

**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**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Aneta Horáková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

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

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv mykotoxinů na adhezi probiotických mikroorganismů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. července 2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, pomoc při práci v laboratoři, cenné rady a ochotu, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

# Vliv mykotoxinů na adhezi probiotických mikroorganismů

## Souhrn

V současné době jsou mykotoxiny řazeny mezi jedny z hlavních kontaminantů, které se vyskytují napříč potravinami po celém světě. Je již prokázán jejich negativní vliv na lidský organismus v podobě mutagenity, teratogenity nebo karcinogenity a také jejich výskyt v různých potravinových komoditách. Málo informací je však známo ohledně jejich působení na střevní mikrobiom, a zejména o jejich vlivu na adhezi probiotických bakterií, které se mohou využívat jako případná aditiva v různých potravinových komoditách za účelem snížení kontaminace různými mykotoxiny. Adheze je navíc důležitou vlastností, která hraje klíčovou roli pro vlastní kolonizaci GITu probiotiky a jejich následného zdravotního benefitu pro hostitele v podobě stimulace střevní bariéry, metabolické funkce nebo ochranné funkce proti enteropatogenům prostřednictvím různých mechanismů.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat, zda mykotoxiny rodu *Alternaria* – alternariol (AOH) a alternariol monomethyl ether (AME), které jsou běžně detekovány v řadě potravinových komodit (ovoce, zelenina, obiloviny), mohou ovlivnit adhezní vlastnosti vybraných probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* (*L. gasseri* a *L. plantarum*). K testování adheze byly využity *in vitro* buněčné linie HT29 a Caco-2, které byly pěstovány do plné diferenciaci buněk s následným přidáním jednotlivých probiotik a testovaných látek na dobu 2 hodin. Po inkubaci byly buňky promyty, sklizeny pomocí 1% TRITONU a rozpuštěny ve fosfátovém pufru. Následná kultivace bakterií probíhala na Petriho miskách na ROGOSA agaru po dobu 72 h. Ze zjištěných hodnot bylo posléze stanoveno % adheze.

Vliv alternariových mykotoxinů na adhezi probiotik byl prokázán na buněčné linii HT29 u *L. gasseri*, kde 10 µg/ml AOH snížil adhezi o 16,72 % a AME o 13,85 % v porovnání s neošetřenou kontrolou. Naopak u buněčné linie Caco-2 se adheze *L. gasseri* po přidání 5 µg/ml AME zvýšila o 7,69 % v porovnání s kontrolou. Tím byla i potvrzena naše hypotéza, která říká, že mykotoxiny rodu *Alternaria* (AOH a AME) mají vliv na adhezi probiotických mikroorganismů v trávicím traktu hostitele, v našem případě probiotického rodu *Lactobacillus*.

Na základě výsledků tedy vyplývá, že mykotoxiny rodu *Alternaria* ovlivnily adhezní vlastnosti probiotického rodu *Lactobacillus*, a to způsobem jejich snížení, a naopak i zvýšení. V testech je však třeba dále pokračovat, zejména s ohledem na možné interakce probiotik s mykotoxiny přímo v kontaminovaných potravinách a další možné účinky mykotoxinů na celkovou diverzitu a stabilitu gastrointestinální mikrobioty.

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

# The effect of mycotoxins on the adhesion of probiotic microorganisms

## Summary

Currently, mycotoxins are found as one of the main contaminants across food around the world. Their negative effect on the human body in the form of mutagenicity, teratogenicity or carcinogenicity has been proven as well as their occurrence in various food commodities. However, little information is known about their effect on the intestinal microbiome and mainly their effect on the adhesion of probiotic bacteria, which can be used as potential additives in various food commodities to reduce contamination by various mycotoxins. In addition, adhesion is an important property that plays a key role in the actual colonization of probiotic GITs and their subsequent health benefit to the host in the form of stimulation of the intestinal barrier, metabolic function or protective function against enteropathogens through various mechanisms.

The aim of this diploma thesis was to test whether mycotoxins of the genus *Alternaria* – alternariol (AOH) and alternariol monomethyl ether (AME), which are commonly detected in many food commodities (fruits, vegetables, cereals), can affect the adherent properties of selected probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* (*L. gasseri* and *L. plantarum*). In vitro cell lines HT29 and Caco-2 were used to test adhesion, which were grown to full cell differentiation followed by the addition of individual probiotics and tested substances for 2 hours. After incubation, cells were washed, harvested with 1% TRITON and dissolved in phosphate buffer. Subsequent cultivation of the bacteria took place on Petri dishes on ROGOSA agar for 72 hours. The % adhesion was determined from the determined values afterwards.

The effect of alternaria mycotoxins on the adhesion of probiotics has been demonstrated in a cell line HT29 in *L. gasseri*, where 10 µg/ml AOH reduced adhesion by 16,72 % and AME by 13,85 % compared to untreated control. In contrast, in the Caco-2 cell line, the adhesion of *L. gasseri* increased by 7,69 % compared to the control after the addition of 5 µg/ml AME. This confirmed our hypothesis that mycotoxins of the genus *Alternaria* (AOH and AME) affect the adhesion of probiotic microorganisms in the digestive tract of the host, in our case the probiotic genus *Lactobacillus*.

It arises from the results that mycotoxins of the genus *Alternaria* affected the adherence properties of the probiotic genus *Lactobacillus*, in the way of their reduction and conversely their increase. However, tests need to be continued, especially with regard to possible interactions of probiotics with mycotoxins directly in contaminated foods and other possible effects of mycotoxins on the overall diversity and stability of the gastrointestinal microbiots.

**Keywords:** mycotoxins; *Alternaria*; probiotics; decontamination; food

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Gastrointestinální trakt a jeho mikrobiota</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2</b>	<b>Probiotika</b> .....	<b>11</b>
3.2.1	Charakteristika a funkce .....	11
3.2.2	Významné druhy probiotik .....	12
	<i>Lactobacillus</i> spp. ....	12
	<i>Bifidobacterium</i> spp. ....	13
	Ostatní probiotické mikroorganismy .....	13
3.2.3	Adheze probiotik.....	14
<b>3.3</b>	<b>Mykotoxiny</b> .....	<b>15</b>
3.3.1	Nejvýznamnější mykotoxiny .....	17
	Aflatoxiny .....	18
	Ochratoxiny .....	19
	Fumonisin, Trichoheceny a Zearalenon.....	20
	Mykotoxiny rodu <i>Alternaria</i> .....	21
<b>3.4</b>	<b>Vstup mykotoxinů do trávicího traktu</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Interakce probiotik s mykotoxiny</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Metoda</b> .....	<b>27</b>
4.2.1	Kultivace buněčných linií .....	27
4.2.2	Založení 24-jamkové destičky .....	27
4.2.3	Příprava bakteriální suspenze.....	27
4.2.4	Testování adheze.....	28
4.2.5	Statistická analýza.....	28
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Adheze probiotik s mykotoxiny na HT29 buněčných liniích</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Adheze probiotik s mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích</b> .....	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>38</b>
<b>9</b>	<b>Seznam tabulek a obrázků</b> .....	<b>44</b>
<b>9.1</b>	<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>44</b>
<b>9.2</b>	<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	<b>45</b>

# 1 Úvod

Mykotoxiny představují v současnosti jeden z hlavních kontaminantů potravin ohrožujících lidské zdraví. Dle Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization; FAO) je až ¼ rostlinné produkce kontaminována mykotoxiny. Navíc se do budoucna u komodit jako jsou obilniny a krmiva předpokládá i vyšší výskyt kontaminace v návaznosti na zvyšující se citlivosti detekčních metod.

Hlavními mykotoxinovými kontaminanty jsou aflatoxiny, ochratoxiny, fumonisiny, trichotheceny a zearalenon. Mykotoxiny, o nichž je známo již poměrně dost informací. Zejména jsou dostupné informace o jejich toxických účincích a následného dopadu na lidské zdraví. Přesto stále existují mykotoxiny, o kterých existuje jen minimum dostupných informací. Mezi takové patří i alternariové mykotoxiny, které bývají nejčastěji detekovány v obilovinách, ovoci a zelenině, ale dovedou kontaminovat i další produkty.

V současnosti již známe metody využívající mikrobiální dekontaminaci na snížení koncentrace mykotoxinu v potravinách. Doposud se ale nikdo nezabýval interakcí mykotoxinů s probiotiky v trávicím traktu poté, co přijdou do styku.

Jelikož se jedná o poměrně rozsáhlou problematiku, naším cílem bylo otestovat, jak mykotoxiny rodu *Alternaria* ovlivňují adhezi probiotických mikroorganismů rodu *Lactobacillus* na střevní epitel a jejich případný zdravotní benefit pro hostitele.

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

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

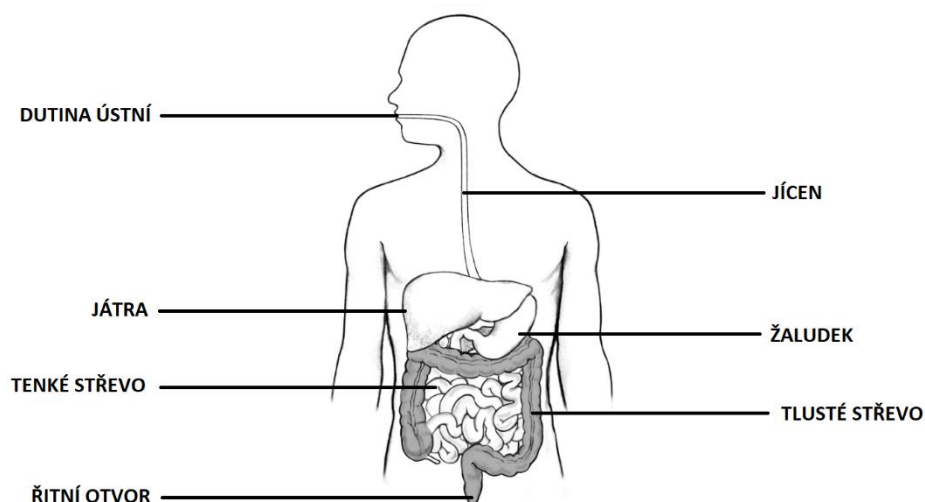
Cílem této práce proto bude sledovat vliv alternariových toxinů na změny adhezenčních vlastností vybraných probiotických bakterií.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Gastrointestinální trakt a jeho mikrobiota

Gastrointestinální trakt (GIT) (obr. 1) je soustava vzájemně propojených orgánů. Jedná se o dutou trávicí trubici přibližně 8 metrů dlouhou začínající dutinou ústní (*cavum oris*) a končící řitním otvorem (*anus*). Hlavními orgány GITu jsou včetně ústního a řitního otvoru také jícen (*oesophagus*), žaludek (*gaster*), tenké střevo (*intestinum tenue*) - (*duodenum*, *jejunum*, *ileum*), dále tlusté střevo (*intestinum crassum*) - (*intestinum caecum*, *colon*, *rectum*) a pomocné orgány jako zuby (*dentes*), jazyk (*lingua*), slinné žlázy (*glandula salivaria*), slinivka břišní (*pankreas*), játra (*iecur*) a žlučník (*vesica fellea*). Stěna trávicí trubice je tvořena čtyřmi vrstvami - mukóza (vnitřní vrstva - sliznice), submukóza, *muscularis extrema* (svalová vrstva) a serosa (vnější vrstva) (Farley et al. 2014). Hlavní úlohou GITu je příjem, rozmělnění, transport a trávení tráveniny (Liao et al. 2009). Dále zde dochází k metabolismu živin, vylučování a zprostředkovávání fyzické a imunologické obrany proti toxickým látkám a potenciálním patogenům (Cheng et al. 2010).



**Obrázek 1:** Gastrointestinální trakt (Zdroj: <https://www.niddk.nih.gov/news/media-library/9019>)

Ochrana může být zprostředkována také symbiotickými mikroorganismy, které kolonizují především spodní části GITu. Zde se nachází rozmanitá mikrobiální populace skládající se z virů, bakteriofágů, *Archaea*, hub, kvasinek, prvoků, s nejvyšší dominancí bakterií (Nuriel-Ohayon et al. 2016). Takový komplex je označován jako „střevní mikrobiota“ a je odhadováno, že jeho počet mikroorganismů překračuje  $10^{14}$  (Thursby & Juge 2017). Složení a funkce se ovšem liší v závislosti na umístění, pohlaví, rase, stravě, věku hostitele, způsobu porodu a užívání léků (např. antibiotik) (Hollister et al. 2014; Rinninella et al. 2019). Obecně se mikrobiální kolonizace GITu postupně zvyšuje od žaludku směrem k tlustému střevu. Žaludek i duodenum je kvůli svému kyselému prostředí, antimikrobiálním peptidům a proteolytickým enzymům pro řadu mikroorganismů včetně bakterií nehostinným prostředím, a tudíž zde bakteriální zastoupení čítá pouze  $10^1$  KTJ (kolonie tvořící jednotky)/ml. Naopak tlusté střevo již disponuje velkým množstvím mikrobiálních druhů, kde je bakteriální zastoupení v obvyklém počtu  $10^{12}$  KTJ/ml. Většina bakterií je zde striktně anaerobní a patří

především k phyla Firmicutes a Bacteroidetes, představující 90 % střevní mikrobioty. Dále je zde zastoupena phyla Proteobacteria (Yadav et al. 2017; Dieterich et al. 2018; Rinninella et al. 2019).

K vlastnímu osídlení trávicího traktu mikrobiotou přitom dochází již při porodu, kdy jsou rozdíly v jeho složení závislé na způsobu porodu. U porodu klasickou vaginální cestou je trávicí trakt kojence osídlen zejména vaginální mikrobiotou. Naproti tomu u císařského řezu dochází k osídlení bakteriemi kůže a operačního sálu, ke zpomalené kolonizaci *Bifidobacterium* (Derrien et al. 2019; Liu et al. 2019) a hojnější kolonizaci fakultativních anaerobů jako například druhu *Clostridium*, než je tomu u běžně narozených dětí (Thursby & Juge 2017). U těchto dětí dochází ke vzniku „normální“ střevní mikrobioty až později vlivem kojení a přechodu na běžnou stravu (Derrien et al. 2019; Liu et al. 2019). V raných fázích života je však mikrobiota ve své rozmanitosti velmi nízká a dominují zde především Actinobacteria a Proteobacteria phyla. Ke zvyšování mikrobiálního profilu dochází až během prvního roku jedince, přičemž za klíčové období, kdy dosahuje střevní mikrobiota dítěte svým složením mikrobiotě dospělé populace, je považován zhruba druhý až třetí rok života (Thursby & Juge 2017). Se zvyšujícím se věkem, přijímanou potravou a životním stylem naopak dochází k postupné změně mikrobioty, kdy jednotlivé kmeny snižují svůj počet až dochází k jejich postupnému zmizení ze střevního mikrobiomu jedince. Toto dokazuje hojnější zastoupení *Bifidobacterium* spp. ve střevní mikrobiotě dětí, a naopak jejich nižší kolonizace u dospělé populace (tab. 1) (Derrien et al. 2019; Liu et al. 2019).

**Tabulka 1:** Složení mikrobioty v závislosti na způsobu porodu a věku jedince

	Vaginální	Císařským řezem	
Způsob porodu	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium catenulatum</i> <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Corynebacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Escherichia</i> a <i>Shigella</i> <i>Streptococcus</i> ; <i>Klebsiella</i> <i>Veillonella</i> ; <i>Clostridium</i>	
Bakteriální rozmanitost	↑	↓	
	1. rok života	2-3 roky a dospělí	Nad 70 let
Věk	<i>Bifidobacterium</i> <i>Bacteroides</i> <i>Veillonella</i> <i>Clostridium</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i> <i>Coriobacteriaceae</i> <i>Bacteroidaceae</i> <i>Prevotellaceae</i> <i>Rikenellaceae</i> Proteobacteria <i>Fusobacteria</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i> <i>Clostridium</i> Proteobacteria
Bakteriální rozmanitost	↑	↑	↓

(Derrien et al. 2019; Liu et al. 2019; Rinninella et al. 2019)

U každého jedince je střevní mikrobiota individuální, přesto u všech vykonává stejně významné funkce (Rinninella et al. 2019). Především udržuje homeostázu a hraje svou nezastupitelnou roli při metabolismu nestravitelných polysacharidů. Díky tomu je střevní mikrobiota schopná produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA; butyrát,

propionát, acetát), které se dovedou metabolizovat přes střevní lumen tlustého střeva. Dále dodává vitamíny jako jsou foláty, vitamín K, biotin, riboflavin, kobalamin a ovlivňuje nespecifické a specifické složky imunitního systému tím, že inhibuje adheenci a růst patogenů spolu s produkcí bakteriocinů a dalších toxických metabolitů. Všechny tyto tělu prospěšné účinky se objevují, pokud je mikrobiální komunita v rovnováze v tzv. eubióze (Cani 2018; Lazar et al. 2018). Pokud dojde k jejímu narušení, nastává tzv. dysbióza, která může být v korelaci s řadou střevních chorob a metabolických poruch jako je obezita, zánětlivé střevní onemocnění, potravinové alergie, diabetes nebo metabolický syndrom. Dysbióza však může být jak příčinou těchto onemocnění, tak i důsledkem (Engen et al. 2015).

