

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2017**

**Kateřina Vlková**

**Univerzita Pardubice**

**Fakulta chemicko-technologická**

**Efekt kvasinek na růst plísní a produkci mykotoxinů**

**Kateřina Vlková**

**Bakalářská práce**

**2017**

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Vlková**  
Osobní číslo: **C13404**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Efekt kvasinek na růst plísní a produkci mykotoxinů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V úvodu bakalářské práce popište vztahy, kterými se mikroorganismy mohou ovlivňovat během životního cyklu.
2. Zaměřte se na kvasinky, které mohou mít vliv a růst plísní a produkci jejich sekundárních metabolitů. Velice stručně popište jednotlivé rody vybraných kvasinek.
3. Z odborných literárních prací vyjmenujte konkrétní případy různého efektu kvasinek na růst plísní a produkci mykotoxinů. Pokuste se zaměřit na případy ze zdravotnické praxe.
4. V závěru práce se stručně věnujte i tzv. "chytré houbě". Výzkumem této houby se již několik let zabývá lékař z Pardubické krajské nemocnice, a.s., MUDr. Karel Mencl, CSc.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petra Mořková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

**18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

Kateřina Vlková

### **Poděkování**

Děkuji Ing. Petře Mořkové, PhD. za odborné vedení, pomoc a cenné rady, které mi poskytla jako konzultantka a vedoucí mé bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá efektem kvasinek na růst plísní a produkci mykotoxinu. Popisuje vztahy mezi vybranými druhy kvasinek a plísní a mykotoxiny, které plísně tvoří. Stručně je popsáno *Pythium oligandrum*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Mykotoxiny, kvasinky, plísně, *Pythium oligandrum*

## **TITLE**

Effect of yeasts on fungal growth and mycotoxin production

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis deals with effect of yeasts on fungal growth and mycotoxin production. Bachelor thesis describe relation yeasts and fungi and mycotoxins which are produced by fungi. *Pythium oligandrum* is briefly described at the end of thesis.

## **KEYWORDS**

Mycotoxins, yeasts, fungal, *Pythium oligandrum*

## SEZNAM TABULEK A ILUSTRACÍ

Obrázek 1 <i>Pichia anomala</i> .....	25
Obrázek 2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
Obrázek 3 <i>Candida utilis</i> .....	27
Obrázek 4 <i>Trichosporon spp.</i> .....	28
Obrázek 5 <i>Rhodotorula spp.</i> .....	29
Graf 1 Efekt kvasinkek na růst plísni během 1. týdne.....	33
Graf 2 Efekt kvasinkek na růst plísni během 2. týdne.....	34
Tabulka 1 Taxonomie <i>Pythium oligandrum</i> .....	36



## SEZNAM ZKRATEK

ATA	Alimentární toxická alexie
CFU	Kolonie tvořící jednotka
CWPs	Proteiny buněčné stěny (cell wall proteins)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzymový imunoanalytický test (enzyme-linked immuno sorbent assay)
ES	Evropská směrnice
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
NADP	Nikotinamidadeninukleotid fosfát
NADPH	Nikotinamidadeninukleotid fosfát
RNA	Ribonukleová kyselina
Spp.	Druh

# OBSAH

## SEZNAM TABULEK A ILUSTRACÍ

## SEZNAM ZKRATEK

ÚVOD .....	11
<b>1 VZTAHY MEZI MIKROORGANISMY .....</b>	<b>12</b>
<b>2 MYKOTOXINY .....</b>	<b>14</b>
2.1 MYKOTOXINY PRODUKOVANÉ RODEM FUSARIUM .....	15
2.1.1 <i>Trichotheceny a jejich zdravotní rizika (T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol)</i> ..	16
2.1.2 <i>Zearalenon a jeho zdravotní rizika</i> .....	17
2.2 MYKOTOXINY PRODUKOVANÉ RODEM ASPERGILLUS .....	18
2.2.1 <i>Aflatoxiny a jejich zdravotní rizika</i> .....	18
2.3 MYKOTOXINY PRODUKOVANÉ RODEM PENICILLIUM .....	19
2.3.1 <i>Ochratoxiny a jejich zdravotní rizika</i> .....	19
2.4 BIOLOGICKÁ KONTROLA .....	20
2.5 DEKONTAMINACE.....	21
<b>3 KVASINKY .....</b>	<b>23</b>
3.1 MORFOLOGIE KVASINEK .....	23
3.2 <i>PICHIA ANOMALA</i> .....	25
3.3 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	26
3.4 <i>CANDIDA UTILIS</i> .....	27
3.5 <i>TRICHOSPORON SPP.</i> .....	28
3.6 <i>RHODOTORULA SPP.</i> .....	29
<b>4 EFEKT KVASINEK NA RŮST PLÍSNÍ A PRODUKCI MYKOTOXINŮ .....</b>	<b>31</b>
4.1 ÚČINKY KVASINEK <i>PICHIA ANOMOLA</i> A <i>PICHIA GUILLIERMONDII</i> NA RŮST PLÍSNÍ.....	31
4.2 ÚČINEK KVASINEK NA RŮST PLÍSNĚ RODU <i>PENICILLIUM</i> .....	32
4.3 ÚČINEK KVASINKY <i>PICHIA ANOMALA</i> NA <i>PENICILLIUM VERRUCOSUM</i> .....	35
<b>5 PYTHIUM OLIGANDRUM .....</b>	<b>36</b>
5.1 CHARAKTERIZACE <i>PYTHIUM OLIGANDRUM</i> .....	36
5.2 BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	37
5.3 PŮSOBENÍ <i>PYTHIUM OLIGANDRUM</i> .....	38
5.4 PŮSOBENÍ <i>PYTHIUM OLIGANDRUM</i> NA ZDRAVÍ ČLOVĚKA .....	39
5.5 TESTOVÁNÍ BIOPREPARÁTU S OBSAHEM <i>PYTHIUM OLIGANDRUM</i> .....	40
5.6 LÉČBA <i>PYTHIUM OLIGANDRUM</i> U HNISAJÍCÍCH RAN.....	40
5.7 <i>PYTHIUM OLIGANDRUM</i> VE VETERINÁŘSKÉ PRAXI.....	41
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7 POUŽITÉ ZDROJE:.....</b>	<b>43</b>

## Úvod

Tématem této bakalářské práce je objasnit efekt, který mají kvasinky na růst plísní a produkci mykotoxinů. Mezi nejčastější producenty mykotoxinů patří plísně *Penicillium*, *Fusarium* a *Aspergillus*.

Mykotoxiny se nejvíce vyskytují na obilninách, kukuřici a sezamových semenech. Koncentraci mykotoxinů v potravinách je třeba sledovat, kvůli jejich účinkům na zdraví člověka i zvířat. Mykotoxiny mohou působit na buňky jater, ledvin, plic, nervů a imunitního systému. Koncentraci mykotoxinů v potravinách a krmivech upravuje nařízení komise Evropské unie 2015/1005, které vstoupilo v platnost 25.6. 2015.

Obsah mykotoxinů v potravě je snižován několika způsoby. Jedním z nich je vstřebávání v gastrointestinálním traktu, použitím adsorbčních činidel nebo pěstováním s kvasinkami, jako např. *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Candida utilis*. Tato práce popisuje i studie, které vykazují efekt kvasinek na růst plísní při společné kultivaci.

V závěru práce je popsána takzvaná chytrá houba. Jedná se o *Pythium oligandrum*. Tato houba se používá jako biokontrolní činidlo. *Pythium oligandrum* je hojně využíváno v lékařské i veterinární praxi jako léčebný prostředek.

# 1 Vztahy mezi mikroorganismy

Vztahy mezi mikroorganismy lze dělit do následujících skupin.

Komenzálismus je nejjednodušší vztah mezi mikroorganismy. Je to tzv. volné sdružení mikroorganismů které si neškodí, ale ani neprospívají. Je to například soužití bakterií v dutině ústní či na pokožce. Komenzálismus může také znamenat, že jeden druh mikroorganismu vytvoří prostředí (například vhodné pH) pro jiný druh mikroorganismu.

Syntrofismus (synergismus) umožňuje organismům žít v blízkosti jiného organismu, který pomocí enzymů štěpí makromolekuly nebo vylučuje růstové živiny do prostředí. Patří sem zařadit i růst anaerobní bakterií v přítomnosti aerobních bakterií, které odebírají z prostředí kyslík. Dalším příkladem jsou kefírové kultury. Bakterie obsažené v kefírových kulturách okyselují prostředí na pH vhodné pro kvasinky, zatímco kvasinky dodávají růstové látky (Šilhánková, 2002).

Mutualismus dříve také označovaný jako symbióza je vztah, kdy se oba zúčastněné mikroorganismy podílí na soužití a mají z toho prospěch. V přírodě se vyskytuje velmi vzácně. Příkladem je soužití řas a hub, kdy vznikají lišejníky. Dalším příkladem je výskyt *Escherichia coli* v tlustém střevě.

Opakem synergismu je antagonismus, kdy jeden z druhů nepříznivě ovlivňuje jiné druhy. Tentý typ je velmi rozšířený. Příkladem může být rychlé využití živin mikroorganismů, změna fyzikálních a chemických vlastností prostředí (oxidačně redukční potenciál, pH) nebo hromadění metabolitů. Příkladem jsou bakterie mléčného kvašení, které jsou velmi silným antagonistou hnilobných bakterií, díky rychle vytvořené kyselině mléčné se změní pH prostředí, které již není vhodné pro hnilobné bakterie. Dalším příkladem mohou být bakterie produkující antibiotika, které působí na citlivé bakterie již v nízkých koncentracích. Jiným typem uplatnění je ochrana rostlin před patogenními mikroorganismy (Whipps, 2001).

Parazitismus je vztah, kde organismy získávají potřebné živiny od hostitele, kdy mu ale výrazně škodí svými produkty a někdy způsobí i jeho smrt. Parazitismus se vyskytuje mezi mikroorganismy a rostlinami či živočichy, neboť parazitismus mikroorganismu a jiných mikroorganismů je vzácný. Parazité se mohou specializovat jen na určitý druh hostitele.

Metabióza je nejrozšířenější vztah, při němž jsou produkty metabolismu jednoho mikroorganismu využívány jinými mikroorganismy. Jedná se např. o

zkvašování cukerných substrátů kvasinkami kdy vzniká alkoholický nápoj, jenž může následně zocovatět působením octových bakterií (Kalina a Váňa, 2005). Bez tohoto vztahu by nedocházelo k rychlé mineralizaci látek v přírodě a byl by tak narušen přirozený průběh v přírodě.

## 2 Mykotoxiny

Všechny mykotoxiny mají nízkou molekulovou hmotnost a jsou to přírodní produkty, které jsou produkovány jako sekundární metabolity vláknitých hub (Bennett, 1987). Termín mykotoxin byl poprvé použit roku 1962.

Nejčastější producenti mykotoxinů jsou plísně rodu *Penicillium*, *Fusarium* a *Aspergillus*. Nejběžněji se vyskytující mykotoxiny jsou aflatoxiny (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>), ochratoxin A, patulin, citrinin, zearalenon, T-2 a HT-2 toxiny, nivalenol a deoxynivalenol. Z těchto toxinů je největší hrozbou pro lidské zdraví aflatoxin B<sub>1</sub>.

Výskyt mykotoxinů v potravinách je dán nařízením komise Evropské unie 2015/1005, které vstoupilo v platnost 25. června 2015 a nahradilo tak předchozí nařízení č. 1881/2006 ES. Toto nařízení upravuje koncentraci například pro ochratoxin, jehož hladina nesmí překročit týdenní příjem 120 ng/kg tělesné hmotnosti, patulinu jehož nejvyšší možná koncentrace je denně 0,4 μg/kg tělesné hmotnosti a deoxynivalenolu na 0,06 μg/kg tělesné hmotnosti (Nařízení komise 2015/1005).

