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: an update. *Acta Biologica Szegediensis* **59**: 151-167.

- Venkatesh N, Keller N. 2019. Mycotoxins in Conversation With Bacteria and Fungi. *Frontiers in Microbiology* **10**: 403.
- Vila-Donat P, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology* **114**: 246-259.
- Vinderola G & Ritieni A. 2015. Role of Probiotics Against Mycotoxins and Their Deleterious Effects. *Journal of Food Research* **4**: 10-21.
- Wang W, Zhai S, Xia Y, Wang H, Ruan D, Zhou T, Zhu Y, Zhang H, Zhang M, Ye H, Ren W & Yang L. 2019. Ochratoxin A induces liver inflammation: involvement of intestinal microbiota. *Microbiome* **7**: 151.
- Wawrzyniak J, Waśkiewicz A. 2014. Ochratoxin A and citrinin production by *Penicillium verrucosum* on cereal solid substrates. *Food Additives & Contaminants: Part A* **31**: 139- 148.
- Whitlow LW, Hagler WM (Jr), Diaz DE. 2010. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* **15**: 74 - 84.
- Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. 2011. *Journal of Saudi Chemical Society* **15**: 129-144.
- Zhu Y, Hassan YI, Lepp D, Shao A, Zhou T. 2017. Strategies and Methodologies for Developing Microbial Detoxification Systems to Mitigate Mycotoxins. *Toxins* **9**: 130-155.