Ke zlepšení kvantitativního i kvalitativního střevního profilu a tím k nápravě dysbiózy mohou napomáhat probiotika (Drago 2019). Mikroorganismy, které jsou přirozenou součástí lidské mikrobioty a vykazují značný nutriční a terapeutický potenciál (van Baarlen et al. 2013; Yadav et al. 2017).

## 3.2 Probiotika

### 3.2.1 Charakteristika a funkce

Za probiotika jsou dle Organizace pro výživu a zemědělství/Světové zdravotnické organizace (Food and Agriculture Organization/World Health Organization; FAO/WHO) považovány všechny živé mikroorganismy, které při podávání v odpovídajícím množství poskytují hostiteli zdravotní prospěch (Fijan 2014; Yadav et al. 2017). Z tohoto důvodu jsou probiotika řazena mezi tzv. funkční potraviny, neboli potraviny s pozitivními účinky na lidské zdraví (Kechagia et al. 2013). Aby však mohla být probiotika funkční a používaná, musí splňovat určité požadavky. Jedna z klíčových vlastností je jejich bezpečnost, kdy nesmí existovat žádná asociace s patogenními kulturami a musí vykazovat rezistenci vůči antibiotikům. Aby byly funkční musí být odolné vůči žaludečním a žlučovým kyselinám, geneticky stabilní, a mít také schopnost přilnutí (adheze) k sliznicím střevního epitelu, díky čemuž zaberou vazebná místa pro patogeny a sníží tak jejich schopnost vázat se na vazebná místa na střevní sliznici. Z hlediska technologického využití musí být životaschopné jak za výrobních a distribučních podmínek, tak během skladování (Fijan 2014; Markowiak & Slizewska 2017).

Obecně se za hlavní význam probiotik považuje náprava dysbiózy, prostřednictvím udržování střevní homeostázy, jak již bylo zmíněno. Působí také protiprůjmově nebo proti zácpě a mohou mít pozitivní efekt i při laktóзовé intoleranci, kdy zmírňují její příznaky jako i u potravinových alergií. Dále zvyšují odolnost vůči infekčním onemocněním GITu a inhibují řadu bakteriálních patogenů jako jsou *Campylobacter jejuni*, *E. Coli*, nebo *Shigella* (Fijan 2014). Probiotika mají navíc schopnost regulovat koncentraci cholesterolu v krevním séru. To je zřejmě způsobeno několika možnými mechanismy, které jsou nejspíše zprostředkovány vazbou cholesterolu na buněčný povrch, asimilací cholesterolu pomocí probiotik, začleněním cholesterolu do buněčné membrány, dekongující žluče pomocí hydrolázy žlučových solí anebo koprecipitací cholesterolu s dekonjugovanou žlučí (Kumar et al. 2012; Fijan 2014).

Dále probiotika ovlivňují získanou a vrozenou imunitní odpověď tím, že indukují sekreci IgA a modifikují T-buněčné receptory (Kechagia et al. 2013) a v neposlední řadě vykazují účinnost proti neurologickým poruchám jako je úzkost, deprese nebo stres, díky

modulaci koncentrace neurotransmiterů v mozku (Rinninella et al. 2019). V současné době vědci navíc zkoumají vztah mezi probiotiky a nádorovými onemocněními tlustého střeva. Ukázalo se, že některá probiotika dokázala snížit aktivitu enzymů zodpovědných za přeměnu látek na karcinogenní komponenty, a navíc použití probiotik vedlo ke zlepšení vedlejších účinků radiační terapie a chemoterapie (Drago 2019).

Veškeré tyto biologické účinky a zdravotní profity probiotik jsou ovšem druhově a kmenově specifické a záleží také na době přetrvání v GITu a na množství, ve kterém se zde vyskytují (Chapman et al. 2011; Drago 2019). Navíc by se k dostavení probiotických účinků mělo dle řady studií denně konzumovat okolo  $10^8$  až  $10^9$  KTJ (Kechagia et al. 2013).

### 3.2.2 Významné druhy probiotik

Probiotickými mikroorganismy, u kterých byl zdravotní přínos prokázán, jsou bakteriální rody: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *E. Coli*, a také nepatogenní kvasinkový rod *Saccharomyces* (Fijan 2014).

#### *Lactobacillus* spp.

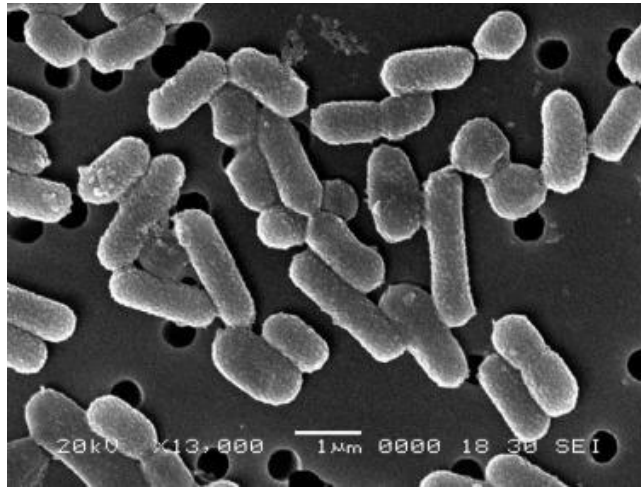
Nejvýznamnějším probiotickým rodem je *Lactobacillus*. Tento rod se skládá z více než 170 druhů grampozitivních, nesporelujících, fakultativně anaerobních i aerotolerantních bakterií tyčinkovitého tvaru z kmene Firmicutes (Goldstein et al. 2015). Laktobacily se vyskytují v místech bohatých na sacharidy, a proto je můžeme nalézt v mikrobiotě úst, vagíny a gastrointestinálního traktu (Salveti et al. 2012), kde jsou běžně přítomny druhy: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum* (obr. 2), *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. gastricus* a další (Goldstein et al. 2015; Yadav et al. 2017). Spolu s bifidobakteriemi jsou jedněmi z prvních bakterií, které kolonizují střevo ihned po porodu (Fijan 2014).

Optimálními podmínkami pro jejich růst je teplotní rozmezí mezi 30 až 40 °C a pH okolo 5,5 až 6,2 (Kechagia et al. 2013), přičemž nejlépe rostou za mikroaerofilních podmínek, kde se jeví jako bílé mukoidní kolonie. Jelikož se jedná o morfologicky velmi rozmanitý rod, jejich nejpresnější identifikace je prováděna pomocí molekulárních metod 16S rRNA genů (Goldstein et al. 2015).

Laktobacily prokázaly pozitivní účinky na zdraví svého hostitele. Ukázalo se, že posilují střevní slizniční bariéru proti patogenům (Yadav et al. 2017) a ve vagíně slouží jako obrana proti urogenitálním infekcím. Účinné jsou v léčbě i prevenci alergických onemocnění (Wells 2011) a průjmům způsobených antibiotiky (Fijan 2014). Konkrétně *L. rhamnosus* GG snížil dobu trvání akutního průjmu způsobeného rotavirem (Kechagia et al. 2013). Mimo to mohou laktobacily modulovat vrozené i získané imunitní odpovědi prostřednictvím vazby na receptory v imunitních buňkách a mnoha tkáních včetně střevního epitelu (Wells 2011). Velikým benefitem laktobacilů je jejich rezistence vůči různým druhům antibiotik díky řadě mechanismů jako je hydrolýza, acetylace, enzymatická modifikace, ribosomální methylace nebo ochrana ribosomů (Goldstein et al. 2015).

Řazeny jsou mimo jiné mezi hlavní zástupce bakterií mléčného kvašení (BMK) schopné přeměňovat hexozové cukry na mléčnou kyselinu, díky které dochází k vytváření kyselého

prostředí, a tím k inhibici růstu škodlivých mikroorganismů (Kechagia et al. 2013). Z tohoto důvodu mají laktobacily velké potravinářské využití. Podílí se na výrobě různých fermentovaných mléčných, masných i zeleninových výrobků (Van Tassell & Miller 2011).



**Obrázek 2:** *Lactobacillus plantarum* (Arasu et al. 2016)

### **Bifidobacterium spp.**

Dalším významným probiotickým rodem je *Bifidobacterium*. Tento rod naopak zastupují grampozitivní striktně anaerobní, nesporulující, kataláza negativní bakterie patřící do kmene Actinobacteria. Mezi hlavní zástupce patří *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. breve*. Bifidobakterie stejně jako laktobacily kolonizují pochvu savců a GIT. Ve střevě dospělého člověka tak tvoří přibližně 3 až 7 % mikrobioty a u novorozenců až 91 % (Martinez et al. 2013; Fijan 2014).

Bifidobakterie indukují produkci imunoglobulinu, syntetizují listovou kyselinu, a dokonce mohou působit protinádorově. Některé bifidobakterie stejně jako laktobacily navíc produkují antimikrobiální látky zvané bakteriociny, což jsou peptidy, které slouží k ničení bakterií jak stejného, tak jiného rodu. Tímto přispívají k potlačení střevních patogenů a slouží tak také jako konzervanty v řadě potravin (Martinez et al. 2013).

### **Ostatní probiotické mikroorganismy**

Dalším významným probiotickým rodem je *Lactococcus*, zahrnující grampozitivní bakterie běžně používané k výrobě fermentovaných produktů. Probiotické vlastnosti tohoto rodu vykazuje zejména *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který posiluje funkce střevní bariéry a rozvíjí imunitní reakce (Fujii et al. 2017).

Dalšími rody jsou *Enterococcus* a *Streptococcus*. *Streptococcus* obsahuje řadu druhů, jež jsou pro člověka velice patogenní (např. *S. pyogenes* či *S. pneumoniae*). Existují však i takové druhy, které jsou součástí mikrobioty úst, kůže a střeva a mají probiotické vlastnosti. Takové vlastnosti vykazuje například *Streptococcus thermophilus*, který je běžnou součástí jogurtů (Fijan 2014).

Rod *Bacillus* zastupují grampozitivní aerobní nebo fakultativně aerobní bakterie. Vykazují stabilitu v GITu i během zpracování a skladování potravin. Léčí průjmy, zabraňují infekci *Helicobacter pylori* a celkově udržují střevní homeostázu (Elshaghabee et al. 2017).

*E. coli* je spíše známa svými virulentními sérotypy. Existuje ovšem nepatogenní probiotický druh, který běžně kolonizuje střevo. Jedná se o gramnegativní *E. Coli* Nissle 1917 (ECN), která neprodukuje žádné enterotoxiny ani cytotoxiny. Slouží jako léčivo pro ulcerózní kolitidu, a dokonce vykazuje slibné výsledky u karcinomu tlustého střeva (Yu et al. 2019).

V neposlední řadě je dalším probiotickým zástupcem nepatogenní kvasinkový rod *Saccharomyces*. Tento rod je známý především svou nezastupitelnou úlohou ve výrobě piva a vína, zejména díky *S. cerevisiae*. Probiotickým zástupcem tohoto rodu je však *S. boulardii*, který dovede zkrátit dobu klinických příznaků střevních onemocnění (Fijan 2014).

### 3.2.3 Adheze probiotik

Předpokladem přechodné kolonizace trávicího traktu probiotiky, jejich účinnosti a zdravotního přínosu pro hostitele je složitý komplexní proces adheze (Salminen et al. 2010), který je zpočátku zprostředkován pomocí fyzikálních nesespecifických interakcí (hydrofóbní, sférické) a následně díky specifickým vazbám (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Důležitou roli zde hraje střevní hlen přítomný mezi střevním lumen a vlastními epiteliálními buňkami střeva (Van Tassell & Miller 2011). Tato gelovitá struktura je vylučovaná pohárkovými buňkami střevní sliznice a střevního epitelu a skládá se z vysoce glykosylovaných proteinů větších než 200 kDa nazývaných muciny (Yadav et al. 2017). Tyto proteiny spolu s dalšími složkami vytváří hustou vrstvu hlenu, ke které probiotika adherují. Předpokladem této adheze zůstává, že je způsobena především povrchovými proteinovými vrstvami (S-vrstva), proteiny vázajícími se na hlen nebo pily (fimbrie) ukotvenými v buněčných stěnách řady bakterií včetně laktobacilů. Dochází tak k adhezi proteinu bakterie na oligosacharidy vázané na povrchu hlenu (Van Tassell & Miller 2011; Goldstein et al. 2015; Robert et al. 2017).

Adheze probiotik k tomuto hleny je prvním krokem nutným k interakci probiotik s hostitelskými epiteliálními buňkami střeva a k vyvolání probiotických účinků (Van Tassell & Miller 2011). Adhezí navíc dochází k zabránění vazebných míst případných enteropatogenů, ke zvýšení imunomodulačních účinků a také ke stimulaci střevní bariéry a metabolických funkcí, jak již bylo zmíněno (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Dalším možným faktorem adherence probiotik k buňkám hostiteli tkáně je hydrofobicita povrchu buňky (Yadav et al. 2017), a stejně tak mohou přispívat k adhezi laktobacilů i bifidobakterií jejich povrchové molekuly lipoteichové kyseliny (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Ukázalo se však, že střevní mikrobiota, její složení, hojnost, metabolická aktivita a s tím spojené adhezivní vlastnosti mohou být cílem řady nebezpečných mykotoxinů (Robert et al. 2017), které se v současné době hojně vyskytují v různých potravinách a způsobují značné zdravotní komplikace (Alshannaq & Yu 2017).

### 3.3 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované vláknitými houbami neboli plísněmi, které se vyskytují napříč plodinami po celém světě a pro spotřebitele tak představují potenciální zdravotní riziko a způsobují ztráty v chovech hospodářských zvířat (Marroquin-Cardona et al. 2014). Poprvé byl termín mykotoxin použit roku 1962 při neobvykle vysokém úhynu drůbeže poblíž Londýna. Následně bylo zjištěno, že příčinou je krmná směs, která byla kontaminována aflatoxiny kmene *Aspergillus flavus*. Toto zjištění vedlo k následnému zkoumání, a díky tomu je v současnosti známo více než 300 druhů mykotoxinů. V popředí zájmu však zůstávají ty, které představují nejvyšší zdravotní riziko (Zain 2011).

Nejrozšířenější a nejznámější rody hub produkující mykotoxiny jsou především *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Penicillium* (Kovac et al. 2018). Některé rody jsou schopny produkovat více než jeden mykotoxin a některé mykotoxiny zase mohou být produkovány více než jedním druhem plísní. To znamená, že na kontaminovaném substrátu můžeme najít více než jeden druh mykotoxinu (Zain 2011).

Z chemického hlediska jsou mykotoxiny sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které mohou mít toxický účinek již při velmi nízkých koncentracích. Svým složením představují směs různorodých organických struktur, které jsou charakterizovány řadou funkčních skupin, jež obsahují heteroatomy (Marroquin-Cardona et al. 2014). Mohou se vyskytovat ve formě jednoduchých C<sub>4</sub> sloučenin jako například moniliformin, který je relativně malý, přesto vysoce kyselý mykotoxin se slabší toxicitou nejčastěji kontaminující kukuřičné zrna (Hallas-Moller et al. 2016). Stejně tak mohou být ve formě složitých látek, jako například phomopsiny představující skupinu makrocyclických hexapeptidů kontaminující rostliny rodu lupina (Schloss et al. 2017).