Plísně jsou silným alergenem a mohou vyvolávat u lidí různá onemocnění kůže, ale i život ohrožující nemoci u lidí s oslabenou imunitou. Mezi tato onemocnění se řadí mykoalergózy, nejčastěji je způsobují plísně *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* a další. Mykotoxikózy jsou způsobeny mykotoxiny, které produkují plísně. Nejčastěji napadají u lidí buňky jater, ledvin, nervů, plic a imunitního systému. Mykotoxiny kontaminují potraviny i krmiva a ohrožují tak lidi i zvířata (Havránková a Ovesná, 2012).

Mykotoxiny, konkrétně citreoviridin (produkovaný *Penicillium citreoviride*) způsobuje akutní kardiální beri-beri. Toto onemocnění způsobuje křeče, paralýzu a srdeční poruchu rytmu Wenckebachovi periody. Detoxikace citreoviridinu probíhá na slunci, protože je silně fotolabilní. Toxin T-2 (produkovaný plísněmi *Fusarium spp.*) způsobuje alimentární toxickou aleukii. Onemocnění se dělí na tři fáze. První fáze je prudký nástup onemocnění v místě vstupu, nejčastěji přes trávicí trakt. Postižený má záněty sliznic trávicího traktu, průjemy a zvracení. Ve druhé fázi přichází zdánlivá úleva, ale v krevním obrazu zaznamenáváme pokles krevních destiček a bílých krvinek. Třetí fáze je nebezpečná v možnosti nástupu sekundární infekce a v krvácení, které může být velmi rizikové pro ženy v menstruačním cyklu, kdy hrozí i vykrvácení. Mezi další onemocnění způsobené mykotoxiny se řadí i toxická

hepatitida, kterou při dlouhodobější expozici vyvolávají aflatoxiny. Existují ovšem kultury, které inaktivují nebo jinak ničí mykotoxiny. *Lactobacillus rhamnosus* váže aflatoxiny a trichotheceny. Kvasinková kultura *Saccharomyces cerevisiae* produkuje enzymy, které štěpí funkční skupiny trichothecenů a laktonový kruh zearelenonu na neškodné metabolity (Doležal, 2012). Výskyt plísní a spór nemusí vždy nutně znamenat velkou produkci mykotoxinů.

## 2.1 Mykotoxiny produkované rodem *Fusarium*

Plísně rodu *Fusarium* jsou jedním z hlavních patogenů obilovin. V České republice se nejčastěji vyskytuje *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*, které napadají obiloviny a tvoří toxické metabolity. Další zastoupení rodu *Fusarium* je například *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* nebo *Fusarium equiseti* (Havránková a Ovesná, 2012).

Nejčastěji celosvětově napadanou obilovinou je pšenice a ječmen, oves a kukuřice u kterých *Fusarium* vyvolává onemocnění fusariosa v zahraničí zvané *Fusarium* (head blight FHB). Symptomy, kterými se fusariosy projevují je celé spektrum, ale následkem je znehodnocení obilného zrní nebo tvorba toxických mykotoxinů ( Wofl-Hall, 2007).

Plísně rodu *Fusarium* tvoří řadu mykotoxinů jako trichotheceny, deoxynivalenol, zearalenol a další. Významným trichothecenem je T-2 toxin. T-2 toxin se nachází ve velké skupině obilnin, například v pšenici, kukuřici, ječmenu, žitu a ovsu a ve zpracovaných obilných produktech jako je slad, chléb nebo pivo. T-2 toxin je znám pro svou schopnost inhibovat syntesu RNA nebo DNA syntesu proteinů, ovlivňovat mitochondriální funkci a další vnitrobuněčné procesy což vede až ke smrti buňky u eukaryotických organismů. Trichotheceny se dělí na 4 podskupiny, které jsou označeny velkými písmeny A, B, C, D. Trichotheceny A a B jsou v obilovinách velmi hojně zatímco C a D jsou v krmivech a potravinách jen vzácně (Hajšlová, 2008).

Zearalenon je produkován druhy *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium culmorum* a dalšími. Zearalenon je toxický, ale méně než ostatní mykotoxiny. Vyskytuje se ve skladovaném obilí a je stabilní i po tepelném zpracování nebo fermentaci. Jelikož je jeho povaha lipofilní, může dojít k jeho přenosu do rostlinných olejů, ale i do cereálií, chleba nebo piva (Velíšek a Hajšlová, 2008).

### **2.1.1 Trichotheceny a jejich zdravotní rizika (T-2 toxin, HT-2 toxin, deoxynivalenol)**

Mezi hlavní příznaky mykotoxikóz patří krvavé průjmy, zvracení, závažné dermatitidy a krvácení. Podle klinických příznaků lze rozdělit onemocnění do čtyř skupin. První skupina zahrnuje odmítání potravy, druhá skupina kožní nekrosu, třetí skupina ovlivňuje gastrointestinální trakt a čtvrtá skupina způsobuje koagulopatii. Výskyt trichothecenů v těle vede k apoptóze *in vitro* i *in vivo* v důležitých tělních orgánech jako lymfatické orgány, krvevorná tkáň, játra, střevní krypty, kostní dřev a brzlík (Yazard and Omurtag, 2008). Při vysokých dávkách trichothecenů se projeví akutní forma zvracením, průjmy, leukocytosou, krvácením a oběhovým selháním, které může vyústit až ve smrt. Při mírně zvýšených dávkách byl pozorován i cytotoxický efekt. Pokud jsou dávky trichothecenů nízké, ale dlouhodobé, projeví se chronická forma onemocnění anorexií, úbytky přírůstkové váhy a dopadem na imunitní systém. Byl sestaven žebříček citlivých zvířat na přítomnost trichothecenů a bylo zjištěno, že krocani a prasata patří mezi citlivá zvířata na přítomnost trichothecenů. Jako méně citlivé na trichotheceny v potravě považujeme kuřata a přežvýkavce. Pokud bychom prováděli histologický průzkum u napadených zvířat, našli bychom buněčnou nekrosu v místě aktivního dělení střevní sliznice, kostní dřev, varletech a vaječnicích (Yazadr and Omurtag, 2008). Informací o toxických účincích trichothecenů na člověka není mnoho, a proto zatím není jisté, zda má na ovlivnění lidského zdraví při intoxikaci trichotheceny vliv dodržování (Sudakin, 2008).

Pokud dojde ke kontaminaci T-2 toxinem, může to mít velmi závažný dopad na člověka i zvířata a v některých případech způsobit i smrt. Hlavními příznaky je pocit na zvracení, zvracení, závrať, zimnice, bolest břicha, krvácení, potraty, kožní nekrózy, nevratné poškození kostní dřev, redukce bílých krvinek (vede až k aleukii), inhibice syntesy proteinů. T-2 toxin je toxický pro lymfatický systém a krvevornost. V imunitním systému má T-2 toxin vliv na počty leukocytů, opožděnou hypersensitivitu, vyčerpání kmenových buněk červené řady a několik dalších závažných dopadů. První popsáný případ toxického účinku T-2 toxin na člověka byl v Číně, kde došlo k nákaze skrze plesnivou rýži napadenou plísní *Fusarium* a byl zde detekován toxin T-2. T-2 toxin byl vyšetřován mezinárodní agentúrou pro výzkum rakoviny skupinou (IARC) a nebyl zařazen do skupiny karcinogenních látek pro člověka (Scientific committee of Food, 2000). Trichotheceny jenž jsou nejzávažnější



jsou T-2 a HT-2. Způsobují kožní problémy, které mohou doprovázet krvácivá ložiska v oblastech na hlavě a u pohlavních orgánů. Dalším onemocněním je alimentární toxická alexie (ATA).

Deoxynivalenol způsobuje při akutní intoxikaci bolest břicha, zvýšené slinění, nevolnost, průjem, zvracení a anorexii. U chronických případů se u zvířat může objevit nižší váha, anorexie a změněná nutriční účinnost, imunotoxický efekt a změny neurochemických látek v mozku. Pokud se zaměříme na citlivost vůči deoxynivalenolu, nejcitlivější jsou prasata, poté následuje drůbež a přežvýkavci. Toto uspořádání je částečně dané díky rozdílnému metabolismu deoxynivalenolu. Také je dokázáno, že samci jsou citlivější než samice. V trichothecenech patří deoxynivalenol mezi méně toxické, avšak jeho vyšší dávka může v těle způsobit šokový stav a smrt. Ze studie akutních stavů u zvířat vyplývá, že deoxynivalenol může mít podobný efekt na člověka. V Asii byl popsán případ onemocnění člověka se symptomy jako zvracení, zimnice a bolest hlavy ve spojitosti s obilím kontaminovaným deoxynivalenonem. V žebříčku IARC se neřadí mezi karcinogenní pro člověka.

### **2.1.2 Zearalenon a jeho zdravotní rizika**

Zearalenon byl objeven u prasat jako původce reprodukční vady známé jako vulvovaginitida (Moss, 2002). Zearalenon způsobuje u zvířat vymizení říje nebo naopak déle trvající říji, sníženou plodnost, menší vrhy a nižší porodní hmotnost. Dalším možným příznakem je pseudogravidita, kterou způsobuje persistence žlutých tělísek na ovariích. Zearalenon je omezeně karcinogenní a teratogenní (Suchý a Herzig, 2005). Zearalenon nejčastěji kontaminuje kukuřici, dále oves, ječmen, pšenice a čirok. Ve vyjíměčných případech se může vyskytovat společně s deoxynivalenolem. Studie dokazují, že zearalenon je velmi rychle metabolizován u zvířat i u lidí. Volná forma může být nalezena i v kravském mléce, ale neovlivňuje veřejné zdraví. Zearalenon a některé jeho metabolity mohou mít kompetitivní vazbu na estrogenové receptory v *in vitro* systému. Vazba na specifický receptor se může prokázat v děloze, v prsních žlázách, játrech a hypothalamu u různých druhů (Scientific committee of Food, 2000). Problémy s plodností způsobené zearalenolem se objevují nejčastěji u sviní a ovcí. Hlavní efekt se projevuje na urogenitálním traktu. Svině jsou nejběžněji napadena zvířata, ale napadena mohou být i laboratorní hlodavci, dobytek a drůbež. Zearalenol také mění pohlavní systém u laboratorních zvířat jako jsou myši, krysy,

guinejská prasata, křečci, králíci nebo domácí zvířata. Zearalenon je nebezpečný i pro malé děti a ještě nenarozený plod, kdy způsobuje předčasný vývoj prsou, ochlupení a zvětšení prsou. Díky vzrůstající poptávce po dobytčím mase, musely být stanoveny povolené hodnoty zearalenolu v mase. V některých zemích, jako USA, mají povolé určité limity, ale v evropských zemích je výskyt zearalenolu v mase zakázán zcela (Yazard and Omurtag, 2008).

## **2.2 Mykotoxiny produkované rodem *Aspergillus***

Aflatoxiny jsou produkovány kmeny *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* atd. Aflatoxiny se za správné teploty a vlhkosti vyskytují v zemědělských plodinách, v kořeni, ořechách a to i muškátových, fíkách nebo sušeném ovoci (Malíř a Ostrý, 2003). Dále se také často vyskytují v arašídových omáčkách, arašídových pastách a směsích, kandovaných arašídech, jádrech broskví, cereáliích, česneku nakládaném nebo v prášku, čokoládě, kukuřičných výrobcích, kukuřičném sladu a škrobu, mandlích, marcipánu, sezamových semenech, rybách, rozinkách, pivu i vínu, prosu a sojové mouce, dokonce i ve špagetách a vaječných výrobcích a dalších (Velíšek, 2002). V potravinách se vyskytují aflatoxiny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>, ostatní z 20ti druhů se nevyskytují v potravinách. Nejčastěji se vyskytující aflatoxin je B<sub>1</sub>, který je zároveň přírodním karcinogenem (Velíšek a Hajšlová, 2009).