Mykotoxiny jsou silně termostabilní sloučeniny se schopností odolávat širokému rozpětí pH, což je činí těžce rozložitelnými (Winter & Pereg 2019). Optimálními podmínkami pro jejich růst jsou oblasti s horkým a vlhkým podnebím, ovšem ani v mírném podnebí se jejich výskyt nevylučuje (Zain 2011). Právě díky tomu jsou mykotoxiny hlavními kontaminanty potravin a krmiv, a to buď během růstové fáze, sklizně, přepravy, skladování nebo zpracování (Marroquin-Cardona et al. 2014). Riziko pro člověka představují buď přímo prostřednictvím potravin rostlinného původu (obilná zrna, ovoce, zelenina) nebo nepřímo prostřednictvím potravin živočišného původu (mléko, vejce, maso), a to v důsledku krmení kontaminovaného krmiva (Smith et al. 2016). Využívání kontaminovaných potravin a krmiv vede k nejčastější expozici mykotoxinů perorální cestou. Je zde však i možnost inhalační expozice, kdy dochází k vdechnutí mykotoxinu rozptýleného ve vzduchu a prachu, případně je i možnost dermálního vstupu přes pokožku těla (Marroquin-Cardona et al. 2014).

Obecně se onemocnění způsobená mykotoxiny nazývají mykotoxikózy (Kovac et al. 2018). Jedná se o nepřenosné neinfekční onemocnění, jehož symptomy obvykle odezní po odstranění kontaminované potravin či krmiva. Dle druhu mykotoxinu a citlivosti organismu rozlišujeme mykotoxikózy akutní (mající rychlý nástup a odezvu) a chronické (projevující se s časovým odstupem po dlouhodobě trvajícím nízkém příjmu kontaminovaných potravin mykotoxiny). Navíc mohou způsobovat epidemie, a pokud se nejedná o rozsáhlejší výskyt případů, zůstávají často nerozpoznány. K jejich klasifikaci a diagnostice dochází až následně a to na základě fyziologických změn zasažených orgánů (Zain 2011).

Metabolity mykotoxinů a jejich modifikace mají schopnost pronikat do živočišných buněk a způsobovat tak mutagenní změny v sekvenci nukleotidů. Poruchami sekvence nukleotidů dochází k velice silným a trvalým vadám v buněčném genomu, s následnou možností rozvoje karcinogenity (Adam et al. 2017). Často tak také dochází k teratogenitě, hepatotoxicitě, nefrotoxicitě, neurotoxicitě, imunopresi nebo mutagenitě (Marroquin-Cardona et al. 2014).

Již roku 1993 bylo Světovou zdravotnickou organizací spolu s Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (World Health Organization – International Agency for Research on Cancer; WHO-IARC) vyhodnoceno několik mykotoxinů jako potenciálně nebo skutečně karcinogenními látkami (tab. 2). Zařadily se mezi ně aflatoxiny, ochratoxiny, fumonisiny, trichotheceny a zearalenon (Zain 2011).

**Tabulka 2:** Karcinogenita mykotoxinů

Karcinogenita	Mykotoxin
1 – karcinogenní pro člověka	aflatoxin B1
2a – pravděpodobně karcinogenní pro člověka	x
2b – potenciálně karcinogenní pro člověka	fumonisin, ochratoxiny
3 – nelze hodnotit z hlediska karcinogenity	trichotheceny, zearalenon
4 – není karcinogenní pro člověka	x

Z důvodu nebezpečných a negativních účinků existují pro hlavní mykotoxiny, vyskytující se v potravinách, nejvyšší přípustné limity (tab. 3-5). Tyto limity reguluje Nařízení Komise č. 1881/2006/ES ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Nařízení stanovilo limity konkrétně pro aflatoxiny (B1, B2, G1 a G2), ochratoxin A, patulin, deoxynivalenon, zearalenon, fumonisiny, a pro T-2 a HT-2 toxin v různých potravinách a nápojích. Kvůli silné toxicitě mykotoxinů jsou tyto limity velmi nízké.

**Tabulka 3:** Limity pro aflatoxiny

Hygienické limity pro aflatoxiny (µg/kg)		
Potravina	Suma B1, B2, G1 a G2	M1
Jádra podzemnice olejné, skořápkové plody – k přímé spotřebě*	4	x
Sušené ovoce – k přímé spotřebě	4	x
Syrové mléko, tepelně ošetřené, mléko pro výrobu mléčných výrobků	x	0,050
Počáteční a pokračovací kojenecká výživa, včetně počátečního a pokračovacího mléka pro kojence	x	0,025

Suma B1, B2, G1 a G2 znamená celkové povolené množství těchto typů aflatoxinu: B1–aflatoxin B1; B2–aflatoxin B2; G1–aflatoxin G1; G2–aflatoxin G2; M1–aflatoxin M1; \*Maximální limity pro aflatoxiny jsou zde vztaženy k jedlým částem plodin.

Z důvodu vyšší citlivosti kojenců mají stanoveny přísnější limity tolerovatelného denního příjmu (TDI) i přísnější limity pro obsah mykotoxinů v kojenecké výživě. Jedná se zejména o limity v cereálních výrobcích, jablečných džusech a příkrmech určených pro děti (Marroquin-Cardona et al. 2014).



**Tabulka 4:** Limity pro ochratoxin A

Hygienické limity pro ochratoxin A (µg/kg)	
Potravina	
Nezpracované obiloviny	5,0
Pražená kávová zrna a mletá pražená káva kromě rozpustné	5,0
Rozpustná káva (instantní káva)	10,0
Obilné příkrmy a ostatní příkrmy určené pro kojence a malé děti*	0,50

\*Maximální limity jsou zde vztaženy na sušinu.

**Tabulka 5:** Limity pro patulin, deoxynivalenon, zearalenon a fumonisiny

Hygienické limity pro patulin, deoxynivalenon, zearalenon a fumonisiny (µg/kg)				
Potravina	Patulin	Deoxynivalenon	Zearalenon	Fumonisiny
Ovocné šťávy, rekonstituované koncentrované ovocné šťávy a ovocné nektary	50	x	x	x
Obiloviny – k přímé spotřebě*	x	750	x	x
Obiloviny – k přímé spotřebě**	x	x	75	x
Kukuřičné potraviny – k přímé spotřebě	x	x	x	400

\*Obiloviny k přímé spotřebě – obilná mouka, kukuřičná mouka, kukuřičná krupice, semolina, otruby.

\*\*Obiloviny k přímé spotřebě – obilná mouka, otruby, klíčky.

Limity pro mykotoxiny rodu *Alternaria* vydal v roce 2011 Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European food safety authority; EFSA). Pro alternariol (AOH) a alternariol monomethyl ether (AME) byl stanoven TTC (práh toxikologické obavy) 2,5 ng/kg tělesné hmotnosti/den a pro tenuazonovou kyselinu (TeA) a tentoxin (TEN) 1500 ng/kg tělesné hmotnosti/den (Fraeyman et al. 2017). Bavorský úřad pro bezpečnost potravin se navíc kvůli časté kontaminaci kojenecké výživy na bázi čiroka či prosa toxinem tenuazonovou kyselinou (TeA) a jeho nevyhnutelného zdravotního rizika pro děti a kojence rozhodl stanovit pro tento mykotoxin další limit. TeA se v kojenecké výživě proto smí vyskytovat v pouhém množství 500 µg/kg (Rychlik et al. 2016).

Veškeré tyto limity pro mykotoxiny mají za úkol zajišťovat bezpečnost potravin a spotřebitele chránit před negativními účinky, které mohou mykotoxiny vyvolat. V Evropě jsou limity z hlediska celosvětového měřítka těmi nejpřísnějšími (Zain 2011). Přesto však v EU začíná být snaha tyto přísné limity obcházet a povolit dovoz potravin, které budou kontrolovány v nečlenských zemích dle tamní legislativy. Tím hrozí, že do EU a potažmo ČR budou přiváženy potraviny, které nebudou plnit současné přísné standardy EU.

### 3.3.1 Nejvýznamnější mykotoxiny

Existuje celá řada mykotoxinů, ovšem těmi nejvýznamnějšími kontaminanty potravin jsou aflatoxiny (AF), ochratoxiny (OT), fumonisiny (F), trichotheceny (TC) a zearaleon (ZEN) (Zain 2011).

## Aflatoxiny

Houby rodu *Aspergillus* jsou jedny z nejrozšířenějších rodů, které navíc produkují mykotoxiny zvané aflatoxiny (AF). Jedná se o difuranokumarinované deriváty produkované polyketodovou cestou kmeny jako jsou *A. flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius* (Zain 2011). V současnosti existuje více jak 20 druhů AF, ovšem nejznámějšími jsou aflatoxin B1 (AFB1), G1 (AFG1), B2 (AFB2) a G2 (AFG2) (Kumar et al. 2017). Označení AF B1, B2, G1 a G2 byla přidělena na základě fluorescence pod UV světlem (blue or green = modrá nebo zelená), a také díky jejich relativní chromatografické mobilitě během tenkovrstvé chromatografie (TLC) (Zain 2011). Existuje však i AF M1 (AFM1) a M2 (AFM2), které jsou hydroxylovanými metabolity AFB1 a AFB2 (Kumar et al. 2017).

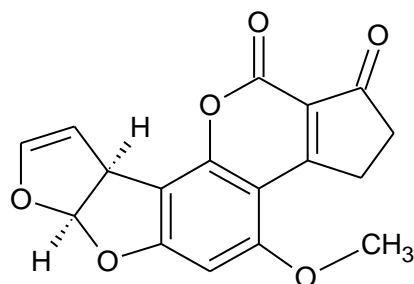
AF se vyskytují v různých potravinách a krmivech po celém světě. Řadí se mezi hlavní mykotoxiny, které se v potravinách nacházejí a ovlivňují lidské zdraví. Ideálními podmínkami pro jejich rozvoj je sucho a vysoká teplota až 48 °C. Plodiny, které nejčastěji infikují jsou obiloviny, olejnatá semena, koření, vlašské ořechy, kukuřice, bavlna a arašidy, přičemž kukuřici, bavlnu a ořechy napadá především kmen *A. flavus*, a pro arašidy je typickým kontaminantem *A. parasiticus* (Kumar et al. 2017). AF se mohou vyskytovat i v živočišných produktech, a to v důsledku zkrmování kontaminovaných krmiv. Díky metabolismu v trávicím traktu zvířete dochází k přeměně AFB1 a AFB2 na AFM1 a AFM2 a toxiny tak často mohou přecházet do masných výrobků, vajec, mléka a mléčných výrobků (Zain 2011). Obvyklá koncentrace AF pak bývá okolo 1–6 % z obsahu AF v původním krmivu. Ke kontaminacím dochází nejčastěji u špatně skladovaných obilnin (pšenice, ječmen) pro výrobu krmných směsí (Kumar et al. 2017).

AF jsou z krmiva nebo potravin nejčastěji přijímány při dýchání, dále přes pokožku, která je ve styku s AF, přičemž nejčastěji se do organismu dostávají přes sliznici trávicího traktu (Kumar et al. 2017). Jelikož jsou lipolytické povahy, snadno se vstřebávají přes buněčné membrány z místa expozice (Sarma et al. 2017). Důsledkem expozice AF tak může být teratogenita, imunotoxicita a genotoxicita. Jelikož jsou játra cílovým orgánem, které napadají, působí AF také hepatotoxicky až hepatokarcinogenně. Z tohoto důvodu je mykotoxin AFB1 (obr. 3) klasifikován do skupiny 1 jako známý lidský karcinogen (Kumar et al. 2017).

### Účinky a toxicita

Obecně je za toxicitu AF odpovědný jejich laktonový kruh, a právě jejich struktura jim umožňuje tvorbu DNA aduktů v guaninovém místě s možným důsledkem tvorby nádorových buněk (Jard et al. 2011). Úroveň toxicity je ovšem ovlivněna typem AF: AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2 (Kumar et al. 2017).

AF mají díky svému velkému výskytu na svědomí řadu epidemií. Bylo odhadnuto, že 4,6 až 28,2 % z celkového počtu hepatocelulárních karcinomů mohlo být způsobeno právě v důsledku dietární expozice AF (Marroquin-Cardona et al. 2014). Od roku 2004 AF údajně způsobily více jak 500 akutních onemocnění a vyžádaly si na 200 úmrtí. Většina ohnisek výskytu nemoci byla přitom hlášena zejména v rozvojových zemích jako například v Keni. V posledních letech byl výskyt AF hlášen v roce 2013 také v evropských státech, jako je Rumunsko, Srbsko a Chorvatsko, kde byl zaznamenán výskyt v mléce (Kumar et al. 2017).



Obrázek 3: Aflatoxin B1

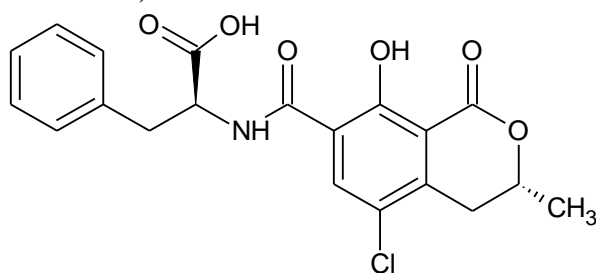
## Ochratoxiny

Další významnou skupinou mykotoxinů jsou ochratoxiny (OT), sloučeniny složené z dihydro-izokumarinových derivátů spojených s fenylalaninem pomocí amidové vazby (Koszegi & Poor 2016). Nejvýznamnějším a nejtoxičtějším mykotoxinem z této skupiny je ochratoxin A (OTA) (obr. 4), produkovaný kmeny *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. sklerotiorum* a *A. sulfaus* (Zain 2011). Nicméně je za dalšího producenta OT považován také rod *Penicillium*, konkrétně *P. verrucosum*, který může produkovat kromě OTA také ochratoxin B (Larsen et al. 2001), jež je strukturně podobný, ovšem vykazuje nižší toxicitu oproti OTA (Fung & Clark 2004).

OTA je celosvětově přirozeně se vyskytující mykotoxin v zemědělských komoditách. Jeho nejběžnější výskyt je v obilninách, ale také v sušeném ovoci, vínu, kávě a v potravinách živočišného původu. Kontaminace jsou obvykle nižší než 200 ug/kg (Fung & Clark 2004), a to opět v důsledku špatného skladování, nebo nesprávných postupů při sušení zemědělských komodit. Jedná se o velmi stabilní mykotoxin, který je běžným ošetřením neovlivnitelný, a i při potravinářském zpracování kontaminovaných komodit nedochází k jeho eliminaci u finálních potravin, ani u nápojů (Bui-Klimke & Wu 2015). Útěchou může být, že při vysokých koncentracích OT, se zde nevyskytuje AFB1, a pokud ano, tak případně jen ve velmi nízkých koncentracích. To dokazuje, že mezi mykotoxiny v potravinách existuje jistá konkurence (Zain 2011).

### Účinky a toxicita

Kvůli svým vlastnostem byl OTA zařazen do skupiny 2B jako možný lidský karcinogen a byla u něj prokázána nefrotoxicita, hepatotoxicita, teratogenita a imunotoxicita (Marroquin-Cardona et al. 2014). Jeho cílovým orgánem jsou oproti AF ledviny, a proto je podezřelou příčinou lidských nefropatií. U několika druhů zvířat je navíc potvrzeným silným renálním karcinogenem (Bui-Klimke & Wu 2015). Obecně OT ovlivňují proteinovou syntézu a inhibují tím produkci ATP (Jard et al. 2011).



Obrázek 4: Ochratoxin A

## Fumonisin, Trichotheceny a Zearalenon

Fumonisin (F) jsou mykotoxiny produkované houbou rodu *Fusarium*. Tento rod vytváří více než 15 známých druhů F, mezi jejichž hlavní zástupce patří FA, FB, FC, FP (Kamle et al. 2019). Nejrozšířenějším a nejtoxičtějším toxinem tohoto rodu je však fumonisin B1 (FB1) (obr. 5) (Marroquin-Cardona et al. 2014). F jsou sloučeniny odvozené od polyketidů (Gerber et al. 2009), produkované především kmeny jako je *F. proliferatum*, *F. verticillioides* (Kamle et al. 2019). Tyto houby produkují své mykotoxiny na plodinách nejčastěji již přímo na poli před sklizní, ale je známo, že může docházet k další syntéze toxinů také během nevhodného skladování. Typické jsou pro svou kontaminaci kukuřice, ječmene, pšenice a dalších obilnin. Díky těmto vyhovujícím podmínkám se mohou vyskytovat společně s AF (Marroquin-Cardona et al. 2014).