### **2.2.1 Aflatoxiny a jejich zdravotní rizika**

Aflatoxiny v těle se hromadí v tělních tekutinách a tkáních a jejich vylučování z organismu je pomalé. Aflatoxiny působí na člověka a zvířata hepatotoxicky. Toxické účinky závisí na míře dávky a délce perorálnímu podávání. Pokud je expoziční dávka vysoká, aflatoxiny způsobují akutní hepatotoxicitu. Akutní hepatotoxicita se projevuje anorexií, gastroenteritidou, krvácením podkoží a z tělních otvorů. Oproti tomu dlouhodobější vystavení nižším dávkám aflatoxinů, způsobuje chronickou hepatotoxicitu. Ta se projeví cirhózou jater, která vede k anorexii, snižuje užitečnost a tělesnou hmotnost. Mezi další účinky aflatoxinů patří účinky mutagenní a teratogenní. Tyto účinky se předpokládají i u lidí. Pokud je člověk nebo zvíře vystaven vlivu aflatoxinů zároveň s vlivem ochratoxinů, jejich účinek se zvyšuje. Jedná se o synergické toxiny (Velíšek, 2002).

## 2.3 Mykotoxiny produkované rodem *Penicillium*

V chladnějších klimatických podmínkách produkují plísně rodu *Penicillium* mykotoxin zvaný ochratoxin A. Mezi jeho účinky patří nefrotoxicita, imunotoxicita, karcinogenita a neurotoxicita. Tyto symptomy se vyskytují u pokusných zvířat, ale i u lidí (Mateo *et al.*, 2007). Ochratoxin A funguje na rychlé absorpci a jako první působí na játra a ledviny. Vyskytuje se v mnoha plodinách od obilovin (ječmen, kukuřice, oves a rýže) po kávu, luštěniny, koření a vinné hrozny a výrobky z nich (Kabak, 2009). Ochratoxin A můžeme nalézt i v dalších potravinách jako například fazole, vepřové maso a výrobky z vepřového masa kontaminovaného potravou zvířat a velmi vzácně i kuřecích vejcích (Putnarić *et al.*, 2001).

### 2.3.1 Ochratoxiny a jejich zdravotní rizika

Na ochratoxin jsou ze zvířat nejcitlivější prasata. Ochratoxiny mají v těle nefrotické, imunotoxické, genotoxické, teratogenní a karcinogenní účinky. Tyto účinky vyvolávají dráždění sliznic trávicího ústrojí a způsobují akutní gastroenteritidu. Ta je příčinou nechutenství, depresí, průjmů a horeček až poškození ledvin u prasat. Tomuto stavu se říká nefropatie prasat. Ochratoxin A je rizikem i pro lidi, protože přechází do masa a tím kontaminuje maso a pokrmy z něj (Suchý a Herzig, 2004). Jeho přímý či nepřímý účinek na lidské zdraví nebyl nikdy vyšetřován ani potvrzen i přes jeho toxicitu otestovanou u zvířat *in vivo* i *in vitro*. Ochratoxin byl vyšetřován ve spojení s prasečí mykotoxickou nefropatií, známou též jako Balkánská endemická encefalopatie. Jedná se o chronické onemocnění tubulointestinálního traktu s neznámou příčinou a odehrálo se před 50ti lety v Rumunsku, Bulharsku a zemích bývalé Jugoslaviie, jako Chorvatsko, Bosna a Hercegovina a několik dalších. Cílem studie bylo určit, zda obilniny ze Slavinski Brodu, na území endemické nefropatie, obsahovaly ochratoxin A a pokud ano, tak tento výskyt porovnat s ostatními plochami se vzácným nebo žádným výskytem onemocnění. Studie měla také pomoci stanovit maximální množství ochratoxinu A v lidském jídle a potravinách (De Koe, 1999).

Při testování vzorků kukuřice a pšenice byl ochratoxin A nalezen v 75,8 % vzorcích pšenice, což je 74 z 92 z testovaných vzorků. V případě kukuřice byl nalezen ve 33,3 %, což je v 17 z 51 případů. V obou případech byly hladiny ochratoxinu mnohonásobně vyšší než jaké dovolují hodnoty Nařízení směrnice (ES) z roku 2015/1005. Hodnoty byly porovnány se stanovením v oblasti Slavinski Brod, oblasti

s endemickým výskytem a oblastí Osijek, která nebyla napadena Balkánskou endemickou nefropatií, ale sporadicky se zde vyskytovala. V obou oblastech byly hodnoty ochratoxinu v kukuřici i pšenici velmi vysoké. Onemocnění nikdy nenastalo u dětí, což dokazuje prodlouženou inkubační dobu a etiologickou expozici. Tento fakt byl potvrzen také tím, že osadníci jsou stejně postiženi onemocněním jako původní obyvatelé, kteří žili v endemické oblasti více než 10 let (Puntarić *et al.*, 2001). Kontaminace jídla ochratoxinem A byla popsána i v mnoha rozvojových zemích a mnoha Afrických zemích. Zvýšená hladina ochratoxinu v séru u napadených mohla být i v důsledku akumulace ochratoxinu v těle zapříčiněná poškozením funkčnosti ledvin dalším etiologickým činidlem. V roce 1997 byly stanoveny maximální limity ochratoxinu A v potravinách, které byly několikrát novelizovány ( Biotox, 2007).

## 2.4 Biologická kontrola

Obsah mykotoxinů v potravinách je monitorován a regulován v mnoha zemích po celém světě (Van Egmond *et al.*, 2007). Byly stanoveny různé strategie biokontrol jako je například rozvoj netoxigenních hub, které zabraňují růstu toxigenním kmenům a redukuje produkci mykotoxinů na plodinách (Cleveland *et al.*, 2003). Dorner a Cole (2002) uvádí, že netoxigenní kmeny *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* snižují aflatoxinovou kontaminaci po sklizni o 95,9%. Kompetitivním vyloučením plísně brání nebo snižují intracelulární růst hyf. Masoud a Kaltoft (2006) popsali *in vitro* inhibici ochratoxinu A, produkovaného *Aspergillus ochraceus*, třemi kvasinkami (*Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* a *Hanseniaspora uvarum*). Kvasinkové druhy jsou slibná biokontrolní činidla, protože neprodukují alergenní spory a obvykle jsou nepatogenní. *Candida oleophila* a *Candida sake* jsou aktivní přísady komerčního produktu BioNext a Candifruit (Janisiewicz a Korsten, 2002, Droby *et al.*, 2009). Kvasinkové druhy se mohou rychle rozvíjet na listech, ovoci a rostlinném povrchu a s ostatními mikroorganismy soutěží o prostor pro růst a výživu. Kvasinky jsou snadno kultivovatelné, rychle vyrůstají a jsou přítomny ve volném životním prostředí (Janisiewicz a Korsten, 2002, Walker, 2011). Houba rodu *Trichoderma* se také podílí na kontrole patogenních hub, k tomu využívá mechanismy jako soutěžení o výživu, antibiosu a mykoparasitismus (Benitez *et al.*, 2004). Schopnost antagonistických hub kontrolovat toxigenní typy závisí na rozdílných efektech makro a mikroklimatických

podmínek patogenního působení (Luongo *et al.*, 2005). Důležitá kritéria pro hodnocení účinnosti biokontrolních činidel zahrnují schopnosti osidlovat cílový substrát nebo část rostliny, schopnost aktivity v různých ekologických podmínkách na poli nebo během skladování, tak aby se shodovala s růstem patogenu a je slučitelná s dalšími kontrolními prostředky bez indukujícího efektu na kompromis kvality konečné komodity (Bacon *et al.*, 2001).

Biologické metody zajišťují dekontaminaci skrz změnu struktury mykotoxinové molekuly bez vzniku vedlejších toxických produktů nebo metabolitů. Tento přístup zajišťuje, že nejsou nijak pozměněny nutriční hodnoty, zastoupení vitamínů, stopových prvků či chutnost potravin (Bakutis *et al.*, 2005).

## 2.5 Dekontaminace

Dekontaminace krmiva a potravin kontaminovaných mykotoxiny může být dosaženo skrz jejich chemoochranu nebo vstřebáváním v gastrointestinálním traktu (Kensler *et al.*, 2004). Jsou různé adsorbční činidla, ale liší se účinností v prevenci mykotoxikózy. Vybraný montmorillonit vápenatý prokázal nejvyšší selektivnost a efektivnost u adsorbce v gastrointestinálním traktu. Esenciální oleje a vodní výluhy z *Aframomum danielli* byly nedávno popsány pro snížení ochratoxinu A v kakaovém prášku o 64 až 95 %. I přestože molekula ochratoxinu je stabilní, je potvrzeno, že okolo 40-90% ochratoxinu je zničeno během pražení kávových zrn (Aroyeun a Adegoke, 2007). Izolace a charakteristika mikroorganismu (kvasinek), které jsou schopny biotransformace mykotoxinů je zlomová v praktickém použití v dekontaminačním procesu přímo v trávicím traktu zvířat. Biologické metody se mohou stát technologickou volbou jako enzymatické reakce nabízející specifitu, ireversibilitu, účinnost a přírodě prospěšnou cestu k detoxikaci, aniž by zanechávali nežádoucí toxická residua a nežádoucí vedlejší produkty (Bakutis *et al.*, 2005).

Mnoho adsorbentů mykotoxinů bylo testováno pro vazby na několik mykotoxinů *in vitro* i *in vivo*. Mezi adsorbenty patří například Mycofix plus 3.0, Mycosorb, Bio-mos a Klinosan. Stupeň adsorpce *in vitro* závisí na chemické struktuře mykotoxinu v závislosti na vlastnostech povrchu a stavbě adsorbentu. Pokud je vazba mykotoxinu dostatečně pevná na adsorbent, bude adsorbci v trávicím traktu zabráněno (Schatzmayer *et al.*, 2004). Studie dokazují, že vybrané druhy kvasinek mohou

redukovat různé mykotoxiny, pokud jsou kvasinky kultivovány na různých rostlinných substrátech.

## 3 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které se řadí mezi houby (Fungi). Od ostatních eukaryotních organismů je odlišuje tvorba pevné a poměrně silné buněčné stěny. Zdrojem uhlíku a energie jsou pro kvasinky převážně cukry, které zkvašují nebo zpracují aerobní respirací. Jejich český název vznikl na základě jejich schopnosti zkvašovat monosacharidy, určité disacharidy a trisacharidy na oxid uhličitý a ethanol, ale i  $H^+$ , glycerol, sukcinát, aceton a další.

Další vlastností kvasinek je lipolýza nebo mohou hydrolýzou uvolňovat mastné kyseliny a také mohou způsobovat žluklou chuť například u sýrů (Görner a Valík, 2004).

### 3.1 Morfologie kvasinek

Tvar a vzhled kvasinek je ovlivňován nejen vnějšími vlivy (složení kultivačního média, koncentrace látek v okolí kvasinky, pH, redoxní potenciál), ale i způsobem rozmnožování, které může probíhat pučením nebo příčným dělením. Tvar kvasinek se může, měnit i v průběhu života kvasinky.

Rotační elipsoid jako základní tvar kvasinek může být pozměněn vlivem vnějších podmínek do tvarů kulovitých. To může nastat při dlouhodobé kultivaci na témže médiu nebo na médiu, které má zvýšenou koncentraci minerálních látek či zvýšené povrchové napětí. Pokud je médium bohaté na kyslík avšak chudé na minerální látky a má nízké povrchové napětí, kvasinky se protahují až do vláknitých forem. Toto protažení do vláknitých forem může nastat i na médiích, po vyčerpání živin. Z takto strukturovaných kvasinek se pak tvoří pravé mycelium dělené přepážkami a pseudomycelium. U pseudomycelia nedochází k oddělování přepážkami, proto nedochází k oddělení mateřských a dceřiných buněk a jako jeden celek se snaží proniknout až k periférii ke zdroji živin.

Tvorba pseudomycelia i pravého mycelia souvisí s aerobním metabolismem kvasinek, a také proto se vyskytuje u drsných kvasinek (R-mutantů), které mají vyšší aerobní metabolismus, což je typické pro rod *Endomyces*, *Sporobolomyces* a *Candida*. Netypickým druhem tvaru kvasinek je rod *Kloeckera*, jehož tvar je podobný citrónu,

rod *Trigonopsis* jehož tvar tvoří trojúhelník a rod *Schizosaccharomyces* jenž je oválný (Šilhánková, 2002).

Kvasinky jsou schopné tvořit toxiny, jejichž podstatou jsou glykoproteiny nebo proteiny. Tyto toxiny vykazují smrtící nebo inhibující účinky proti citlivým kmenům kvasinek. Smrtící fenomén je popsán na mnoha druzích kvasinek jako například *Sacharomyces*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Candia* a *Pichia*. Nesouvisející skupina eukaryotických mikroorganismů je citlivá na antimikrobiální efekt kvasinkového smrtícího toxinu.

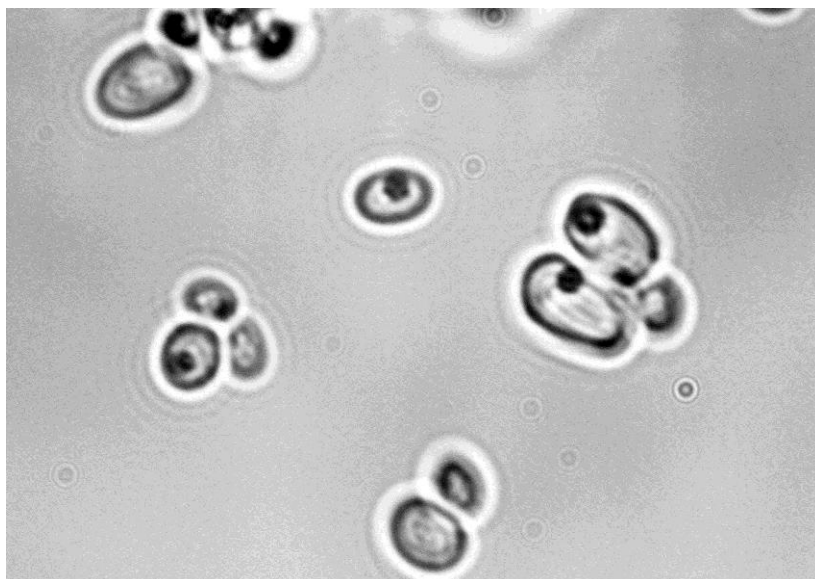
Kvasinky patří mezi jedny z nejpodrobněji prozkoumané organismů. Mají nezastupitelnou úlohu v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, ale i v oboru genového inženýrství. Bývají využívány jako modelové systémy při studiu regulace metabolismu nebo ve studiu genetiky eukaryotních organismů. Mezi nejprobádanější druh kvasinek patří i *Saccharomyces cerevisiae*. V dnešní době jsou po genetické modifikaci kvasinky schopné produkovat i farmakologické preparáty, které slouží k léčbě i prevenci onemocnění. Geneticky modifikované kvasinky jsou nepatogenní (Jin a Speers, 1998). Mezi kvasinky, které slouží jako organismy ke genové modifikaci se řadí převážně tyto *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*. Dále *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha* nebo *Kluyveromyces lactis* (Rosypal a kol., 2002).

Mezi kvasinkovými druhy se vyskytují i takové, které jsou patogenní pro člověka. Většinou se projeví u lidí se sníženou imunitou nebo u jinak oslabených jedinců (po léčbě antibiotiky, u pacientů s leukémií nebo po chirurgické operaci)

Mezi patogenní rody patří například rod *Candida*, *Cryptococcus* nebo *Trichosporon*. Avšak v poslední době k nim přibývají i rody jako *Rhodotorula*, *Saccharomyces* nebo *Geotrichum* (Bonini *et al.*, 2008).



### 3.2 *Pichia anomala*



Obrázek 1 *Pichia anomala* Dostupné z:

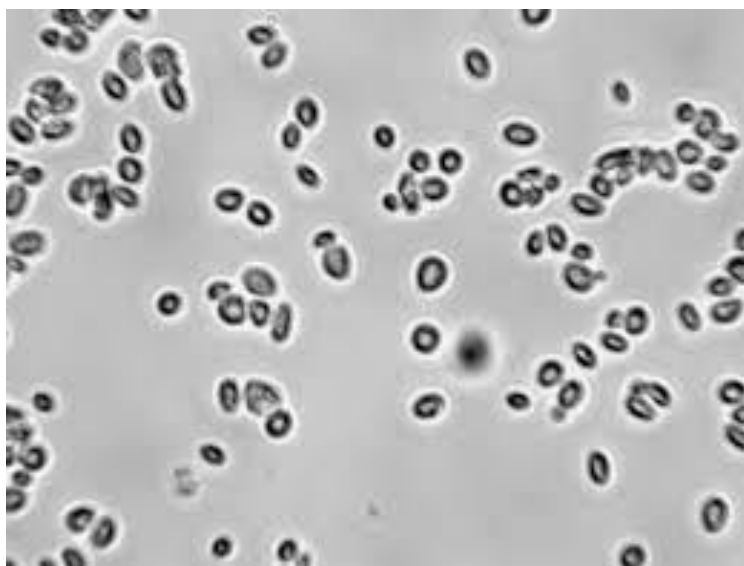
[http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/pichia\\_anomala.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/pichia_anomala.html) (cit. 2017-06-30)

Kvasinka *Pichia anomala* (obrázek 1) byla původně izolovaná z uskladněného obilí (Kurtzman a Robnett, 1998). Citlivost *Pichia anomala* na antimykotické látky, byla porovnávána s kvasinkou *Candida albicans*, jejíž citlivost na antimykotické látky byly dobře popsány. *Pichia anomala* je klasifikována jako organismus biologické bezpečnosti úrovně 1. To znamená, že je bez známých rizik u zdravých jedinců a bez omezení týkajících se manipulace. Je prokázáno, že tato kvasinka je potenciálně vhodná jako biokontrolní činidlo pro proměnlivá prostředí. *Pichia anomala* je schopná růst při nízké tenzi kyslíku, vysoké (20-35 °C) i nízké (10-15 °C) teplotě, v širokém rozmezí pH, dále dokáže využívat zdroje uhlíku a dusíku, které dále využívá pro soutěžení s plísněmi o prostor a živiny při uskladnění obilného zrna (Praphailong a Fleet, 1997). Aktivita smrtícího toxinu je závislá na pH (4,6) a teplotě (25-28°C) a jeho aktivita může být neutralizována monoklonální protilátkou proti *Pichia anomala* smrtícímu toxinu (mAbKT4) (Polonelli a Morace, 1987).

Inhibiční efekt *Pichia anomala* smrtícího toxinu je blokován preinkubací s protilátkou mabKT4 (Séguy *et al.*, 1994).

### 3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Bylo prokázáno, že *Saccharomyces* spp. je schopná fermentovat glukosu, galaktosu, sacharosu a maltosu, zatímco laktosa a D-manitol nebyly fermentovány ani jedním z druhů *Saccharomyces* spp. Kvasinka *Saccharomyces* spp je oválná a netvoří pravé mycelium se septy. Pozitivní interakce mezi *Saccharomyces cerevisiae* a plísní *Penicillium roqueforti* stimuluje růst a sporulaci plísně v sýrové kultuře. Tato interakce snižuje svoji sílu s rostoucí koncentrací NaCl (Vaughan-Martini a Martini, 1998).

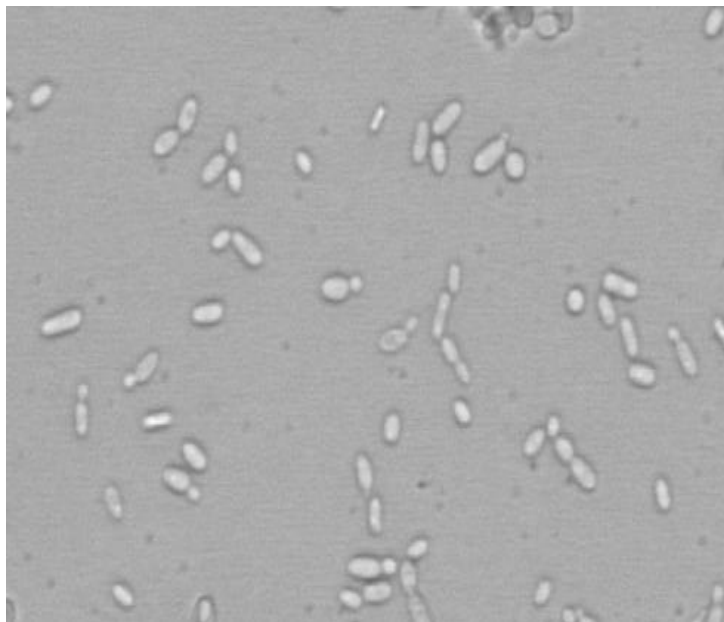


Obrázek 2 *Saccharomyces cerevisiae* Dostupné z: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces\\_cerevisiae.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces_cerevisiae.html) (cit. 2017-06-30)

*Saccharomyces cerevisiae* (obrázek 2) je kvasinka, která je dobře kultivovatelná a řadí se mezi fakultativně anaerobní. Je též hojně probádaná. Mezi její vlastnosti patří schopnost adsorbovat mykotoxiny, například aflatoxiny až o 95 %, fumonisiny o 67 %, zearalenon o 77 %, ochratoxin A o 12,5 % a nivalenon o 8,2 % (Yiannkouris a Jouany, 2002). Další schopností této kvasinky je tvorba biofilmu v laboratorních podmínkách. Přilnavost kvasinky k povrchu se zvyšuje se snižující se koncentrací glukosy. Pokud ovšem koncentrace glukosy zcela vymizí, přilnavost kvasinky se sníží. Pro tvorbu biofilmu jsou nepostradatelnou součástí povrchové bílkoviny, tzv. flokuliny, které jsou kódované genem *flo11*. Díky tomuto proteinu neroste u kvasinek jen tvorba biofilmu, ale i povrchová hydrofóbnost kvasinky (Reynolds a Fink, 2001). *Saccharomyces cerevisiae* přeměňuje zearalenon (Biotox, 2007) z 69% na toxin  $\beta$ -zearalenon, metabolit jenž má nižší aktivitu než výchozí látka (Karlovsy, 1999).

Glukomanany, které se extrahují z vnější strany buněčné membrány *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopny vázat určité mykotoxiny (Yiannkouris a Jouany, 2002).