Kromě F produkuje rod *Fusarium* také trichotheceny (TC), které patří z chemického hlediska mezi seskviterpenoidy (de Carvalho et al. 2016). TC jsou produkovány kromě *Fusarium* také rody *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium* nebo *Trichoderma*. Běžně se TC produkované rodem *Fusarium* vyskytují na obilovinách jako je ječmen, pšenice, žito nebo oves. Klasifikovány jsou do čtyř skupin: A, B, C a D. Velice známý je TC ze skupiny B zvaný deoxynivalenol (DON) (obr. 6) (McCormick et al. 2011). Ten je produkovaný kmeny *F. culmorum* a *F. graminearum* (Yazar & Omurtag 2008), a může se nacházet v obilkách pšenice a ječmene napadených právě těmito plísněmi (Lu et al. 2016).

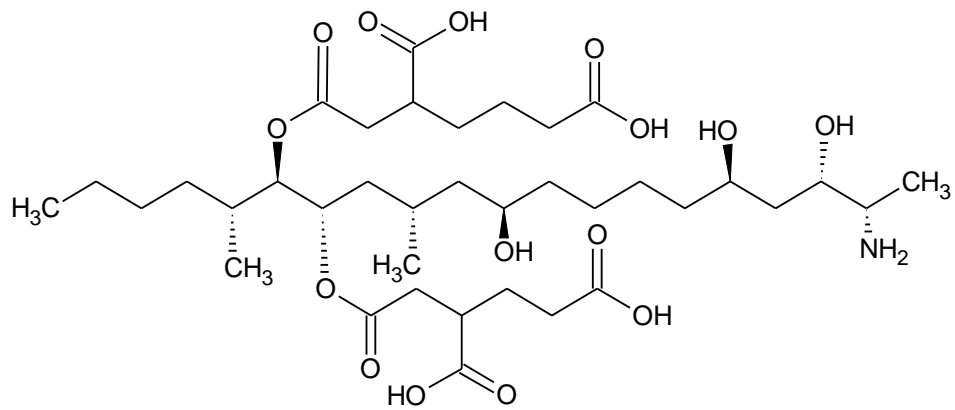
Zearalenon (ZEN) (obr. 7) je produkován kmeny *F. roseum* a *F. tricinctum* nebo *F. sporotrichioides*. Jedná se o makrocyclický lakton  $\beta$ -resorcylové kyseliny (Metzler et al. 2010). Je běžným kontaminantem kukuřice, který se může vyskytovat i v dalších obilovinách spolu s DON, ale obvykle v nižších koncentracích (Yazar & Omurtag 2008).

### Účinky a toxicita

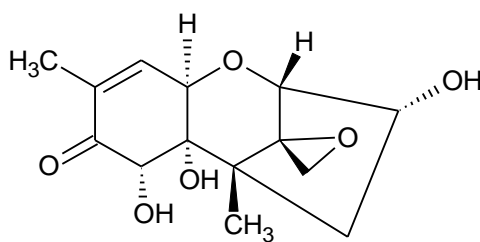
Fumonisin jsou nebezpečné díky své schopnosti inhibovat přeměnu listové kyseliny přes receptor folátu a podílení se tak na defektu nervových trubic u vyvíjejícího se plodu. FB1 je navíc mykotoxin známý svou nefrotoxicitou a hepatotoxicitou, a proto byl stejně jako OTA klasifikován do skupiny 2B jako možný lidský karcinogen (Zain 2011). FB1 je totiž spojován s výskytem rakoviny jater a jícnu (Kamle et al. 2019).

DON ze skupiny TC je toxin neklasifikovaný jako karcinogen, nicméně je příčinou anorexie, hubnutí, podvýživy, endokrinních a imunitních změn u lidí (Zain 2011). Obecně jsou TC velice odolné v neutrálním i kyselém pH, a proto nejsou po požití hydrolyzovány (Yazar & Omurtag 2008). Navíc jsou v gastrointestinálním traktu velmi dobře vstřebávány, což jim umožní rychlý účinek (McCormick et al. 2011). TC byly dokonce používány jako biologické zbraně. Jednalo se konkrétně o T-2 toxin ze skupiny A trichothecenů (Zain 2011). Tato skupina je zodpovědná za široké spektrum nežádoucích účinků jako je anorexie, zvracení, imunotoxicita, genotoxicita a hepatotoxicita (Zhang et al. 2018).

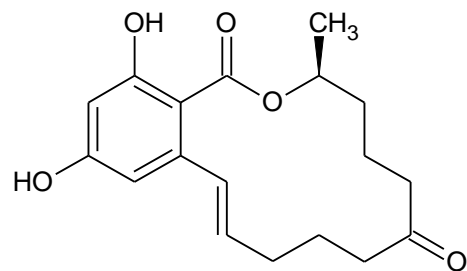
Zearalenon je zase známý svými estrogenními účinky a negativním vlivem na vývoj žen (Zain 2011), kdy se váže se na estrogenní receptory, a tím narušuje plodnost a reprodukční schopnosti (Jard et al. 2011).



Obrázek 5: Fumonisin B1



Obrázek 6: Deoxynivalenon

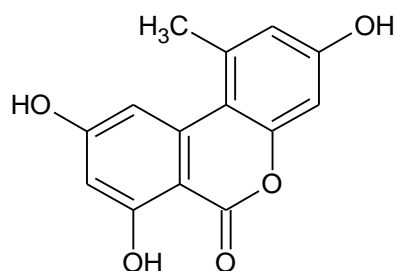


Obrázek 7: Zearalenon

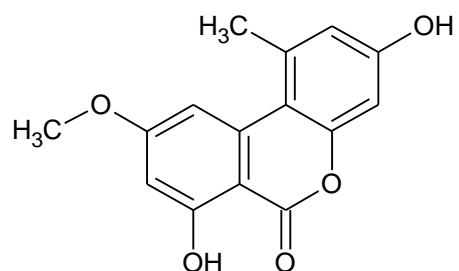
### Mykotoxiny rodu *Alternaria*

Rod *Alternaria* se řadí mezi další důležité houby produkující více než 70 sekundárních metabolitů (toxinů) několika různými kmeny. Mezi nejdůležitější jsou řazeny *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. radicina*, *A. brassicae*, *A. brassicicola* a *A. infectoria* (Escriva et al. 2017), které jsou označovány jako černá plíseň vyskytující se v řadě potravinových komodit (Puntscher et al. 2019).

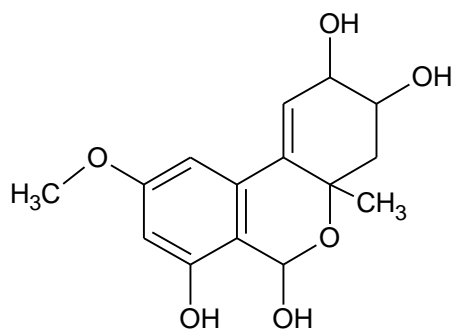
Hlavními mykotoxiny, které rod *Alternaria* produkuje jsou alternariol (AOH) (obr. 8), alternariol monomethyl ether (AME) (obr. 9), altenuen (ALT) (obr. 10) a tenuazonová kyselina (TeA) (obr. 11) (Fraeyman et al. 2017). Mykotoxin TeA může být produkován kromě *Alternaria* také *Pyricularia oryzae* a *Phoma sorghina* (Rychlík et al. 2016). Chemickou strukturou patří mezi deriváty tetramové kyseliny, zatímco AOH, AME a ALT zase mezi tzv. dibenzo- $\alpha$ -pyrony (Escriva et al. 2017).



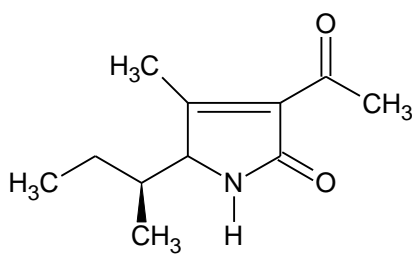
Obrázek 8: AOH



Obrázek 9: AME



Obrázek 10: ALT

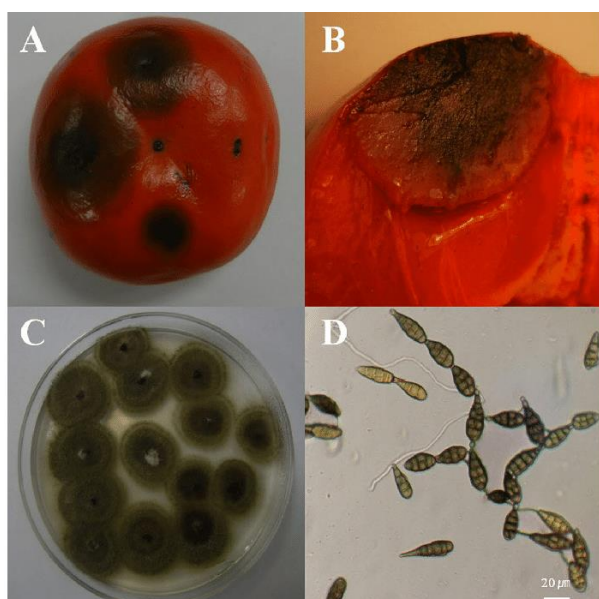


Obrázek 11: TeA

Právě tyto mykotoxiny jsou považovány za hlavní toxické alternariové mykotoxiny, jelikož jsou poměrně známy svou přítomností v potravinových komoditách (Patriarca 2016), kde se obvykle vyskytují v rozmezí  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a za extrémních podmínek i v  $\text{mg}/\text{kg}$  (Lemke et al. 2016).

Optimální růstovou teplotou pro *Alternaria* je rozmezí 22 až 30 °C, přičemž své toxiny dovedou produkovat i za snížených teplot a nízké vodní aktivity. V přírodě je *Alternaria* velice rozšířený rod, který kolonizuje především na obilovinách, ovoci a zelenině během sklizně, přepravy či skladování (Escriva et al. 2017). Vyskytovat se může také v půdě nebo na stěnách domů (Gotthardt et al. 2019).

Obecně mají *Alternaria* dobrou akumulaci schopnost v jedlých částech rostlin, kde následně způsobují rostlinám onemocnění mající za následek kazivost plodů nebo jader s projevem jako je například černá hniloba na rajčatech a obilovinách, nebo šedá hniloba na citrusových plodech (Gotthardt et al. 2019). Příčinou těchto černých míst na mnoha ovoci a zelenině je především *A. alternata*, skrytá tzv. latentní plíseň (obr. 12), jejíž vývoj nastává během chladného skladování (Shu et al. 2019). Z tohoto důvodu jsou *Alternaria* běžně detekovány v potravinách jako jsou ořechy, rajčata a rajčatové produkty, olivy, citrusové plody a v produktech z těchto surovin vyrobených (Patriarca 2016).



Obrázek 12: *A. alternata*: A - černé skvrny plísně *A. alternata* na rajčeti; B - vertikální řez napadeným rajčetem; C - kolonie plísně *A. alternata*; D - konidie (Lee et al. 2013)

*Alternariím* je věnována pozornost v různých potravinách jako jsou nové potraviny, ale také obilniny, ovocné šťávy nebo pivo (Patriarca 2016). *Alternaria* se v pivu vyskytují díky přenosu ze sladu, a jak uvádí Bauer et al. (2016), u všech jeho testovaných vzorků piv byl detekován AOH, který se však vyskytl v nízkých koncentracích pohybujících se v rozpětí 0,23-1,6 µg/l. Rychlik et al. (2016) ve své studii navíc uvádí, že *Alternaria* kontaminují dokonce i kojeneckou výživu. Zde byl prokázán TeA a to u výživ založených na bázi čiroka/prosa v průměrné koncentraci 380 µg/kg. Nebyly však detekovány AOH a AME. Během analýzy bylo následně zjištěno, že původcem kontaminace zrn byl nejvýznamnější kmen *A. alternata*. Hojný výskyt TeA toxinu také zaznamenal Fraeyman et al. (2017), který uvádí, že TeA je téměř všudypřítomná v sušených ficích, slunečnicových semenech a rajčatových výrobcích. Také vzorky obilnin jsou nejčastěji napadeny tímto alternariovým mykotoxinem, a to v míře 15 až 100 %. V menší míře pak byl nalezen toxin AOH (2,2-3,1 %) nebo AME (3-26 %). Přítomnost mykotoxinů alternariového rodu začíná být navíc běžně detekovatelná v produktech, které bývaly k tomuto rodu pouze náchylné (Patriarca 2016).

### Účinky a toxicita

Přesná toxicita *Alternarií* je stále otázkou výzkumu (Fraeyman et al. 2017), ovšem díky několika provedeným studiím byla v *in vitro* testech prokázána jejich rozdílná toxicita (Solfrizzo 2017). Obecně *Alternaria* vykazují mutagenní, estrogenní a karcinogenní účinky, cytotoxicitu a také schopnosti inhibovat aktivitu enzymů a indukovat prasknutí DNA (Escriva et al. 2017).

Dostupná toxikologická data naznačují, že je za toxin s nevyšší akutní toxicitou ze všech *Alternaria* mykotoxinů považován mykotoxin TeA. Tento toxin na ribosomech inhibuje biosyntézu proteinu a prokazuje různou biologickou aktivitu včetně cytotoxických účinků (Yun et al. 2015; Rychlik et al. 2016). U potkanů, myši a dalších pokusných zvířat způsobil zvracení, slinění, tachykardii, krvácení a hemoragickou gastroenteropatii (Fraeyman et al. 2017). V rámci pokusů na lidech se ukázalo, že je poměrně rychle a téměř úplně vylučován močí (Rychlik et al. 2016; Puntischer et al. 2019). Bohužel stále neexistují dostatečné údaje k tomu, aby bylo možné odvodit jeho tolerovatelný denní příjem (TDI) (Rychlik et al. 2016).

Další mykotoxin AOH je oproti TeA považován za toxin s nízkou akutní toxicitou (Solhaug et al. 2016). Z *in vitro* testů jsou mu spolu s AME přisuzovány genotoxické, mutagenní účinky, estrogenní vlastnosti (Puntischer et al. 2019), a také bylo prokázáno, že tvoří reaktivní formy kyslíku s alespoň jedním nespárovaným elektronem. Toto dovede interagovat s DNA topoisomerázou s důsledkem jednovláknového či dvouvláknového zlomu DNA a jejího oxidativního poškození (Solhaug et al. 2016). Oba toxiny AOH i AME navíc vykazují vyšší negativní účinky oproti svým metabolitům 4-OH-AOH a 4-OH-AME (Solfrizzo 2017) a jsou v Číně často spojovány s vysokou prevalencí rakoviny jícnu (Patriarca 2016). V rámci studie Puntischer et al. (2019) zabývající se metabolismem a vylučováním *Alternaria* mykotoxinů po podání 10 různých mykotoxinů tohoto rodu potkanům se dospělo k závěru, že AOH je poměrně stejně vylučován močí i stolicí, zatímco AME je více eliminován stolicí.

Mimo to toxicita mykotoxinů *Alternaria* může být značně ovlivňována kontaktem s jinými známými druhy mykotoxinů. To prokázali ve své studii Vejdovszky et al. (2016), kde například TeA toxin v kombinaci s mykotoxiny rodu *Fusarium* (deoxynivalenon, nivalenon,

zearalenon a další) na buněčné linii Caco-2 snížil svou toxicitu, zatímco u AOH ve spojení s ZEN nebo  $\alpha$ -ZEN byly pozorovány značné synergické (vzájemným působením zesilující) účinky (Vejdovszky et al. 2017).