### 3.4 *Candida utilis*



Obrázek 3 *Candida utilis* Dostupné z:

<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cand-util.htm> (cit. 2017-06-30)

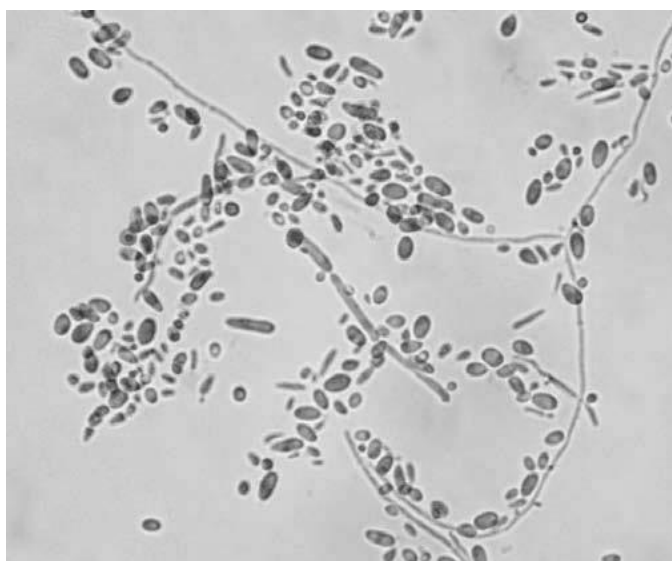
Kvasinka *Candida utilis* (obrázek 3) je schopná fermentovat sacharosu a využívat řadu zdrojů uhlíku včetně monosacharidů a disacharidů jako je maltosa a xylosa. Roste v prostředí glukosy, xylosy, glukonátu nebo ethanolu. Také roste na médiu s obsahem jednoduchých solí, vitamínů a vyžaduje draslík. Na půdách s omezeným obsahem draslíku, *Candida utilis* mění rychlost svého růstu, ačkoliv na půdách s omezenou koncentrací glukosy se rychlost růstu nemění. Pokud půdy obsahují zdroj hořčíku a fosforu, vznikají meziprodukty daných reakcí.

Souvislost mezi změnami koncentrace hořčíku a mezi změnami koncentrace draslíku byla jen slabá, avšak značná se změnou koncentrace glukosy. Tato souvislost naznačuje zapojení draslíku do procesu získávání energie pomocí oxidativní fosforylace a využití takto vzniklé energie do růstových procesů. Studie prokázali, že *Candida utilis* není schopná přímé syntézy NADPH z NADP, lze ji však zprostředkovat pomocí pěstování na ethanolu a v přítomnosti enzymu acetaldehyddehydrogenázy. Jako dodatečný zdroj energie kvasinka využívá mravenčnan, který je závislý na mravenčnandehydrogenáze, jež se vyskytuje

v buňkách pěstovaných na glukose. *Candida utilis* má vysokou koncentraci esenciálních aminokyselin v proteinech a je schopná metabolizovat široké spektrum sacharidů.

*Candida utilis* spolu se *Saccharomyces cerevisiae* patří mezi kvasinky s vysokým obsahem proteinů, hlavně díky jednotlivým buněčným proteinům (SCP) jejichž hodnota může tvořit až 50% sušiny kvasinky. Zbytek hmotnosti tvoří sacharidy a lipidy (Ziino *et al.*, 1999). Využití sacharidů jako zdroj uhlíku není pro kvasinku v rámci tvorby buněčných proteinů ekonomické. Proto se využívá pro masivnější pěstování *Candida utilis* melasa. Melasa se skládá z 50% roztoku sacharosu, která je zdrojem uhlíku a zároveň i 0,5-1 % zdrojem dusíku, bílkovin, vitaminů, aminokyselin a organických kyselin a těžkých kovů jako například železa, zinku, hořčíku nebo vápníku a mědi. Studie dokázaly, že pěstování kvasinek na melase je ekonomicky výhodnější, než pěstování kvasinek na běžných kvasinkových médiích pomocí chemikálií (Roukas, 1998).

### 3.5 *Trichosporon spp.*

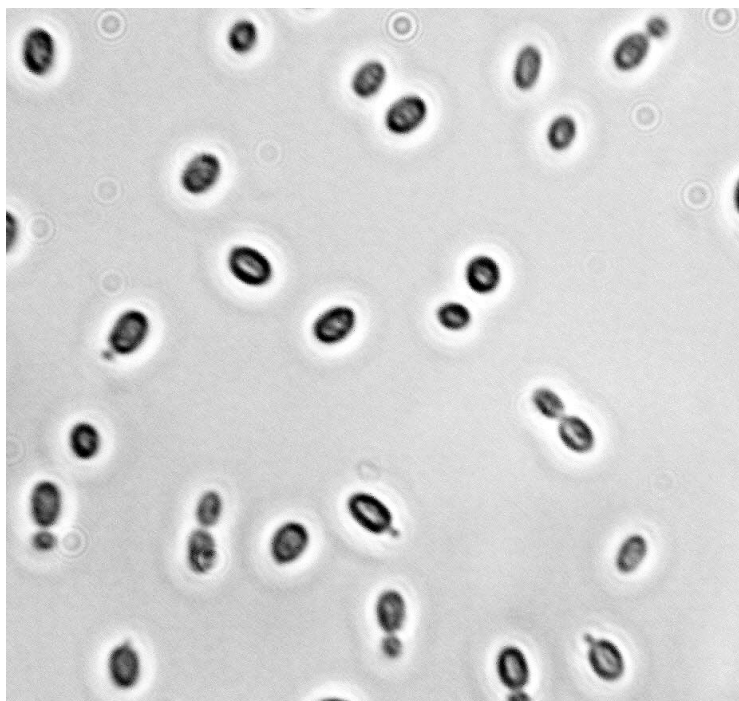


Obrázek 4 *Trichosporon spp.* Dostupné z: <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/30/trichosporon-spp/> (cit. 2017-06-30)

Tato kvasinka může být u lidí součástí mikroflóry gastrointestinálního traktu a dutiny ústní a přechodně osidlovat dýchací trakt a kůži. Vyskytuje se převážně v tropickém a mírném podnebí a to zejména v půdě, rozkládajícím se dřevu, vzduchu, vodě, řekách

a jezerech, sýru a trusu ptáků, holubů a dobytka (Cafarchia *et al.*, 2008). Charakteristickým znakem pro *Trichosporon spp.* (obrázek 4) je přítomnost multilaminární buněčné stěny a speciálních přepážek (septum) (Gueho *et al.*, 1992). *Trichosporon spp.* jsou schopné využívat sacharidy, zdroje uhlíku a rozkládat močovinu. Tato kvasinka byla také uznána jako oportunní a patogení a způsobuje invazivní infekce v nemocnicích třetího světa, přestože u nás se běžně izoluje v laboratořích a způsobuje jen povrchové infekce (Chagas-Neto *et al.*, 2009). Negativní vliv vysokých dávek ochratoxinu A u brojlerů lze neutralizovat přidáním stabilizující buněk *Trichosporon spp.*. V roce 2004 byl izolován nový druh *Trichosporon mycotoxinivoras* (Molnar *et al.*, 2004). Inkubace s těmito novými kvasinkami *Trichosporon mycotoxinivoras* prokázala, že mykotoxin zearalenon může být úspěšně degradován.

### 3.6 *Rhodotorula spp.*



Obrázek 5 *Rhodotorula spp.* Dostupné z:  
[http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/rhodotorula\\_mucilaginosa.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/rhodotorula_mucilaginosa.html) (cit. 2017-06-30)

Zástupci rodu *Rhodotorula* (obrázek 5) jsou známí pro svou schopnost degradovat fenolovou skupinu a jsou schopni kolonizovat v extrémních podmínkách (Sampaio,

2004). *Rhodotorula* spp. je vysoce všestranná ve využívání fenolu a podobných monoaromatických sloučenin jako jediného zdroje uhlíku při teplotě 10 °C a je schopná růst ve vysoké koncentraci těchto sloučenin (Bergauer *et al.*, 2005).

Kultivací *Rhodotorula rubra* se redukuje množství deoxynivalenolu ve slunečnicových semínkách během 10 dnů, a to o 47,7 %, zearalenonu a aflatoxinu až o 100%. *Rhodotula glutinis* redukuje množství deoxynivalenolu o 84,6 % a množství zearalenonu redukuje dokonce o 93,2 % v krmné kukuřici během 10 dnů. Oproti tomu tato kvasinka zvyšuje množství ochratoxinu v krmné kukuřici o 20,3 % za 10 dní (Bakutis *et al.*, 2005). Některé druhy rodu *Rhodotorula* jsou využívány k produkci karotenoidů, například  $\beta$ -karotenu a torularhodinu (Tinoi *et al.*, 2005).

## 4 Efekt kvasinek na růst plísni a produkci mykotoxinů

Plísně napadají uskladněná zrna a obiloviny. Zrna jsou proto preventivně sušená, což je nákladné. Sušená zrna jsou skladována za nízké tenze O<sub>2</sub> a vyššího obsahu CO<sub>2</sub> ve vzduchu (Funck-Jensen a Olsen, 1990). Vyšší hodnota CO<sub>2</sub>, která je zajištěná kultivací s mikroorganismem a zároveň s nižší hodnotou O<sub>2</sub>, má vliv nejen na růst a sporulaci plísni, ale i na produkci mykotoxinů. Například mykotoxin Ochratoxin A produkovaný plísní *Apergillus ochraceus* vykazuje naprostou inhibici při hodnotě CO<sub>2</sub> vyšší než 30% bez ohledu na hladinu kyslíku. Pokud je hladina CO<sub>2</sub> nižší než 30% dojde k inhibici pouze pokud je hladina O<sub>2</sub> nižší než 20%. Nejčastější plísní, která napadá zrna během skladování je plíseň *Aspergillus* a *Penicillium* (Lacey a Magan, 1991). Způsobem jak zabránit plísním napadnout zrna během výměny vzduchu mezi silem a okolní atmosférou je nasadit antagonistický mikroorganismus vůči plísním.

### 4.1 Účinky kvasinek *Pichia anomola* a *Pichia guilliermondii* na růst plísni

*Pichia anomala* inhibuje na agaru růst plísni *Penicillium roqueforti* a *Aspergillus candidus*. Využívání kvasinek jako kontrolního organismu růstu plísni je přípustný jako biologická kontrola plísni v pokrmeh a krmivech, ale nesmí vylučovat potenciálně nebezpečné látky. *Pichia anomala* je často nalézána v odvětrávacích systémech při skladování obilovin, například pšenice. Inhibice růstu plísně byla nejúčinnější při teplotě nižší než 15°C a kolem 20°C, což jsou teploty nižší než je teplota využívaná pro tvorbu spór a růst plísně *Penicilium expandum* a *Aspergillus candidum*. Kvasinka *Pichia guilliermondii* snižuje výskyt plísni po sklizni např. u plísně *Penicilium digitatum*, která napadá grapefruity, *Aspergillus flavus* na sojových bobech a *Penicillium expasum* na jablkách (Wisniewski *et al.*, 1990). *Pichia guilliermondii* byla vybrána jako součást aktivní látky fungicidu proti posklizňové nákaze plísni (Hofstein *et al.*, 1990). Účinky kvasinky *Pichia guilliermondii* byly úspěšně aplikovány na rostliny, účinky kvasinky byly schopny se vyrovnat běžným chemickým přípravkům, které se používají v prevenci posklizňové odolnosti ovoce proti plísním (Hofstein *et al.*, 1990). Plíseň *Penicillium digitatum* a *Penicillium italicum*, patří mezi odolné plísně a nejčastěji napadají citrusové plody.