### 3.4 Vstup mykotoxinů do trávicího traktu

K příjmu mykotoxinů do organismu může docházet jejich stykem s pokožkou, nebo vdechováním. Nejčastěji jsou však přijímány jako součást stravy a absorbovány v gastrointestinálním traktu, kdy se tak některé mykotoxiny dostávají do organismu v maximálních koncentracích jako je tomu například u AF. Naopak F jsou přijímány jen ve velmi omezené míře (Grenier & Applegate 2013; Ratnaseelan et al. 2018). K absorpci mykotoxinů dochází přes porušený střevní epitel především v proximální části GITu, což způsobí jejich rychlý výskyt v krevním oběhu. K porušení střevního epitelu dochází buď před samotnou absorpcí v horní části střeva, nebo v úseku celého střeva díky neabsorbovaným toxinům, které z důvodu špatné vstřebatelnosti zůstávají v lumen střeva (Grenier & Applegate 2013). Střevní epitel je tedy nejdůležitější bariérou zabraňující průniku škodlivých látek včetně patogenů (Pfeiffer et al. 2011), a také místem, které je nejvíce vystaveno vysokým koncentracím požitých mykotoxinů (Pierron et al. 2016).

Obecně rychlou vstřebatelnost přes GIT v *in vivo* testech vykazuje včetně AF také OTA. Absorbován je zejména pasivním způsobem prostřednictvím žaludku a v proximálním jejunu (Vettorazzi et al. 2014), s následnou vysokou vazebnou afinitou k plazmatickému proteinu. Proto je často nejdetekovatelnějším mykotoxinem krevního séra (Salem & Ahmad 2010). Naopak DON nejprve vstupuje do krevního oběhu, kde po vstřebání v horní části GITu opět přechází do střevního lumen (Grenier & Applegate 2013). Stejně jako u OTA je jeho schopnost absorpce do GITu rychlá a téměř kompletní (Diesing et al. 2011).

Mimo to některé mykotoxiny prokázaly schopnost průchodu enterohepatálním cyklem. Jedná se o cyklus, který způsobuje opětovnou resorpci mykotoxinů, a tím prodloužení jejich retenční doby v GITu (Grenier & Applegate 2013). Tento cyklus je zřejmě zodpovědný za toxicitu F, které jsou přes střevní epitel monogastrů špatně absorbovány, v pouhém rozmezí 1 až 6 % (Dilkin et al. 2010).

Obecně jsou ovlivňujícími faktory přenosu mykotoxinů uvnitř GITu změny hladiny pH a enzymatická aktivita, které mají následný vliv na biologickou dostupnost mykotoxinů v organismu (Gonzalez-Arias et al. 2013).

### 3.5 Interakce probiotik s mykotoxiny

Pro udržení zdraví hostitele vykazuje široká škála mikrobiálních druhů schopnosti inhibovat a degradovat toxiny a toxické sloučeniny včetně mykotoxinů (Di Cerbo et al. 2016). Ty jsou nejčastěji dekontaminovány pomocí plísní, kvasinek a bakterií různého druhu, včetně těch probiotických (tab. 6), které působí jako adsorbenty (Jard et al. 2011). Probiotika obecně inhibují patogeny pomocí sníženého pH, soutěžením s nimi o místa adheze a živiny a také díky produkci antimikrobiálních látek. Tyto interakce s patogeny v GITu jsou přitom jedním z hlavních kritérií pro výběr nových probiotik k lidskému použití a důvod, proč jsou záměrně do potravin přidávány. Důležitou podmínkou pro dekontaminace mykotoxinů pomocí probiotik



jsou však jejich vzájemné vazebné interakce bakterie-toxin v GITu (Salminen et al. 2010), a především aktivní vazba mykotoxinů na buněčnou stěnu bakterií. Tyto vazby jsou ovlivněny adsorpční kapacitou mykotoxinů (Perczak et al. 2018), stabilitou a dobou komplexu v GITu (Shetty & Jespersen 2006). Navíc jsou z pohledu probiotik druhově a kmenově specifické. Různá je i následná účinnost odstranění těchto toxinů, která se i mezi jednotlivými probiotickými kmeny významně liší (Salminen et al. 2010).

Obecně se za nejúčinnější probiotické rody, které dekontaminují mykotoxiny, považuje *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Nejvíce všestranným se zdá být *L. rhamnosus*, který účinně odstraňuje několik mykotoxinů najednou (Perczak et al. 2018).

**Tabulka 6:** Mikroorganismy se schopností inhibice mykotoxinů

Bakterie	Kvasinky	Plísně
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>A. carbonarius</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>Oenococcus oeni</i>		<i>Trichoderma</i>
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>		

(Piotrowska 2014; Kumar et al. 2017)

K inhibici produkce nejobávanějších AF a k zabránění jejich absorpce a distribuce v organismu z různých potravinových produktů napomáhá především rod *Lactobacillus* spp., rod *Bifidobacterium* a další BMK (Kabak et al. 2009; Ahlberg et al. 2015). AF nejsou z roztoku odstraňovány bakteriálním metabolismem, jak se dříve domnívalo, ale samotnou vazbou na buněčné stěny bakterií (Salminen et al. 2010), nejspíše pomocí peptidoglykanů a polysacharidů umístěných ve stěně bakterie (Kabak et al. 2009). K účinnosti je vyžadována přímá vazba v krátkém časovém období, a aby nedocházelo k uvolňování toxinu, musí být afinita probiotika např. s AFB1 velmi silná (Liew et al. 2018). Mnohé studie *in vitro* Peltonen et al. (2000); Kabak et al. (2009) zjistily, že vazba různých druhů AF k probiotikům je uskutečněna v rozmezí 5,8 až 38 %, a díky Salminen et al. (2010) bylo zjištěno, že aby byl AFB1 účinně odstraněn, je zapotřebí  $10^9$  KTJ/ml, přičemž celkový počet AFB1, který může být vázán na jednu životaschopnou bakterii činí  $10^7$ .

Kromě AF mohou být odstraňovány díky vazbě na probiotika také další méně toxické mykotoxiny, jako například OTA (Salminen et al. 2010). Ten spolu s DON a ZEN prokázal vazbu s BMK např. s *Bifidobacterium*, nebo dalším rodem *Propionibacterium* (Jard et al. 2011). Nejvyšší vazebná schopnost OTA byla přitom zjištěna u enterálních bakterií *L. acidophilus*, *L. plantarum* a *L. brevis* (Piotrowska 2014). ZEN a také F vykazují vazebnou schopnost k fermentačním bakteriím rodu *Streptococcus* a *Enterococcus*, přičemž u ZEN se předpokládá, že jeho vazba na BMK je zprostředkována díky uhlohydrátovým částem buněčných stěn těchto bakterií pomocí hydrofóbních interakcí (Niderkorn et al. 2007).

Veškeré tyto vzájemné vazby mykotoxinů s mikrobiotou GITu a jejich následná dekontaminace jsou alespoň částečně prozkoumány. Mykotoxiny však svou přítomností a rozmanitostí biologické dostupnosti v GITu mohou naopak také střevní mikrobiotu ovlivňovat. Dovedou tak působit na probiotika zde umístěná a sloužící spolu s epitelem a hlenem jako fyzická, biologická a chemická ochrana střevní bariéry. Prokázáno tak například

bylo, že DON napadá střevní hlen, konkrétně pohárkové buňky, a může tak docházet k ovlivnění adheze. Obecně se však předpokládá, že především chronická expozice mykotoxinům může ovlivňovat složení, hojnost a metabolickou aktivitu skupin kmenů, a dokonce i rodů (Robert et al. 2017).

Existuje ovšem také málo údajů ohledně schopnosti střevní mikrobioty mykotoxiny metabolizovat. Tento proces přitom může ovlivnit biologickou dostupnost a následný dopad mykotoxinů na lidské zdraví (Lemke et al. 2016). Takto zkoumány byly například mykotoxiny rodu *Alternaria*. Lemke et al. (2016) uvádí, že mykotoxiny nebyly mikrobiotou GITu metabolizovány a zůstaly chemicky i metabolicky stabilní, a také že je AOH alespoň částečně vázán na bakteriální buňky nekovalentním způsobem.

Z těchto důvodů nás zajímalo, jaký vliv mají mykotoxiny rodu *Alternaria* na adhezi laktobacilů v *in vitro* modelu lidského střeva.

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Pro testování byly použity modely buněčných linií lidského kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2, které byly zakoupeny od American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, USA).

Použité bakteriální druhy *L. plantarum* a *L. gasserri* byly získány ze sbírky KMVD, alternariové mykotoxiny alternariol (AOH) a alternariol monomethyl ether (AME) byly laskavě zaslány prof. Rychlíkem z Technické univerzity v Mnichově.

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, penicilin a streptomycin, neesenciální aminokyseliny, fosfátový pufr (PBS), triton X-100, trypsin a fetální bovinní sérum (FBS) byl zakoupen od Sigma-Aldrich (CZ). Kultivační láhve, serologické pipety, petriho misky (VWR collection) a 24-jamkové destičky (NUNC cell culture) byly dodány od Thermo Fisher Scientific (UK). Rogosa agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

### 4.2 Metoda

#### 4.2.1 Kultivace buněčných linií

Pro testování adheze byly použity buněčné linie kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2. Tyto linie byly kultivovány v EMEM s 10 % FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu.

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích přibližně 7 dní, během nichž docházelo k výměně média za čerstvé. Po 6 dnech, kdy byla dosaženo 90% konfluence, byla buněčná vrstva promyta pomocí PBS. Po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu 3 minut. Po této době bylo k suspenzi přidáno 5 ml média. Celý tento obsah byl převeden do centrifugační zkumavky a točen po dobu 10 minut při 150× g. Neutralizovaný trypsin byl následně odstraněn a nahrazen čerstvým médiem, ve kterém byly buňky rozředěny. Buněčná suspenze v poměru 1:10 byla přidána do nové kultivační láhve s čerstvým médiem a umístěna do CO<sub>2</sub> kultivačního boxu s teplotou 37 °C.

Zbytek buněčné linie byl následně naředěn na požadované koncentrace pro založení 24-jamkových destiček.

#### 4.2.2 Založení 24-jamkové destičky

Buněčné linie byly naředěny na finální koncentraci  $4 \times 10^4$  pro samostatné buněčné linie. Takto naředěná buněčná suspenze byla pipetována do 24-jamkové destičky a umístěna do CO<sub>2</sub> inkubátoru, kde byla inkubována minimálně po dobu 14 dní a krmena 2 až 3× týdně.

#### 4.2.3 Příprava bakteriální suspenze

Bakterie byly pěstovány přes noc v MRS bujónu při 37 °C za anaerobních podmínek. Následně bylo odebráno 5 ml narostlé kultury LAC do zkumavky. Bakterie byly

zcentrifugovány při 1000× g, 3× promyty v PBS a následně rozmíchány v 5 ml téhož pufru. Vzniklá suspenze obsahovala přibližně 10<sup>6</sup> až 10<sup>7</sup> buněk v 1 ml, která byla dále použita k testování.

#### 4.2.4 Testování adheze

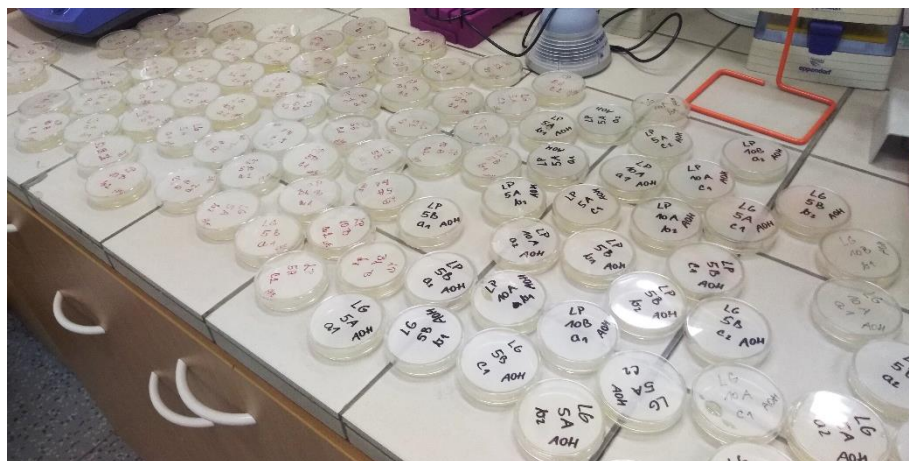
Buněčné linie byly 3× promyty v 1 ml PBS, čímž se buněčné linie očistily a odstranily se tak od antibiotik a fetálního séra. Do každé jamky bylo následně napipetováno 900 µl EMEM bez suplementů, ale s přidáním vzorky AOH v koncentraci 10 µg/ml (38,73 µM) a 5 µg/ml (19,37 µM) a AME také v koncentraci 10 µg/ml (36,73 µM) a 5 µg/ml (18,37 µM). Dále bylo přidáno 100 µl připravených probiotik. Destička byla následně inkubována po dobu 90 minut v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Po inkubaci bylo médium s probiotiky a mykotoxiny odstraněno a monovrstvy buněčných linií byly 3× promyty PBS puftrem pro odstranění nenaadherovaných probiotik. Následně bylo do jamek přidáno 300 µl 1% Triton-X100 na 1 minutu pro uvolnění adherovaných buněk s následnou neutralizací 700 µl PBS.

Pomocí 10× ředění byly ze vzniklé suspenze nachystány ředění, které byly pipetovány v objemu 100 µl na Petriho misky a 2× přelity ROGOSA agarem (obr. 13).

Petriho misky byly v inkubátoru umístěny dnem vzhůru a nechaly se inkubovat při 37 °C po dobu 72 h. Po inkubaci byl následně sečten počet kolonií na jednotlivých miskách. Z počtu kolonií byl následně vypočítán LOG KTJ/ml, odlogován a z výsledných hodnot byla vypočteno % adherence, dle vzorce:

$$\text{Adheze (\%)} = \frac{\text{Počet bakterií ve vzorku}}{\text{Počet bakterií v kontrole}} \times 100$$



Obrázek 13: Petriho misky se vzorky přelité agarem

#### 4.2.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu Graphpad Prism 6. Pro vyhodnocení byl použit dvoufaktorový test významnosti – ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Získaná data byla vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka a následně post-hoc porovnání analyzováno pomocí Tukeyho testu.

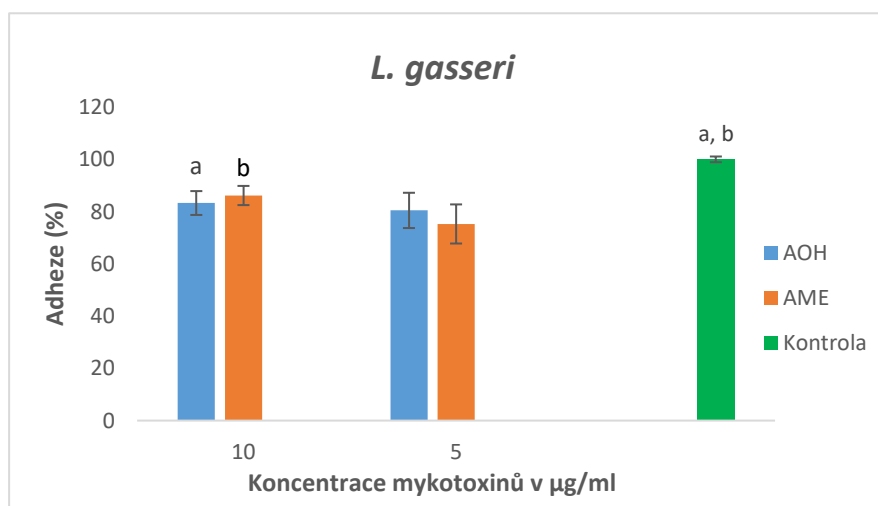
## 5 Výsledky

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

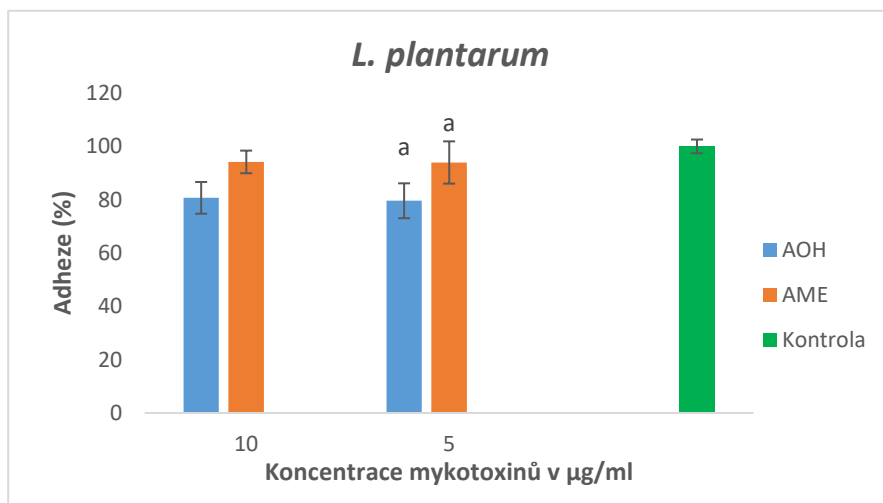
### 5.1 Adheze probiotik s mykotoxiny na HT29 buněčných liniích

Na buněčných liniích HT29 obě probiotika *L. gasseri* i *L. plantarum* po přidání *Alternaria* mykotoxinů adherovaly méně, než tomu bylo u kontroly. Hodnoty adheze *L. gasseri* s AOH v koncentraci 10 µg/ml klesly o 16,72 % a s 5 µg/ml AOH o 19,55 % v porovnání s kontrolou bez AOH. V případě přidaných 10 µg/ml AME hodnoty adheze *L. gasseri* klesly o 13,85 % a s 5 µg/ml AME až o 24,74 % oproti kontrolnímu vzorku bez AME (obr. 14). U *L. plantarum* klesla hodnota adheze s AOH v koncentraci 10 µg/ml o 19,33 % a o 20,43 % s přidaným mykotoxinem v koncentraci 5 µg/ml v porovnání s kontrolou *L. plantarum* bez AOH. Hodnoty adheze *L. plantarum* klesly také s 10 µg/ml AME, a to o 5,85 % a s 5 µg/ml AME o 6,06 % oproti kontrolnímu vzorku probiotika bez mykotoxinu AME (obr. 15).