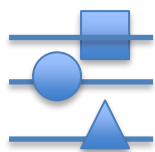
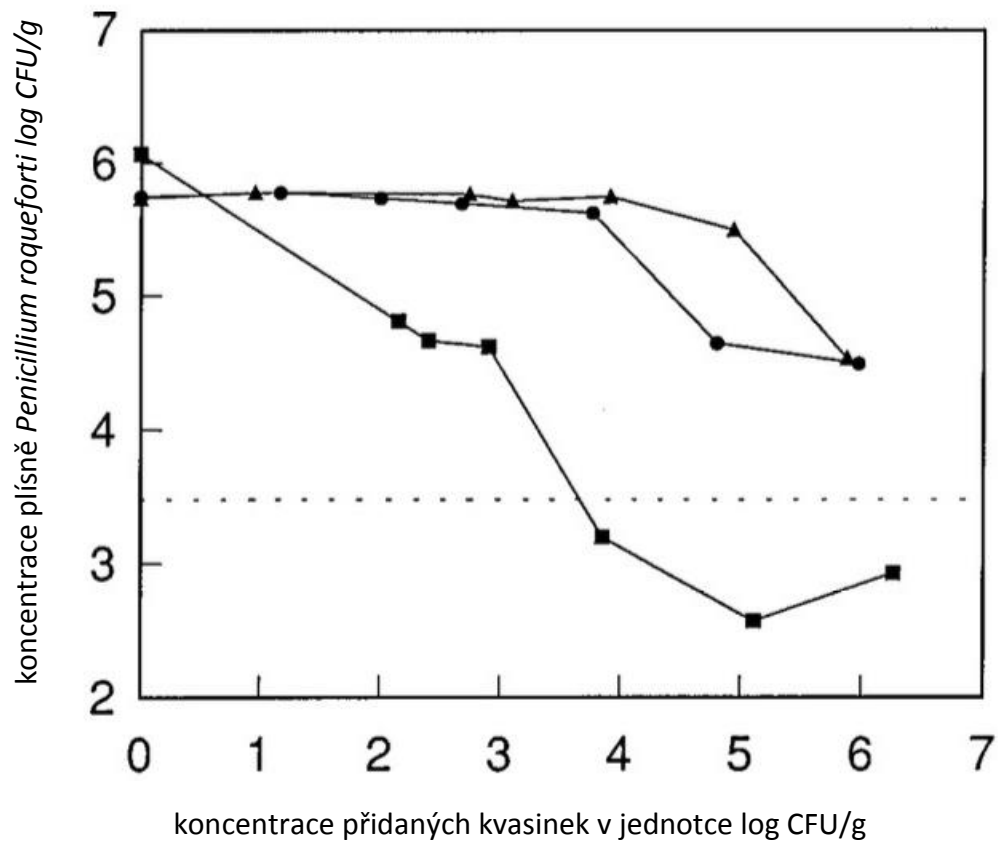
## 4.2 Účinek kvasinek na růst plísně rodu *Penicillium*

*Saccharomyces cerevisiae* je běžně používaná kvasinka pro pečení a vaření a je považována za bezpečný organismus. *Pichia anomala* vykazuje silnou schopnost redukovat růst a tvorbu plísní. *Pichia guilliermondii* je součástí aktivní látky fungicidů.

Pokud rozdělíme plísně podle citlivosti na daný kmen kvasinek, tak v tomto experimentu je nejcitlivější plíseň *Aspergillus fumigatus*, která byla senzitivní již při koncentraci buněk *Pichia anomala*  $10^4$  kolonie tvořících jednotek (CFU). Ve druhé skupině jsou plísně *Penicillium roqueforti* a *Penicillium sporotrichoides*, které vykazovaly vyšší odolnost. *Penicillium digitatum* a *Penicillium italicum* patří do třetí skupiny, tedy mezi nejodolnější plísně v tomto experimentu. Tyto plísně vyrostly i při koncentraci kvasinky  $10^8$  buněk, avšak růst byl viditelný pouze v oblasti inokula s průměrem kolonií menším než 4 mm. Kultivace buněk kvasinky a plísní probíhala 14 dní a data byla vyhodnocována po 7 a 14 dnech. Výsledkem byly ty to data:



Graf 1: Efekt kvasinkek na růst plísni během 1. týdne (Upraveno podle Peterso a Schnurer, 1995)



kvasinka *Pichia anomala*

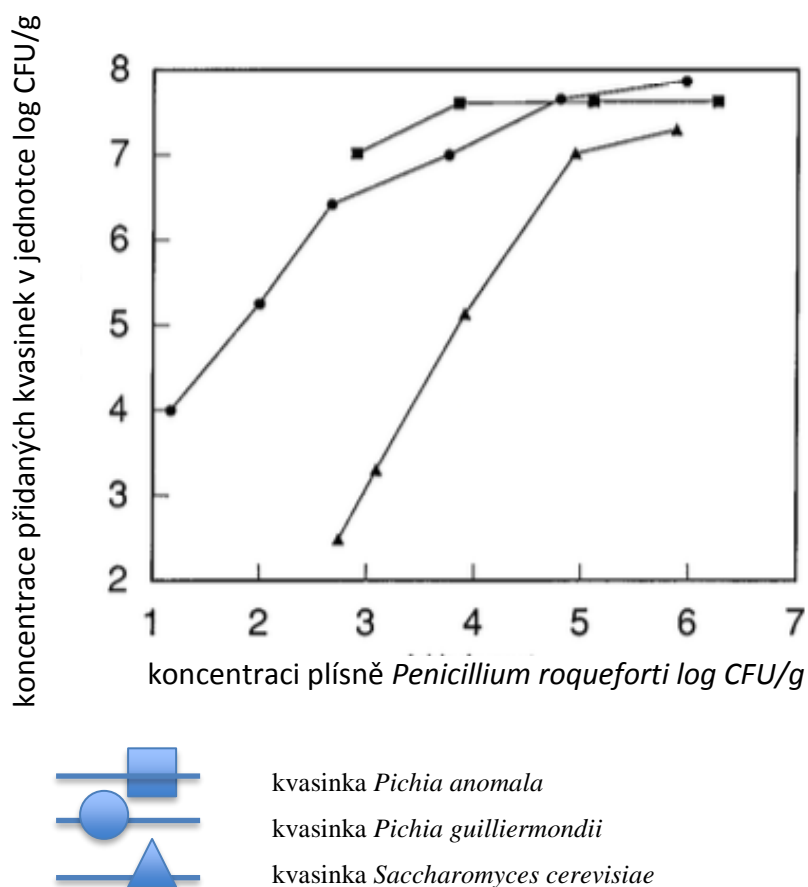
kvasinka *Pichia guilliermondii*

kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

Tento graf vyjadřuje úspěšnost snížení sporulace a růstu plísni za sedm dní.

Jak je zřejmé z grafu ze strmé křivky, nejrychleji zastavuje růst a sporulaci plísně *Penicillium roquefortii* kvasinka *Pichia anomala*. Kvasinky *Pichia guilliermondii* a *Saccharomyces cerevisiae* mají také vliv na růst a sporulaci plísně.

Graf 2: Efekt kvasinek na růst plísni během 2. týdne (upraveno podle Peterso a Schnurer, 1995)



Tento graf popisuje efekt kvasinek na zastavení růstu a sporulace ve druhém týdnu experimentu, tedy den 7. až 14. Podobný průběh jako v předchozím grafu mají kvasinky *Pichia guilliermondii* a *Saccharomyces cerevisiae*. Nejsilnější efekt na růst a sporulaci plísně *Penicillium roqueforti* měla kvasinka *Pichia anomala*. *Saccharomyces cerevisiae* snižuje růst a sporulaci plísně silněji ve druhém týdnu, než v prvním.

Dalo by se předpokládat, že čím rychleji plíseň roste, tím je nižší citlivost vůči kvasinkám. Nicméně souvislost mezi rychlostí růstu a citlivostí na kvasinky nebyla prokázána (Peterso a Schnurer, 1995).

### 4.3 Účinek kvasinky *Pichia anomala* na *Penicillium verrucosum*

*Pichia anomala* redukuje růst plísně *Penicillium verrucosum*. Pokud plíseň vyrůstá společně s jiným mikroorganismem, může ji to buď stimulovat k růstu nebo inhibovat produkci mykotoxinů. Kvasinka *Pichia anomala* má velký význam při redukci posklizňových plísni, které se vyskytují při uskladnění krmného zrní ve vzduchotěsném a velmi vlhkém skladu.

Ochratoxin je stabilní na agaru obsahující sladový extrakt. Na sladovém agaru nebyla pozorována degradace ani absorpce ochratoxinu kvasinkou a jeho znovuzískání bylo mezi 75 a 104 % (Peterson *et. al.*, 1997). Pokud porovnáme redukci *Penicillium verrucosum* kvasinkami *Pichia anomala* a *Saccharomyces cerevisiae*, tak vyšší redukční efekt má na plíseň kvasinka *Pichia anomala*. *Pichia anomala* byla schopna během prvního týdne kultivace redukovat růst *Penicillium verrucosum*, měřeno pouze pohledem, úplně. Ve druhém týdnu kultivace byl již zaznamenán drobný nárůst plísně a ve třetím týdnu rostla plíseň zcela viditelně na obilí. Po třetím týdnu nebyla zaznamenána inhibice růstu a sporulace plísně ani inhibice plísni produkovaného ochratoxinu A, a to ani při vyšší koncentraci kvasinky *Pichia anomala*. Avšak *Pichia anomala* v koncentraci  $1 \times 10^6$  CFU/g zredukovala *Penicillium verrucosum* z  $2,5 \times 10^8$  CFU/g na  $2 \times 10^6$  CFU/g. *In vitro* *Pichia anomala* a *Saccharomyces cerevisiae* redukovaly růst *Penicillium verrucosum* se stejným efektem (Peterson *et. al.*, 1997).

## 5 *Pythium oligandrum*

Taxonomie *Pythium oligandrum*

Tabulka 1: Taxonomie *Pythium oligandrum* (Polyversum, 2016)

Taxon	Latinský název
říše	Chromalveolata
kmen	Heterokontophyta
třída	Oomycetes
řád	Pythiales
čeleď	Pythiaceae
druh	<i>Pythium oligandrum</i>
kmen	M1

### 5.1 Charakterizace *Pythium oligandrum*

*Pythium oligandrum* je houba běžně se vyskytující na polích a řadí se do třídy oomycet. Zatím nebyl prokázán přímý zhoubný účinek na zemědělsky významné rostliny. *Pythium oligandrum* si získala pozornost zejména v Evropě a ve Spojených státech, díky schopnosti parazitovat na patogenních plísňích a to zejména na druzích, které napadají klíčící semena a semenáčky, tudíž je vhodná jako biokontrolní prostředek. Mykoparazitární schopnosti se využívají v biologické ochraně rostlin, v průmyslu a v medicíně k léčbě mykóz.

Rozvojem biologických kontrolních opatření s nativním *Pythium oligandrum* se podařilo izolovat *Pythium oligandrum* v Hokkaido v Japonsku. Díky tomu se podařilo vyjasnit jeho biokontrolní mechanismus, analýzou vazby mezi rostlinnými patogeny hostitelských buněk, jako například rajčata, brambory či cukrová řepa a *Pythium oligandrum* (Rosypal, 1994).

V roce 1930 bylo poprvé popsáno *Pythium oligandrum* americkým vědcem Charlesem Drechslerem (Al-Rawahi a Hancock, 1997). *Pythium oligandrum* bylo původně izolované z bezbarvých kořenů hrášku. Nicméně vztah mezi *Pythium oligandrum* a kořeny rostliny není zcela objasněn (Le Floch, 2003).