Na těchto buněčných liniích byly zjištěny statisticky významné rozdíly adheze mezi *L. gasseri* v kontrolním vzorku a *L. gasseri* s 10 µg/ml mykotoxinu AOH a s 10 µg/ml mykotoxinu AME. U *L. plantarum* existuje statisticky významný rozdíl mezi jeho adhezí s mykotoxinem AME v koncentraci 5 µg/ml a s mykotoxinem AOH ve stejné koncentraci 5 µg/ml (tab. 7).



**Obrázek 14:** Adheze *L. gasseri* s přidanými mykotoxiny na HT29 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. Stejné písmeno (**a**, **b**) vyjadřuje statisticky významný rozdíl v rámci adheze *L. gasseri* s mykotoxiny AME a AOH a kontrolou na hladině významnosti  $p \leq 0,05$ . AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether



**Obrázek 15:** Adheze *L. plantarum* s přidáním mykotoxiny na HT29 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky.

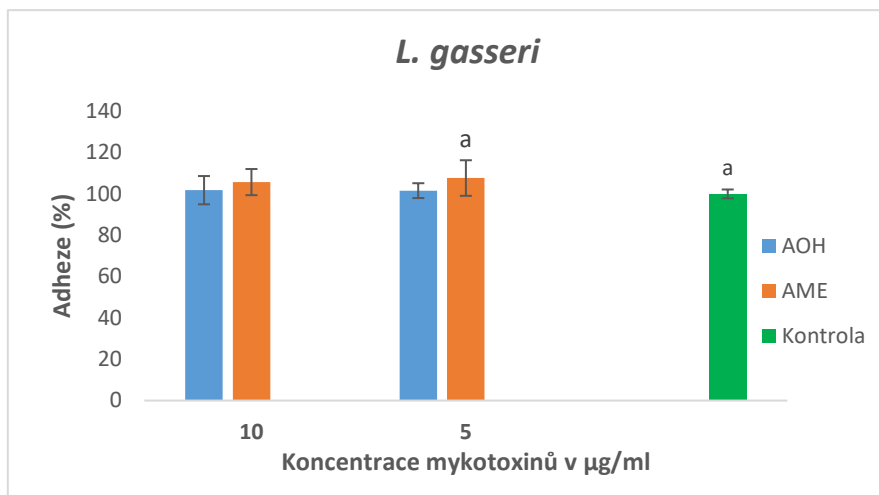
Stejně písmeno **a** vyjadřuje statisticky významný rozdíl adheze v rámci *L. plantarum* s mykotoxiny AOH a AME ve stejné koncentraci na hladině významnosti  $p \leq 0,05$ .

AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether

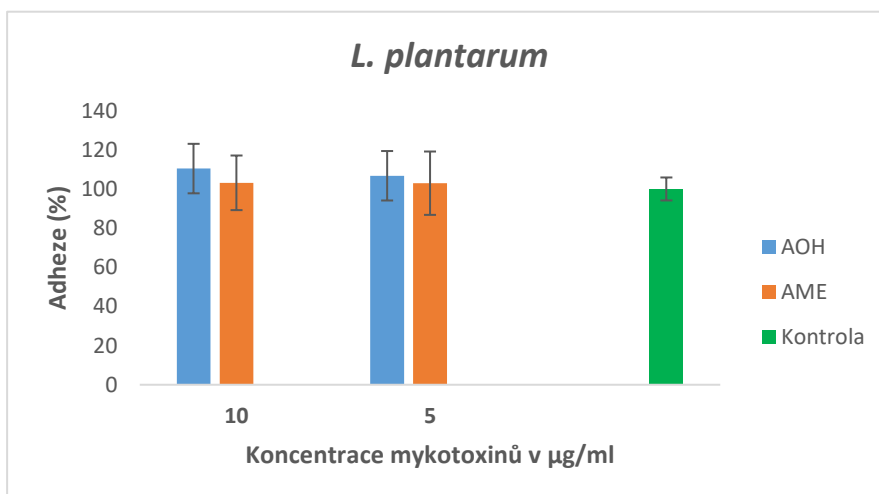
## 5.2 Adheze probiotik s mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích

Na Caco-2 buněčných liniích adherovala obě probiotika se vzorky testovaných mykotoxinů více, než tomu bylo u buněčné linie HT29. U *L. gasseri* hodnoty adheze s 10 µg/ml AOH stouply o 1,80 % a s 5 µg/ml AOH o 1,59 % oproti *L. gasseri* v kontrolním vzorku bez AOH. S 10 µg/ml AME hodnoty adheze *L. gasseri* stouply o 5,72 % a s 5 µg/ml AME až o 7,69 % oproti kontrole bez přítomnosti AME (obr. 16). Také u *L. plantarum* hodnoty adheze stouply, po přidání 10 µg/ml AOH o 10,41 % a po 5 µg/ml o 6,74 % v porovnání s kontrolním vzorkem bez AOH. Stejně tak po přidání AME v koncentraci 10 µg/ml hodnota adherence *L. plantarum* stoupla o 3,13 % a po přidání 5 µg/ml AME o 2,94 % oproti kontrolnímu vzorku tohoto probiotika bez AME (obr. 17).

Stejně jako na HT29 buněčných liniích, také na těchto buněčných liniích byly zjištěny statisticky významné rozdíly adheze, a to u *L. gasseri* v kontrolním vzorku bez přidání mykotoxinů a *L. gasseri* s mykotoxinem AME v koncentraci 5 µg/ml (tab. 7).



**Obrázek 16:** Adheze *L. gasseri* s přidáním mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. Stejně písmeno **a** vyjadřuje statisticky významný rozdíl v rámci adheze *L. gasseri* s mykotoxinem AME a kontrolou na hladině významnosti  $p \leq 0,05$ . AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether



**Obrázek 17:** Adheze *L. plantarum* s přidáním mykotoxiny na Caco-2 buněčných liniích – grafické znázornění adherence v % a směrodatné odchylky. Mezi probiotiky s přidáním mykotoxiny a kontrolou neexistuje statisticky významná rozdílnost. AOH – Alternariol, AME – Alternariol monomethyl ether

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

Tukeyův test pro významné rozdíly; proměnná adheze				
<b>Buněčné linie HT29</b>				
<b>Kmen + mykotoxin</b>	<i>L. gasseri</i> + AOH 0	<i>L. gasseri</i> + AOH 10	<i>L. gasseri</i> + AME 0	<i>L. gasseri</i> + AME 10
<i>L. gasseri</i> + AOH 0		0,0032**	> 0,9999	
<i>L. gasseri</i> + AOH 10	0,0032**			0,9999
<i>L. gasseri</i> + AME 0	> 0,9999			0,0021**
<i>L. gasseri</i> + AME 10		0,9999	0,0021**	
	<i>L. plantarum</i> + AOH 5	<i>L. plantarum</i> + AME 5		
<i>L. plantarum</i> + AOH 5		0,0205*		
<i>L. plantarum</i> + AME 5	0,0205*			
<b>Buněčné linie Caco-2</b>				
<b>Kmen + mykotoxin</b>	<i>L. gasseri</i> + AME 0	<i>L. gasseri</i> + AME 5		
<i>L. gasseri</i> + AME 0		0,0206*		
<i>L. gasseri</i> + AME 5	0,0206*			

Jednotlivé kmeny spolu s přidávanými mykotoxiny v koncentracích 5  $\mu\text{g/ml}$  nebo 10  $\mu\text{g/ml}$ . V případě 0 se jedná o kontrolní vzorek probiotika bez přidávaných mykotoxinů; \* hladina významnosti testu je  $\leq 0,05$ ; \*\* hladina významnosti testu je  $\leq 0,01$



## 6 Diskuze

Mykotoxiny jsou jedny z hlavních potravinových kontaminantů přirozeně se vyskytujících v různých plodinách po celém světě. V důsledku toho mohou přecházet do řady potravin rostlinného či živočišného původu (mléko, vejce, maso) a představovat tak značná zdravotní rizika (Alshannaq & Yu 2017). Ta mohou být díky široké strukturální rozmanitosti mykotoxinů různé. Může se ovšem jednat až o karcinogenní, mutagenní nebo genotoxické účinky (Pankaj et al. 2018).

Veškeré tyto nebezpečné účinky mohou být zprostředkovány poté, co vstoupí do organismu vdechnutím, přes kůži či perorálním požitím. V případě požití je jedním z míst, které s toxickými kontaminanty z potravin přichází do styku, střevní epitel v GITu. Do kontaktu tak přichází také se střevní mikrobiotou, která se zde nachází, a může tak docházet k jejich vzájemným interakcím až k pozměnění mikrobiálního složení (Alassane-Kpembi et al. 2019).

Byla poukázáno na možnost, že mykotoxiny svou vazbou na buněčný povrch bakterií mohou ovlivňovat adhezní vlastnosti probiotik ve střevech hostitele (Kankaanpaa et al. 2000). Adheze je přitom jednou z klíčových vlastností probiotik pro kolonizaci GITu a zprostředkování jejich imunologických účinků. Díky adhezi probiotika stimulují střevní bariéru a metabolické funkce a hrají ochrannou roli také proti enteropatogenům prostřednictvím mechanismů jako je například produkce antimikrobiálních látek nebo soupeření s nimi o vazebná místa hostitelových buněk (Kerry et al. 2018).

Ke zjištění adheze probiotických mikroorganismů k epitelu jsou využívány *in vitro* metody prováděné na buněčných liniích odvozených od adenokarcinomu tlustého střeva jako jsou například buněčné linie typu Caco-2 nebo HT29. Tyto linie se zdají být vhodnou alternativou napodobující situaci *in vivo*, nicméně se stále jedná pouze o model nepostihující veškeré interakce probíhající v GITu, a navíc se tyto buněčné linie standardně nevyskytují ve střevním epitelu. Caco-2 buněčné linie vytváří homogenní a polarizovanou monovrstvu buněk a mohou fungovat jako nediferencované buňky tlustého střeva nebo se mohou diferencovat za účelem napodobení zralým lidským enterocytům tenkého střeva. Nicméně jejich nevýhodou zůstává, že netvoří dostatečnou vrstvu hlenu. Narozdíl od Caco-2 buněčných linií HT29 obsahují pohárkovité buňky produkující hlen, a proto jsou často využívány ke studiím imunitních funkcí a interakcí bakterie-hostitel (Laparra & Sanz 2009; Pearce et al. 2018).

V naší práci byly využity obě tyto buněčné linie HT29 i Caco-2 za účelem zjištění adhezních vlastností probiotických bakterií *L. plantarum* a *L. gasseri* po přidání mykotoxinů rodu *Alternaria* – AOH a AME ve dvou různých koncentracích. Jak je nám známo, dle studií odborné literatury do současnosti nejsou publikované žádné práce, které by se věnovaly interakcím těchto alternariových mykotoxinů s probiotiky. Přesto jsou však dostupné jak *in vitro*, tak *in vivo* výsledky studií pro jiné druhy mykotoxinů, jako jsou například nejznámější a nejčastěji detekovatelné AF nebo OT.

Samotná adheze vybraných druhů probiotik, neošetřených mykotoxiny, byla pozorována v minulých letech provedenými *in vitro* studiemi na různých buněčných liniích jako jsou právě HT29, anebo Caco-2 buňky. Obecně tyto bakterie adherují na obě buněčné linie velmi dobře, a proto jsou často využívány a porovnávány. Postupně však autoři publikují výrazně rozdílné schopnosti adherence pro dané kmeny. Již v roce 2011 Duary et al. (2011) ve své studii uvedl,

že *L. plantarum* má vyšší schopnost adherovat na buněčnou linii HT29 ( $12,8 \pm 1,56$  %), než je tomu na Caco-2 ( $10,2 \pm 1,09$  %). K téměř shodným výsledkům došel také Botes et al. (2008), který zjistil, že *L. plantarum* 423 adheroval na buněčnou linii Caco-2 v procentuálním zastoupení pouhých 8 %, což se liší o pouhá 2 % v porovnání s předešlou studií. *L. plantarum* však dovede vykazovat poměrně vyšší míru adheze, jak uvádí Devi et al. (2018) ve své studii, kde různé druhy tohoto kmene izolované z fermentovaných potravin adherovaly na Caco-2 buněčné linie až kolem 62 %. K téměř stejným výsledkům došla také nedávná studie Garcia-Gonzalez et al. (2018), která zaznamenala, že různé izoláty *L. plantarum* adherovaly ze 77 až 98 %. Zde se ovšem jednalo o buněčnou linii typu NCM460 pocházející z buněk normální střevní sliznice, tedy o nenádorové buňky. Adheze na tuto linii byla druhově specifická a ukázala se velice dobrá interakce kmene s eukaryotickými buňkami s následnou modulací sekrece IL-8, jednoho z nejúčinnějších aktivátorů neutrofilů. Adhezivní vlastnosti druhého probiotického kmene *L. gasseri* byly také zkoumány, a to ve studii zhotovené Jensen et al. (2012). Ta došla ke zjištění, že *L. gasseri* adheruje ke Caco-2 buňkám ze 4 % a k HT29 buněčným liniím naopak méně o zhruba 1 %. Vysokou adhezivní kapacitu zde naopak vykazovaly především různé druhy *L. reuteri*. Podobné výsledky adheze *L. gasseri* na Caco-2 buněčné linie zaznamenal také Matijasic et al. (2003), u kterého *L. gasseri* LF221 adheroval v rozmezí 0,5 % až 7,8 % a *L. gasseri* K7 okolo 1 % v závislosti na pH pufru a počtu buněk. Adhezivnější vlastnosti vykazovaly oba kmeny spíše v kyselejších prostředí a při nižší koncentraci přidaných laktobacilů. Příčinou výrazných rozdílů schopnosti adherovat může být využití nejen různých druhů probiotik, ale také různých buněčných linií a jejich schopností produkovat pro adhezi nepostradatelný hlen, případně dalšími složkami potravy, jak uvádí Volštátová et al. (2015); Volstatova et al. (2019), tak i Jarosova et al. (2018). Mezi takové složky potravy mohou patřit také mykotoxiny.