V roce 1965 český vědec doc. Ing. Dáša Veselý, DrSc., *Pythium oligandrum* izoloval a zjistil, že využívá buňky jiných hub ke svému metabolismu. Doc. Ing. Dášu Veselého, DrSc., vedlo toto zjištění k možnosti využívání *Pythium oligandrum* v zemědělství k biologické ochraně rostlin. Po letech výzkumu došlo k urychlení množení a zavedení do průmyslového získávání zárodků. V roce 1992 bylo *Pythium oligandrum* použito pro člověka, a to pro léčbu kožní mykózy. Toxikologické studie v roce 1994 potvrdily, že *Pythium oligandrum* není patogenní pro člověka, tj. je zdravotně nezávadné. První biopreparát určený pro kosmetické účely k léčbě mykózy nohou byl vyroben roku 1996. Tento preparát sloužil ke snížení pocení nohou a k odstraňování pachu nohou (Whips a Lumsden, 1989). V roce 2006 vznikla firma Bio Agens Research and Development – BARD, s.r.o. Tato firma se zabývá výzkumem a výrobou přípravků s fungicidním účinkem na lidi, ale i ve veterinářství. Další firmou zabývající se těmito preparáty je firma Biopreparáty spol. s.r.o., která se zbývá využitím *Pythium oligandrum* v zemědělství na ochranu rostlin (Bard, 2016).

## 5.2 Biochemické vlastnosti

Na základě některých odlišných vlastností oomycet, se zařazení do říše hub (Fungi) ukázalo jako nesprávné a vznikla nová říše Straminipila, do které byly oomycety zařazeny. Nyní se oomycety také často nazývají „houbám podobné“ organismy.

*Pythium oligandrum* obsahuje ve své buněčné stěně malé množství chitinu. Buněčnou stěnu tvoří převážně celulóza,  $\beta$ -1,4-glukan a další glukany.

Dále se v ní také nalézají proteiny, které jsou bohaté na hydroxyprolin. Zásobní látkou je polysacharid. Funkce organel v cytoplazmě je stejná jako u jiných eukaryotních organismů, pouze v některých případech se liší. Plazmatická membrána je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů s transmembránovými proteiny z nichž se některé zapojují přímo či nepřímo do příjmu živin. Na membránu se mohou také navázat enzymy. Chitin syntetasa a glukanosyntetasa jsou 2 hlavní integrální membránové proteiny zakotvené na vnější straně membrány díky produkci polysacharidových řetězců. Další látkou obsaženou v plazmatické membráně je rostlinám podobný sterol. Sterol obsažený v rostlinách se nazývá  $\beta$ -sitosterol. *Pythium* není schopné syntetizovat sterol z prekurzorů, a proto ho přijímá od hostitele. Prostup živin přes membránu je

zajištěn endocytózou. Transport organel v hyfě je možný díky enzymům kinesinu a dyneinu. Tyto dva enzymy interagují s mikrotubuly, jež vznikly kombinací  $\alpha$ -tubulinu a proteinu  $\beta$ -tubulin jež tvoří dimer. Dimery dále pak polymerují a vznikají tubulinové řetězce, které dále interagují s enzymy. Oproti tomu cytoplasmatická kontrakce, která vzniká díky aktinu a proteinu myosinu, se nepodílí na transportu hlavních organel (Polyverdum, 2016).

### 5.3 Působení *Pythium oligandrum*

*Pythium oligandrum* obvykle není patogenní pro semena a kořeny rostlin, pouze některé jeho izoláty mohou mít patogenní účinek.

*Pythium oligandrum* je schopno působit několika odlišnými způsoby mezi než patří například mykoparazitismus, produkce oligandrinu nebo efekt růstové stimulace.

Mykoparazitismus je soužití, kdy jsou enzymaticky napadávány fytopatogenní houby.

*Pythium oligandrum* získává živiny enzymatickým rozkladem mycelia a některých rozmnožovacích orgánů napadených hub.

*Pythium oligandrum* produkuje protein zvaný oligandrin, který se vyznačuje translaminárními a systematickými vlastnostmi. V rostlinách vyvolává rezistenci vůči foliárním houbovým chorobám. Rezistence se projevuje dvěma způsoby - aktivně a to zejména inhibicí klíčení spor napadeného mikroorganismu a potlačováním růstu mycelia. Druhý způsob projevu rezistence je pasivní, kdy dochází ke ztluštění buněčné stěny rostliny, která je ošetřovaná. Efekt růstové stimulace napomůže rostlině přežít v nepříznivých podmínkách prostředí (Deanco, 2006). *Pythium oligandrum* je schopné indukovat v rostlinách produkci látek stimulujících růst a nepřímo tak navyšují příjem fosforu a mikroprvků rostlinou (Procházková-Rulfová, 2009). *Pythium oligandrum* může vyvolat v rostlinách obrannou reakci a to zejména produkcí čtyř elicitinu podobných proteinů označených POD-1, POD-2, POS-1 a oligandrin. Tyto proteiny jsou produkovány oomycetami. POD-1, POD-2, POS-1 jsou proteiny buněčné stěny (CWPs = cell wall proteins). Isoláty *Pythium oligandrum* byly již dříve rozděleny do dvou skupin. První skupinu tvoří D-typ isolátů obsahujících POD-1 a POD-2. Druhou skupinu tvoří S-typ isolátů, které tvoří POS-1.

Geny pro produkci proteinů POD-1, POD-2, POS-1 a oligandrin jsou obsaženy v genomu *Pythium oligandrum*, ale už se nenacházejí v ostatních devíti druzích

*Pythium*, které byly testovány (*Pythium iwayamai*, *Pythium volutum*, *Pythium vanterpoolii*, *Pythium spinosum*, *Pythium torulosum*, *Pythium irregulare*, *Pythium ultim*, *Pythium aphanidermatum* a *Pythium butleri*). Pomocí genetického vyšetření lze dokázat, že D-typ isolátů může být odvozen od S-typu isolátů pomocí genové duplikace či delece (Polyversum, 2016).

*Pythium oligandrum* také zvyšuje růst rostlin přímou interakcí s jejich kořeny, vazba je zprostředkovaná pomocí auxinových sloučenin, tryptaminu, produkovanými houbou. *In vitro* pokusy dokázaly schopnost *Pythium oligandrum* metabolizovat indolové deriváty, např. tryptofan a inod-3-acetaldehyd prostřednictvím tryptaminové dráhy a za vzniku tryptaminu (Masunaka *et al.*, 2010).

#### **5.4 Působení *Pythium oligandrum* na zdraví člověka**

*Pythium oligandrum* se již od 90. let minulého století využívá k léčbě kožních mykóz. K léčbě se využívá jeho schopnost mykoparazitismu, kdy *Pythium oligandrum* proniká svými vlákny do buněk parazita a využívá jeho výživu. Poté co dojde k vyčerpání živin parazitické buňky, *Pythium oligandrum* vymizí z dané lokality (Načeradská, 2010). *Pythium oligandrum* má též velmi dobrou účinnost při léčbě mykóz vaginálních a ústních, dále pak při léčbě lupénky, aftů, atopického exému nebo bércoových vředů na nohou u lidí trpících diabetem (Mencl a Klimeš, 2005). *Pythium oligandrum* parazituje na jiných mikroskopických houbách způsobující mykózy jako jsou např. *Trichophyton rubrum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* (Mencl, 2001).

Dermatofytosa tinea pedis, tinea interdigitalis a onychomykosa jsou dermatomykózy na něž se nejvíce využívá k léčbě *Pythium oligandrum*, ale lze ho využít i k omezení pachových symptomů nohou a hyperhydroze (Mencl, 2002). *Pythium oligandrum* je používán v preparátu Biodeur, jenž je k dostání i v bioformě, jedná se o prášek a suspenzi ke koupelím (Hendrychová a Malý, 2011).

## 5.5 Testování biopreparátu s obsahem *Pythium oligandrum*

Díky tomu, že se biopreparát Boideur objevuje na českém trhu řadu let, byly získány anketní podklady pro sledování účinků preparátu u lékařsky mykoz. Jejich počet roste celosvětově i mezinárodně a to i díky tomu, že přibývají pacienti s vyšším rizikem vzniku onemocnění, například diabetici či imunosuprimovaní pacienti.

Počet sledovaných, kteří používali Boideur přesně dle doporučeného návodu byl 69. Věk studovaných pacientů byl v rozpětí mezi 17 lety až 77 lety. Stanovené diagnózy byly hyperhydróza, pachové symptomy, tinea pedis, tinea interdigitalis, onychomykóza, ale často se jednalo o jejich kombinace.

Všech 69 studovaných pacientů bylo laboratorně vyšetřeno na přítomnost hub mikroskopicky. U více než 50 % osob se tak podařilo diagnostikovat mykózu, pouze mikroskopicky. Pokud byl nález potvrzen i kultivací, jednalo se převážně o dermatofyty. Nález *Trichophyton rubrum* byl stanoven ve 40% kultivačních nálezech.

Z výsledků anketních údajů a hodnocení lékařů bylo zjištěno, že u 78,6 % případů byly pachové symptomy odstraněny a v 19 % případů byly symptomy podstatně zlepšeny. U hyperhydrózy došlo k úplnému odstranění u 67,4 % osob a ke zlepšení u 27,9 %. V případech odstranění mikroskopických hub bylo hodnocení založené na klinických údajích ošetřujících lékařů. Dle tohoto hodnocení vyplývá, že u tinea pedis a tinea interdigitalis lze odstranit u 82,8 % osob a zlepšit stav všech studovaných pacientů. U pacientů s onychomykózou bylo za zlepšení stavu považováno pokud došlo ke zmenšení hyperkeratotických hmot pod nehtovou ploténkou, částečném odrůstání nového nehtu, změně barvy postižené ploténky a úlevě od bolestivých projevů. Těchto případů zlepšení bylo 72,9 % (Mencl, 2002)

## 5.6 Léčba *Pythium oligandrum* u hnisajících ran

V Pardubické nemocnici proběhl v letech 2011-2013 výzkum, který se zaměřil na rány, které hnisaly, byly kontaminované bakteriemi nebo se nehojily. Hodnotil se i vliv hub na biofilm.



Do studie se zapojilo 11 mužů a 34 žen jež měli hnisající rány na nártích, lýtkách nebo bérkách. Všem 45 testovaným byly aplikovány zárodky *Pythium oligandrum* ve sterilním fyziologickém roztoku a následně překryty obvazem, jenž se po 8 hodinách měnil. Takto léčba pokračovala 4 dny (Mencl *et al.*, 2014)

Výsledkem tohoto výzkumu bylo zlepšení zdravotního stavu se snížením výskytu mikrobů u 64,4 % pacientů, což je 29 pacientů z celkového počtu. U 31,1 % pacientů (14 pacientů) došlo k mírnému zlepšení a změně poměru mikroorganismů. Proto nadále pokračovala konvekční léčba. K žádnému zlepšení zdravotního stavu nedošlo u 4,5 % pacientů, což jsou 2 pacienti ze celkového počtu 45 (Mencl *et al.*, 2014).

Dále výzkum prokázal 70% snížení tvorby biofilmu, u 17 % pacientů nebylo snížení zaznamenáno a u 13 % pacientů bylo měření různorodé. Ovlivněná tvorba biofilmu byla prokázána u kmenů *Stenotrophomonas maltophilia* a *Pseudomonas aeruginosa* (Mencl *et al.*, 2014).

## **5.7 *Pythium oligandrum* ve veterinářské praxi**

Ve veterinářské praxi se používá přípravek s názvem Ecosin.

Léčeno bylo například malé kotě s dermatofytózou jemuž byla zjištěna a kultivací potvrzena plíseň *Microsporum canis*. Dalším příznakem u kotěte bylo nadměrné drbání, bílé šupinky na kůži, zarudlá kůže a ztráta srsti. Léčba přípravkem probíhala v podobě 15 minutové koupele v roztoku Ecosin po 7 dnech, celkem třikrát. Třikrát se také Ecosin nanesl přímo na postižené místo. Po prvním týdnu bylo znatelné zlepšení, po dvou týdnech dorůstala srst a po třech týdnech byly odebrány vzorky pro kultivaci, jenž neprokázala přítomnost *Microsporum canis* (Načeradská *et al.*, 2011). Přípravky s *Pythium oligandrum* lze použít i u psů, koní, morčat, drobných hlodavců a králíků a jsou nezávadné i pro mláďata, březí samice a staré či citlivé jedince. Přípravky nezpůsobují žádné vedlejší ani nežádoucí účinky (Bard, 2016).