To, že po styku probiotik s mykotoxiny může docházet k jejich adhezním změnám poukázal Yang et al. (2017). Uvádí, že ke změnám složení mikrobioty trávicího traktu myši dochází po jejich dvoutměsíční expozici krmivu kontaminovaném AFB1. Jeho výsledky prokázaly, že AF snížily jak rodové, tak phyla zastoupení jednotlivých střevních bakterií u myši, které konzumovaly vysoké dávky AFB1 oproti myším s dávkami nižšími a kontrolní skupinou. Pomocí sekvenční analýzy 16S rRNA bylo zjištěno, že se stupňovitým zvyšováním dávek AFB1 docházelo ke snižování rozmanitosti mikrobiálních druhů, a dokonce došlo až k vyčerpání některých BMK, což může značit i možné poškození probiotických mikroorganismů po kontaktu s takto toxickými mykotoxiny (Wang et al. 2016).

Konkrétní adhezivní změny probiotik byly zaznamenány již v roce 2000 v práci Kankaanpaa et al. (2000), zabývající se ovlivněním adhezivních vlastností laktobacilů poté, co interagovaly s AFB1. Bylo zjištěno, že při použití *L. rhamnosus* GG na buněčném modelu Caco-2 došlo ke snížení jeho adherence ze 30 % až na pouhých 5 % díky přidaným AFB1 v koncentraci 5 µg/ml. V našem případě byla adheze *L. gasseri* na Caco-2 zvýšena o 7,69 % po přidání 5 µg/ml AME v porovnání s neošetřenou kontrolou. Zároveň však *L. gasseri* s přidanými AOH i AME v koncentracích 10 µg/ml na HT29 buněčných liniích naopak snížil svou adhezi oproti kontrole o 13,85 % s AME a 16,72 % s AOH. Rozdílné změny v hodnotách adheze probiotik mohou být ovšem také způsobeny druhem mykotoxinu, jelikož v našem případě byly použity *Alternaria* mykotoxiny, které nemusí mít na mikrobiotu takový vliv jako velmi nebezpečné AF. Kankaanpaa et al. (2000) ještě navíc uvádí, že *L. rhamnosus* GG je spolu

s *L. rhamnosus* LC-705 nejvíce adherujícími probiotickými kmeny lidského původu se schopností odstraňovat přibližně 80 % AFB1. Z tohoto důvodu mohou být bakterie se schopností vázat AF a se současnou ztrátou svých adhezivních vlastností pro člověka prospěšné. Zabraňují tím totiž absorpci AF, jejich zvýšené expozici v organismu a v neposlední řadě tím zvyšují jejich vylučování. Stejný efekt AF na probiotika zaznamenal také Gratz et al. (2004), který uvádí, že vazbou AFB1 na *L. rhamnosus* GG došlo ke snížení jeho adheze k buněčným liniím Caco-2. Během studie se navíc ukázalo, že došlo ke snížení vazby probiotik na střevní hlen GITu, pokud byly bakterie preinkubovány spolu s AF, a stejně tak ke snížení vazby mezi *L. rhamnosus* GG a AFB1, pokud byly naopak bakterie preinkubovány spolu s hlenem. Výsledek byl ovšem ovlivněn použitím různých koncentrací proteinu hlenu a také počtem bakterií (KTJ/ml) v použité suspenzi.

Navíc jak publikoval Dogi et al. (2017) AFB1 mohou ovlivňovat také další potenciální probiotický kmen a to *S. cerevisiae* typu RCO16. Studie byla zaměřena kromě vlivu mykotoxinů na ultrastrukturu kvasinek také na efekt těchto kvasinek na střevní klky potkanů vystavených AFB1. Výsledky prokázaly, že AFB1 vyvolaly zvýšení délky klků, šířky a hloubky krypt a snížení počtu pohárkových buněk, které byly zlepšeny po přidání *S. cerevisiae* RC016. AFB1 kromě toho zvýšily průměr kvasinkových buněk, což může být výhodou a zlepšit tak účinnost adsorpce mykotoxinů a jejich následné vyloučení z organismu. Z tohoto důvodu se tak může jednat o nový typ probiotik, které mohou sloužit jako aditivum v potravinách, a především v krmivu.

Dalším kontaminujícím mykotoxinem, který může střevní mikrobiotu ovlivnit, je OTA. Ukázalo, se že podávání OTA v různých koncentracích potkanům vyvolalo výrazné snížení diverzity střevní mikrobioty, a naopak zvýšení relativní hojnosti *Lactobacillus*, což naznačuje, že právě tento rod hraje klíčovou roli při detoxikaci těchto mykotoxinů v *in vivo* modelech a je tak vůči OTA odolný (Guo et al. 2014). Podobné závěry vyvozuje také studie Ouethrani et al. (2013), kde byla degradace a změna diverzity mikrobioty tlustého střeva způsobena OTA izolovaným z kontaminované kávy. OTA způsobil ztrátu prospěšných probiotických druhů *L. reuteri* a *Bifidobacterium*, což naznačuje, že i OTA má negativní vliv na zdraví hostitele prostřednictvím střevní mikrobiální modulace stejně jako AF.

Kromě těchto studií zabývajících se vlivem mykotoxinů na střevní mikrobiotu Manda et al. (2015) uvádí, že *in vitro* efekt DON použitého v koncentracích 0,37 – 1,50  $\mu\text{M}$ , v relevantních potravinách kontaminovaných tímto toxinem, má vliv na proliferaci nediferencovaných Caco-2 buněk. Nízké koncentrace DON mohou proliferaci, jak udržet, tak i omezit v závislosti na stavu proliferace a dané koncentraci toxinu. Navíc se ukázalo, že supernatant směsi *Lactobacillus* zde poměrně působil proti inhibici proliferace buněk způsobené DON, což naznačuje na další možné interakce probiotik spolu s mykotoxiny. Tyto dopady byly studovány také u mykotoxinů rodu *Alternaria*. Jelikož mohou být potraviny kontaminovány více než jedním mykotoxinem tohoto rodu, byly zde vyhodnocovány také jejich možné synergické účinky. Na Caco-2 buněčných liniích bylo zjištěno, že AOH spolu s AME v koncentračním rozmezí 3,125 až 30  $\mu\text{M}$  a poměru 1:1 snižují proliferaci, a tím životaschopnost buněk lidského karcinomu ve větší míře, než pokud byl použit samotný AOH. Tento synergický efekt nebyl schopen být potlačen ani přidáním kvercetinu – nejčastějšího antioxidantu v potravě (Fernández-Blanco et al. 2016). V našem případě byly oba mykotoxiny společně s laktobacily použity také na Caco-2 buňkách v podobných koncentracích – AOH

(38,73  $\mu\text{M}$  a 19,37  $\mu\text{M}$ ) a AME (36,73  $\mu\text{M}$  a 18,37  $\mu\text{M}$ ) a lze tedy předpokládat, že i u nás by synergický efekt mohl mít negativní dopad stejně jako DON, a je otázkou, zda by přidaná probiotika mohla interakci zmírnit.

Veškeré tyto výsledky z předložených studií tedy poukazují na to, že mykotoxiny, stejně jako v našem případě mykotoxiny AOH a AME rodu *Alternaria*, mohou ovlivnit adhezi probiotik, což je v souladu s naší hypotézou. Jak navíc uvádí Yang et al. (2017), mykotoxiny jako jsou AFB1 a OTA ovlivňují také další důležité vlastnosti probiotických mikroorganismů a také celkovou stabilitu a diverzitu střevní mikrobioty, což dovedou ovšem ovlivnit také další mykotoxiny jako je například ZEN nebo FB1, a to různými způsoby. Jak je navíc patrné, mykotoxiny mohou být i ve velmi nízkých koncentracích efektivní také na buněčné modely simulující prostředí *in vitro* a jejich vzájemná interakce s probiotiky tak mohou hrát významnou úlohu pro lidské zdraví.

Jelikož se tedy AOH a AME řadí mezi mykotoxiny, které jsou v posledních letech často detekovány ve výživě lidí a zvířat, je velice pravděpodobné a můžeme tedy předpokládat, že u osob vystavených těmto toxinům prostřednictvím potravy může běžně docházet ke změnám střevního mikrobiomu, a s ním spojeným poruchám imunitních odpovědí a dalších metabolických funkcí. Běžně se totiž vyskytují v široké škále krmiv a potravinových komodit (obiloviny, zelenina, ovoce), jak prokázaly studie Asam et al. (2011); Scott et al. (2012), kde se navíc často jednalo o potravinové složky, které jsou ve velké oblibě konzumovány i dětmi, anebo jsou přímo hlavní součástí jejich výživy. To znamená, že ke změnám střevní mikrobioty může docházet již od raného dětství, jak je patrné také díky studii provedené Rychlik et al. (2016), kde se v kojenecké výživě na bázi čiroka a prosa často vyskytoval další významný *Alternaria* mykotoxin TeA. Autory ovšem nejsou vylučovány ani další toxikologické účinky těchto toxinů na celkové zdraví, a to i přes to, že byly v těchto studiích nalezeny jejich poměrně nízké hodnoty (0,1-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Mnohem vyšší hodnoty (3-250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) byly však nalezeny v krmivu, což naznačuje na nepřímý vstup mykotoxinů do organismu prostřednictvím potravy živočišného původu.

Z důvodu tak častého výskytu AOH v běžných potravinových komoditách je zájem také o přesné toxické účinky s ohledem na možný vliv tohoto mykotoxinu na lidskou DNA. Solhaug et al. (2015) se tímto problémem zabýval a na základě výsledků odhalil, že AOH v koncentraci 30  $\mu\text{M}$ , což je téměř stejné množství, jaké bylo použito i v naší práci, skutečně dovede indukovat poškození DNA řetězce, způsobovat morfologické změny makrofágů a ovlivňovat také zánětlivé reakce. Toto zjištění tak potvrzuje hypotézy o možných genotoxických účincích tohoto stále ještě neúplně prozkoumaného mykotoxinu.

Z veškerých těchto nebezpečných dopadů, a také kvůli stále častému výskytu alternáriových mykotoxinů v běžných potravinových komoditách je zapotřebí, aby bylo toto téma dalšími studiemi prozkoumáváno a zjišťován byl spolu se změnou adhezenčních vlastností probiotik (včetně rodu *Lactobacillus*) také celkový vliv různých mykotoxinů (včetně rodu *Alternaria*) na veškerou mikrobiotu GITu. Mykotoxiny totiž mají, těmito prozatím neznámými mechanismy, vliv prostřednictvím střevní mikrobioty také na metabolismus a celkové zdraví svého hostitele, což je činí velice nebezpečnými kontaminanty (Liew & Mohd-Redzwan 2018).

## 7 Závěr

- Tato diplomová práce zabývající se vlivem mykotoxinů na adhezi probiotických mikroorganismů přinesla nové poznatky prokazující dopad nebezpečných kontaminantů potravin (mykotoxinů) na mikrobiotu gastrointestinálního traktu (probiotika).
- Bylo zjištěno, že došlo ke statisticky významnému snížení hodnot adheze *L. gasseri* s mykotoxinem AOH v koncentraci 10 µg/ml o 16,72 % a s mykotoxinem AME ve stejné koncentraci 10 µg/ml o 13,85 % oproti kontrole na HT29 buněčných liniích.
- Naopak bylo také prokázáno, že vzájemnou interakcí probiotik s mykotoxiny nastalo zvýšení hodnot adheze *L. gasseri* s mykotoxinem AME v koncentraci 5 µg/ml o 7,69 % v porovnání s kontrolou na Caco-2 buněčných liniích.
- Stanovená hypotéza, která říká, že po kontaktu s mykotoxiny může docházet ke změně vlastností probiotických bakterií v trávicím traktu hostitele, byla tímto potvrzena.
- Vzhledem k získaným výsledkům je tedy patrné, že mykotoxiny ovlivňují adhezní vlastnosti probiotik, a proto by se budoucí výzkumy měly touto problematikou nadále zabírat. Zjišťováno by mělo být nejen působení mykotoxinů rodu *Alternaria*, ale také ostatních mykotoxinů, které jsou v různých potravinách běžně detekovány. Zapotřebí je ovšem také zjistit dopad na další probiotika včetně rodu *Lactobacillus*, a také možný dopad mykotoxinů na celkovou mikrobiotu GITu, se kterou přichází do kontaktu a možnosti jejich vzájemných interakcí již přímo v potravinách.

## 8 Literatura

- Adam MAA, Tabana YM, Musa KB, Sandai DA. 2017. Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer (Review). *Oncology Reports* **37**:1321-1336.
- Ahlberg SH, Joutsjoki V, Korhonen HJ. 2015. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *Int J Food Microbiol* **207**:87-102.
- Alassane-Kpembi I, Pinton P, Oswald IP. 2019. Effects of Mycotoxins on the Intestine. *Toxins* **11**:3.
- Alshannaq A, Yu JH. 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **14**:20.
- Arasu MV, Al-Dhabi NA, Ilavenil S, Choi KC, Srigopalram S. 2016. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences* **23**:S6-S10.
- Asam S, Konitzer K, Rychlik M. 2011. Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. *Mycotoxin Research* **27**:23-28.
- Bauer JI, Gross M, Gottschalk C, Usleber E. 2016. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control* **63**:135-139.
- Botes M, Loos B, van Reenen CA, Dicks LM. 2008. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch Microbiol* **190**:573-584.
- Bui-Klimke TR, Wu F. 2015. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **55**:1860-1869.
- Cani PD. 2018. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**:1716-1725.
- Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr* **50**:1-17.
- Cheng LK, O'Grady G, Du P, Egbuji JU, Windsor JA, Pullan AJ. 2010. Gastrointestinal system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**:65-79.
- de Carvalho MP, Weich H, Abraham WR. 2016. Macrocyclic Trichothecenes as Antifungal and Anticancer Compounds. *Current Medicinal Chemistry* **23**:23-35.
- Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* **27**:997-1010.
- Devi SM, Kurrey NK, Halami PM. 2018. In vitro anti-inflammatory activity among probiotic *Lactobacillus* species heck isolated from fermented foods. *Journal of Functional Foods* **47**:19-27.
- Di Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Morales-Medina JC, Iannitti T. 2016. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology* **69**:187-203.
- Diesing AK, Nossol C, Danicke S, Walk N, Post A, Kahlert S, Rothkotter HJ, Kluess J. 2011. Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *PLoS One* **6**:e17472.
- Dieterich W, Schink M, Zopf Y. 2018. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci (Basel)* **6**.
- Dilkin P, Direito G, Simas MMS, Mallmann CA, Correa B. 2010. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B1 containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. *Chemico-Biological Interactions* **185**:157-162.
- Dogi C, Cristofolini A, Pereyra MLG, Garcia G, Fochesato A, Merkis C, Dalcero AM, Cavaglieri LR. 2017. Aflatoxins and *Saccharomyces cerevisiae*: yeast modulates the

- intestinal effect of aflatoxins, while aflatoxin B-1 influences yeast ultrastructure. *World Mycotoxin Journal* **10**:171-181.
- Drago L. 2019. Probiotics and Colon Cancer. *Microorganisms* **7**:11.
- Duary RK, Rajput YS, Batish VK, Grover S. 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian journal of medical research* **134**:664-671.
- Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. 2017. Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology* **8**:15.
- Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. 2015. The Gastrointestinal Microbiome Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Research-Current Reviews* **37**:223-236.
- Escriva L, Oueslati S, Font G, Manyes L. 2017. Alternaria Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. *Journal of Food Quality*:20.
- Farley A, Hendry C, McLafferty E, Johnstone C. 2014. The digestive system. *Nursing Standard* **28**:37.
- Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ. 2016. Role of quercetin on Caco-2 cells against cytotoxic effects of alternariol and alternariol monomethyl ether. *Food Chem Toxicol* **89**:60-66.
- Fijan S. 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **11**:4745-4767.
- Fraeyman S, Croubels S, Devreese M, Antonissen G. 2017. Emerging Fusarium and Alternaria Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. *Toxins* **9**:30.
- Fujii T, Jounai K, Horie A, Takahashi H, Suzuki H, Ohshio K, Fujiwara D, Yamamoto N. 2017. Effects of heat-killed *Lactococcus lactis* subsp *lactis* JCM 5805 on mucosal and systemic immune parameters, and antiviral reactions to influenza virus in healthy adults; a randomized controlled double-blind study. *Journal of Functional Foods* **35**:513-521.
- Fung F, Clark RF. 2004. Health effects of mycotoxins: A toxicological overview. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* **42**:217-234.
- Garcia-Gonzalez N, Prete R, Battista N, Corsetti A. 2018. Adhesion Properties of Food-Associated *Lactobacillus plantarum* Strains on Human Intestinal Epithelial Cells and Modulation of IL-8 Release. *Frontiers in Microbiology* **9**:11.
- Gerber R, Lou LL, Du LC. 2009. A PLP-Dependent Polyketide Chain Releasing Mechanism in the Biosynthesis of Mycotoxin Fumonisin in *Fusarium verticillioides*. *Journal of the American Chemical Society* **131**:3148-+.
- Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. 2015. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases* **60**:S98-S107.
- Gonzalez-Arias CA, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2013. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: a review. *World Mycotoxin Journal* **6**:167-184.
- Gotthardt M, Asam S, Gunkel K, Moghaddam AF, Baumann E, Kietzi R, Rychlik M. 2019. Quantitation of Six Alternaria Toxins in Infant Foods Applying Stable Isotope Labeled Standards. *Frontiers in Microbiology* **10**:14.
- Gratz S, Mykkanen H, Ouwehand AC, Juvonen R, Salminen S, El-Nezami H. 2004. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B-1 in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6306-6308.
- Grenier B, Applegate TJ. 2013. Modulation of Intestinal Functions Following Mycotoxin Ingestion: Meta-Analysis of Published Experiments in Animals. *Toxins* **5**:396-430.

- Guo M, Huang K, Chen S, Qi X, He X, Cheng WH, Luo Y, Xia K, Xu W. 2014. Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin a and gut microbiota. *Toxicol Sci* **141**:314-323.
- Hallas-Moller M, Nielsen KF, Frisvad JC. 2016. Production of the Fusarium Mycotoxin Moniliformin by *Penicillium melanoconidium*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:4505-4510.
- Hollister EB, Gao CX, Versalovic J. 2014. Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. *Gastroenterology* **146**:1449-1458.
- 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 and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **28**:1590-1609.
- Jarsova V, Dorskocil I, Volstatova T, Havlik J. 2018. Adhesive Property of Different Strains of Lactobacilli in The Presence of Resveratrol. *Scientia Agriculturae Bohemica* **49**:291-296.
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **153**:216-222.
- Kabak B, Brandon EF, Var I, Blokland M, Sips AJ. 2009. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B(1) and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *J Environ Sci Health B* **44**:472-480.
- Kamle M, Mahato DK, Devi S, Lee KE, Kang SG, Kumar P. 2019. Fumonisin: Impact on Agriculture, Food, and Human Health and their Management Strategies. *Toxins* **11**:23.
- Kankaanpaa P, Tuomola E, El-Nezami H, Ahokas J, Salminen SJ. 2000. Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. *J Food Prot* **63**:412-414.
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr* **2013**:481651.
- Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* **26**:927-939.
- Koszegi T, Poor M. 2016. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins* **8**:25.
- Kovac M, Subaric D, Bulaic M, Kovac T, Sarkanj B. 2018. Yesterday masked, today modified; what do mycotoxins bring next? *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju-Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **69**:196-214.
- Kumar M, et al. 2012. Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Experimental Diabetes Research*:14.
- Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. 2017. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology* **7**:10.
- Laparra JM, Sanz Y. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* **49**:695-701.
- Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3630-3635.
- Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, Picu A, Petcu L, Chifiriuc MC. 2018. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Frontiers in Immunology* **9**:18.
- Lee JH, Kim J, Kwak YS. 2013. First Report of Black Spot Disease Caused by *Alternaria alternata* on Sweet Persimmon Fruits. *Mycobiology* **41**:167-169.



- Lemke A, Burkhardt B, Bunzel D, Pfeiffer E, Metzler M, Huch M, Kulling SE, Franz CMAP. 2016. Alternaria toxins of the alternariol type are not metabolised by human faecal microbiota. *World Mycotoxin Journal* **9**:41-50.
- Liao DH, Zhao JB, Gregersen H. 2009. Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology* **15**:169-176.
- Liew WPP, Mohd-Redzwan S. 2018. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **8**:17.
- Liew WPP, Nurul-Adilah Z, Than LTL, Mohd-Redzwan S. 2018. The Binding Efficiency and Interaction of *Lactobacillus casei* Shirota Toward Aflatoxin B1. *Frontiers in Microbiology* **9**:12.
- Liu Y, et al. 2019. The Perturbation of Infant Gut Microbiota Caused by Cesarean Delivery Is Partially Restored by Exclusive Breastfeeding. *Frontiers in Microbiology* **10**:11.
- Lu L, Seenivasan R, Wang YC, Yu JH, Gunasekaran S. 2016. An Electrochemical Immunosensor for Rapid and Sensitive Detection of Mycotoxins Fumonisin B1 and Deoxynivalenol. *Electrochimica Acta* **213**:89-97.
- Manda G, Mocanu MA, Marin DE, Taranu I. 2015. Dual Effects Exerted in Vitro by Micromolar Concentrations of Deoxynivalenol on Undifferentiated Caco-2 Cells. *Toxins* **7**:593-603.
- Markowiak P, Slizewska K. 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* **9**:30.
- Marroquin-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD, Hayes AW. 2014. Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food and Chemical Toxicology* **69**:220-230.
- Martinez FAC, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, Oliveira RPD. 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances* **31**:482-488.
- Matijasic BB, Narat M, Zoric M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology* **41**:83-88.
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* **3**:802-814.
- Metzler M, Pfeiffer E, Hildebrand AA. 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal* **3**:385-401.
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**:6463-6472.
- Niderkorn V, Morgavi DP, Pujos E, Tissandier A, Boudra H. 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Addit Contam* **24**:406-415.
- Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. 2016. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in Microbiology* **7**:13.
- Ouethrani M, Van de Wiele T, Verbeke E, Bruneau A, Carvalho M, Rabot S, Camel V. 2013. Metabolic fate of ochratoxin A as a coffee contaminant in a dynamic simulator of the human colon. *Food Chem* **141**:3291-3300.
- Pankaj SK, Shi H, Keener KM. 2018. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends in Food Science & Technology* **71**:73-83.
- Patriarca A. 2016. Alternaria in food products. *Current Opinion in Food Science* **11**:1-9.
- Pearce SC, Coia HG, Karl JP, Pantoja-Feliciano IG, Zachos NC, Racicot K. 2018. Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors. *Frontiers in Physiology* **9**:17.
- Peltonen KD, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT. 2000. Binding of aflatoxin B-1 by probiotic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**:1942-1945.

- Perczak A, Golinski P, Bryla M, Waskiewicz A. 2018. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju-Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **69**:32-45.
- Pfeiffer E, Kommer A, Dempe JS, Hildebrand AA, Metzler M. 2011. Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zearanol in Caco-2 cells in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research* **55**:560-567.
- Pierron A, Alassane-Kpembé I, Oswald IP. 2016. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Management* **2**:8.
- Piotrowska M. 2014. The Adsorption of Ochratoxin A by *Lactobacillus* Species. *Toxins* **6**:2826-2839.
- Puntscher H, et al. 2019. First insights into *Alternaria* multi-toxin in vivo metabolism. *Toxicology Letters* **301**:168-178.
- Ratnaseelan AM, Tsilioni I, Theoharides TC. 2018. Effects of Mycotoxins on Neuropsychiatric Symptoms and Immune Processes. *Clinical Therapeutics* **40**:903-917.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**.
- Robert H, Payros D, Pinton P, Theodorou V, Mercier-Bonin M, Oswald IP. 2017. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **20**:249-275.
- 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.
- Salem NM, Ahmad R. 2010. Mycotoxins in food from Jordan: Preliminary survey. *Food Control* **21**:1099-1103.
- Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. 2010. Interaction of probiotics and pathogens--benefits to human health? *Curr Opin Biotechnol* **21**:157-167.
- Salveti E, Torriani S, Felis GE. 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **4**:217-226.
- Sarma UP, Bhetaria PJ, Devi P, Varma A. 2017. Aflatoxins: Implications on Health. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **32**:124-133.
- Schloss S, Hackl T, Herz C, Lamy E, Koch M, Rohn S, Maul R. 2017. Detection of a Toxic Methylated Derivative of Phomopsis A Produced by the Legume-Infesting Fungus *Diaporthe toxica*. *Journal of Natural Products* **80**:1930-1934.
- Scott PM, Zhao W, Feng S, Lau BPY. 2012. *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether in grain foods in Canada. *Mycotoxin research* **28**:261-266.
- Shetty PH, Jespersen L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology* **17**:48-55.
- Shu C, Zhao HD, Jiao WX, Liu BD, Cao JK, Jiang WB. 2019. Antifungal efficacy of ursolic acid in control of *Alternaria alternata* causing black spot rot on apple fruit and possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae* **256**:9.
- 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**:36.
- Solfrizzo M. 2017. Recent advances on *Alternaria* mycotoxins. *Current Opinion in Food Science* **17**:57-61.
- Solhaug A, Eriksen GS, Holme JA. 2016. Mechanisms of Action and Toxicity of the Mycotoxin Alternariol: A Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **119**:533-539.

- Solhaug A, Wisbech C, Christoffersen TE, Hult LO, Lea T, Eriksen GS, Holme JA. 2015. The mycotoxin alternariol induces DNA damage and modify macrophage phenotype and inflammatory responses. *Toxicology Letters* **239**:9-21.
- Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* **474**:1823-1836.
- van Baarlen P, Wells JM, Kleerebezem M. 2013. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology* **34**:208-215.
- Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. Lactobacillus Adhesion to Mucus. *Nutrients* **3**:613-636.
- Vejdovszky K, Hahn K, Braun D, Warth B, Marko D. 2017. Synergistic estrogenic effects of Fusarium and Alternaria mycotoxins in vitro. *Archives of Toxicology* **91**:1447-1460.
- Vejdovszky K, Warth B, Sulyok M, Marko D. 2016. Non-synergistic cytotoxic effects of Fusarium and Alternaria toxin combinations in Caco-2 cells. *Toxicology Letters* **241**:1-8.
- Vettorazzi A, Gonzalez-Penas E, de Cerain AL. 2014. Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model. *Food and Chemical Toxicology* **72**:273-288.
- Volstatova T, Marchica A, Hroncova Z, Bernardi R, Doslak I, Havlik J. 2019. Effects of chlorogenic acid, epicatechin gallate, and quercetin on mucin expression and secretion in the Caco-2/HT29-MTX cell model. *Food Science & Nutrition* **7**:492-498.
- Volštátová T, Havlík J, Doskočil I, Geigerová M, Rada V. 2015. Effect Of Hydrolyzed Milk On The Adhesion Of Lactobacilli To Intestinal Cells. *Scientia Agriculturae Bohemica* **46**:21-25.
- Wang J, Tang L, Glenn TC, Wang JS. 2016. Aflatoxin B1 Induced Compositional Changes in Gut Microbial Communities of Male F344 Rats. *Toxicol Sci* **150**:54-63.
- Wells JM. 2011. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial Cell Factories* **10**:15.
- Winter G, Pereg L. 2019. A review on the relation between soil and mycotoxins: Effect of aflatoxin on field, food and finance. *European Journal of Soil Science* **70**:882-897.
- Yadav AK, Tyagi A, Kumar A, Panwar S, Grover S, Saklani AC, Hemalatha R, Batish VK. 2017. Adhesion of Lactobacilli and their anti-infectivity potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**:2042-2056.
- Yang XA, Liu LL, Chen J, Xiao AP. 2017. Response of Intestinal Bacterial Flora to the Long-Term Feeding of Aflatoxin B1 (AFB1) in Mice. *Toxins* **9**:12.
- Yazar S, Omurtag GZ. 2008. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* **9**:2062-2090.
- Yu X, Lin C, Yu J, Qi Q, Wang Q. 2019. Bioengineered Escherichia coli Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. *Microb Biotechnol*.
- Yun CS, Motoyama T, Osada H. 2015. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme. *Nature Communications* **6**:9.
- Zain ME. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* **15**:129-144.
- Zhang J, Zhang H, Liu SL, Wu WD, Zhang HB. 2018. Comparison of Anorectic Potencies of Type A Trichothecenes T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, and Neosolaniol. *Toxins* **10**:14.

## 9 Seznam tabulek a obrázků

### 9.1 Seznam tabulek

<b>TABULKA 1:</b> SLOŽENÍ MIKROBIOTY V ZÁVISLOSTI NA ZPŮSOBU PORODU A VĚKU JEDINCE .....	10
<b>TABULKA 2:</b> KARCINOGENITA MYKOTOXINŮ.....	16
<b>TABULKA 3:</b> LIMITY PRO AFLATOXINY.....	16
<b>TABULKA 4:</b> LIMITY PRO OCHRATOXIN A.....	17
<b>TABULKA 5:</b> LIMITY PRO PATULIN, DEOXYNIVALENON, ZEARELENON A FUMONISINY .....	17
<b>TABULKA 6:</b> MIKROORGANISMY SE SCHOPNOSTÍ INHIBICE MYKOTOXINŮ .....	25
<b>TABULKA 7:</b> STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ADHEZE – TUKEYHO METODA. HLADINA VÝZNAMNOSTI $P \leq 0,05$ .....	32

### 9.2 Seznam obrázků

<b>OBRÁZEK 1:</b> GASTROINTESTINÁLNÍ TRAKT .....	9
<b>OBRÁZEK 2:</b> LACTOBACILLUS PLANTARUM .....	13
<b>OBRÁZEK 3:</b> AFLATOXIN B1 .....	19
<b>OBRÁZEK 4:</b> OCHRATOXIN A .....	19
<b>OBRÁZEK 5:</b> FUMONISIN B1.....	21
<b>OBRÁZEK 6:</b> DEOXYNIVALENON.....	21
<b>OBRÁZEK 7:</b> ZEARELENON .....	21
<b>OBRÁZEK 8:</b> AOH.....	21
<b>OBRÁZEK 9:</b> AME.....	21
<b>OBRÁZEK 10:</b> ALT.....	22
<b>OBRÁZEK 11:</b> TEA .....	22
<b>OBRÁZEK 12:</b> A. ALTERNATA.....	22
<b>OBRÁZEK 13:</b> PETRIHO MISKY SE VZORKY PŘELITÉ AGAREM .....	28
<b>OBRÁZEK 14:</b> ADHEZE L. GASSERI S PŘIDANÝMI MYKOTOXINY NA HT29 BUNĚČNÝCH LINIÍCH.....	29
<b>OBRÁZEK 15:</b> ADHEZE L. PLANTARUM S PŘIDANÝMI MYKOTOXINY NA HT29 BUNĚČNÝCH LINIÍCH .....	30
<b>OBRÁZEK 16:</b> ADHEZE L. GASSERI S PŘIDANÝMI MYKOTOXINY NA CACO-2 BUNĚČNÝCH LINIÍCH.....	31
<b>OBRÁZEK 17:</b> ADHEZE L. PLANTARUM S PŘIDANÝMI MYKOTOXINY NA CACO-2 BUNĚČNÝCH LINIÍCH .....	31

## 10 Seznam použitých zkratk a symbolů

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

**AFB1** Aflatoxin B1

**ALT** Altenuen

**AME** Alternariol monomethyl ether

**AOH** Alternariol

**BMK** Bakterie mléčného kvašení

**DON** Deoxynivalenon

**DNA** Deoxyribonukleová kyselina

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

**EMEM** Eagle's Minimum Essential Medium

**F** Fumonisin A, B, C, P

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

**FB1** fumonisin B1

**FBS** Fetální bovinní sérum

**GIT** Gastrointestinální trakt

**HT-2** HT-2 toxin

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

**KTJ** Kolonie tvořící jednotky

**OT** Ochratoxiny A, B

**OTA** Ochratoxin A

**PBS** Fosfátový pufr

**SCFA** Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

**T-2** T-2 toxin

**TeA** Tenuazonová kyselina

**TC** Trichoheceny A, B, C, D

**TDI** Tolerovatelný denní příjem

**TTC** Práh toxikologické obavy

**TEN** Tentoxin

**TLC** Tenkovrstvé chromatografie

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

**ZEN** Zearalenon