## 6 Závěr

Tématem této bakalářské práce bylo objasnit efekt, který mají kvasinky na růst plísní a produkci mykotoxinů. Mezi nejčastější producenty mykotoxinů patří plísně *Penicillium*, *Fusarium* a *Aspergillus*.

Mykotoxiny se nejvíce vyskytují na obilninách, kukuřici a sezamových semenech. Koncentraci mykotoxinů v potravinách je třeba sledovat, kvůli jejich účinkům na zdraví člověka i zvířat. Mykotoxiny mohou působit na buňky jater, ledvin, plic, nervů a imunitního systému. Koncentraci mykotoxinů v potravinách a krmivech upravuje nařízení komise Evropské unie 2015/1005, které vstoupilo v platnost 25.6. 2015.

Obsah mykotoxinů v potravě je snižován několika způsoby. Jedním z nich je vstřebáváním v gastrointestinálním traktu, použitím adsorbčních činidel nebo pěstováním s kvasinkami, jako např. *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Candida utilis*. Tato práce popisuje i studie, které vykazují efekt kvasinek na růst plísní při společné kultivaci.

V závěru práce je popsána takzvaná chytrá houba. Jedná se o *Pythium oligandrum*. Tato houba se používá jako biokontrolní činidlo. *Pythium oligandrum* je hojně využíváno v lékařské i veterinární praxi jako léčebný prostředek.

## 7 Použité zdroje:

1. Aroyeun, S.O., Adegoke, G.O. Reduction of ochratoxin A (OTA) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6, 612-616
2. Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., Meredith, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109, 325-332
3. Bakutis, B., Baliukonienė, V., Paškevičius, A. Use of biological methods for detoxification of mycotoxins [Biologinio metodo taikymas mikotoksnu detoksikacijai] *Botanica Lithuanica*, 2005, 7, 123-129
4. BARD. [online]. [cit. 2016-05-30]. Dostupné z: <http://www.pythium.eu/index.php?language=cs>
5. Benitez, T., Ana, M., Rincon, M., Carmen, L.A., Codon, C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 2004, 7, 249-260
6. Bennett, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. *Mycopathologia*, 1987, 100, 3-5
7. Bergauer, P., Fonteyne, P. A., Nolard, N., Schinner, F. & Margesin, R. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere*, 2005, 59, 909–918
8. Bio Agens Research and Development- BARD, s.r.o. [online]. BARD ©2015. Poslední změna 14.06.2016 13:27 [cit. 14.6.2016]. Dostupné z: <http://www.pythium.eu/index.php?language=cs>
9. Biotox. Biotox [online]. 2007 [cit. 2017-02-25]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/zearalenon.php>
10. Björnberg, A. a Schnürer, J. Inhibition of the growth of grain- storage molds in vitro by the yeast *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman *Canadian Journal of Microbiology*. 1993, 39, 623–628.
11. Bonini A., Capatti C., Parmeggiani M., Gugliotta L., Micozzi A., Gentile G., Capria S., Girmenia C. Galactomannan detection in *Geotrichum capitatum*

- invasive infections: Report of 2 new cases and review of diagnostic options. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2008, 62: 450-52.
12. Cafarchia, C., D. Romito, C. Coccioli, A. Camarda, and D. Otranto. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Medical Mycology*, 2008, 46, 429–434.
  13. Doležal, Petr. Konzervace krmiv a jejich využití ve výživě zvířat. Olomouc: Baštan, 2012. ISBN 987-80-97091-33-3.
  14. Dorner, J.W., Cole, R.J. Effect of application of nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research*, 2002, 38, 329-339
  15. Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: It is time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 2009, 52, 137-145
  16. Ekologie mikroorganismu *Pythium oligandrum*. Polyverdum [online]. [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.biopreparaty.eu/ucinna-latka/ucinna-latka>
  17. Funck- Jensen, D., and M. W. Olsen, M.W. Discussion summary: biological control in closed structures and biospheres. In R. R. Baker and P. E. Dunn (ed.), *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1990, 479–483
  18. Gôrner, F., Valík, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin. 1*. Bratislava : Malé centrum, 2004, 528. ISBN 80-967064-9-7.
  19. Gueho, E., G. S. de Hoog, and M. T. Smith. Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1992, 61, 285–288.
  20. Hajšlová, J. Mykotoxiny a jejich konjugáty v potravinářských surovinách a krmivech: trendy, rizika dietární expozice, možnosti prognózy osudu při zpracování. [Online] 2008. [Citace: 26. 3. 2017.] <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2008/Projekt1.pdf>.
  21. Havránková, H. a Ovesná, J. Geny biosyntézy trichothecenů u rodu *Fusarium*. *Chemické listy*. 2012, 106, 818-825.
  22. Hofstein, R., S. Droby, E. Chalutz, C. Wilson, and B. Frilender. Scaling-up the production for application of an antagonist—from basic research to R & D. In *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables*,

- workshop proceedings. Agricultural Research Service document ARS-92. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C, 1990, 197-210
23. International Agency for Research on Cancer (IARC). Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Napthalene, and Styrene. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *IARC*, 2002, 82-171
  24. Janisiewicz, W., Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review Phytopathology*, 2002, 40, 411-441
  25. Kabak, B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47, 2, 348-352.
  26. Kalina, T., Váňa, J. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. ISBN 9788024610368
  27. Karlovsky, P. Biological detoxification of fungal toxins and its use plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 1999, 7, 1-23
  28. Kensler, T.W., Egner, P.A., Wang, J.B., Zhu, Y.R., Zhang, B.C., Lu, P.X., Chen, J.G., Qian, G.S., Kuang, S.Y., Jackson, P.E., Gange, S.J., Jacobson, L.P., Munoz, A., Groopman, J.D. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas. *Gastroenterology*, 2004, 127, 310-318.
  29. Kurtzman C., Robnett C. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73, 331-371.
  30. Lacey, J., a N. Magan. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relations, *In* J. Chelkowski (ed.), Cereal grain—mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. *Elsevier Science Publishers B.V.*, Amsterdam, 1991, 77-118
  31. Le Floch, G., Rey, P., Benizri, E., Benhamoun, N., Tirilly, Y. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*. 2003, 257(2), 459-470.
  32. Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meeke, E., Hass, L., Plas, L.C., Kohl, J. Potential of fungal antagonists for bio-control of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Science and Technology*, 2005, 15, 229-242

33. Malíř, F. a Ostrý, V. Vlákňité mikromycety (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka. 1.vydání. Brno : Mikada, 2003. ISBN: 80-7013-395-3.
34. Manoj, K.B., Devegowda, G. Efficacy of esterified glucomannan to ameliorate the toxic effects of T-2 toxin in layer hens- an in vitro study. *Proceedings CC Worlds Poultry Congress*, New Delhi, India, 2000, 4, 296
35. Masoud, W., Kaltoft, C.H. The effect of yeasts involved in the fermentation of coffee arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 106, 229-234
36. Masunaka, A., Sekiguchi, H., Takahashi, H. and Takenaka, S. Distribution and Expression of Elicitin-like Protein Genes of the Biocontrol Agent *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158, 417–426.
37. Mateo, R.; Medina, A.; Mateo, E.M.; Mateo, F.; Jiménez, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 119, 1-2, 79-83.
38. Mechanismy účinku *pythium oligandrum*. Polyversum®. [online]. [cit. 2016b 05-15]. Dostupné z: <<http://www.biopreparaty.eu/casto-kladene-dotazy/mechanismy-ucinku-pythium-oligandrum>>.
39. Mencl, K. Je možné ovlivnit dermatomykózy ekologicky? *Československá dermatologie*, 2002, 77(2), 71-75
40. Mencl, K. Přírodou proti dermatomykózám. *Derma*, 2001, 1, 8 – 12
41. Mencl, K., Bureš, I., Poláková, H., Stuchlík, D. Ovlivnění hnisajících a nehojících se ran pomocí mikromycety *Pythium oligandrum*. Hojení ran, XII. Celostátní kongres s mezinárodní účastí. Mezioborová spolupráce při léčbě ran a kožních defektů, leden 2014.
42. Mencl, K., Klimeš, R. Unikátny objav napomôže odstráneniu plesní, atopického ekzému a lupénky I. diskusné fórum klinickej mikrobiológie usporiadané ako VI. odborná konferencia SKM SLK a XL. dni klinickej mikrobiológie SSKM SLS, 2005
43. Mencl, K.: Přírodou proti dermatomykózám. *Derma*, 2001, 1, 8–12.
44. Molnar, O., G. Schatzmayr, E. Fuchs, and H. Prillinger. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxifi-

- cation of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27,661–671.
45. Moss, MO. Mycotoxin review-2. *Fusarium. Mycologist*. 2002, 16, 158-161.
46. Nařízení komise Evropské unie (ES) č. 2015/1005 o stanovení maximálních limitů některých kontaminujících látek v potravinách. Brusel: Úřední věstník Evropské unie, 2015
47. Peterson, Stina, Hansen M.W., Axberg K., Hult K. a Schurer, J. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*. United Kingdom, 1997, 102(8), 1003-1008.
48. Polonelli, L. and Morace, G. Production and characterization of yeast killer toxin monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25, 460-462
49. Praphailong W., Fleet G. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 1997, 14, 459–468
50. Procházková-Rulfová. Polyversum - biologický fungicid na ochranu rostlin [online]. [cit. 2014-05-16]. Sborník z konference Prosperující olejniny, 2009, s. 110-11
51. Puntarić, D., Bošnjir, J., Šmit Z., Škes I., a Baklić Z., Ochratoxin A in Corn and Wheat: Geographical Association with Endemic Nephropathy. *Public Health*. 2001, 42(2), 175-180.
52. Reynolds T.B., Fink G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 2001, 291, 878-881.
53. Rosypal S., Doškař J., Petrzik K., Růžičková V. Úvod do molekulární biologie, 4.díl. Brno, 2002, 1141-1152.
54. Roukas, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, 1998, 33 (8), 803 – 810.
55. Sampaio, J.P. 2004. Diversity, phylogeny and classification of basidiomycetous yeasts. In *Frontiers in Basidiomycete Mycology*, pp. 49–80..
56. Scientific Committee on Food (SCF). *Opinion of the Scientific Committee on food on Fusarium Toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA)*, 2000

57. Scientific Committee on Food. *Opinion on Fusarium Toxins. Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin*, 2000
58. Séguéy, N., Aliouat, E.M., Dei-Cas, E., Polonelli, L., Camus D., Cailliez, J.C. Susceptibility of *Pneumocystis carinii* to *Pichia anomala* killer toxin. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 1994,41, 109S
59. Schatzmayer, D., Nitsch, S., Binder, E.M., Täubel, M., Loibner, A., Schatzmayer, G. Detoxification of mycotoxins. *World Nutrition Forum, Erber*, 2004, 128-129
60. Sudakin, D. Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicol.* 2008, 143, 97-107.
61. Suchý, P., Herzig, I.: *Plísně a mykotoxiny - Prevence jejich vzniku a dekontaminace v krmivech*. Brno: Vědecký výbor výživy zvířat – studie, 2005, 1-22
62. Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Nakladatelství Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6
63. Tinoi, J., Rakariyatham N. a Deming, R.L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 2005, 2005(40), 2551–2557
64. Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A., Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389, 47-157
65. Velíšek, J. and Hajšlová, J. *Chemie potravin II*. Havlíčkův Brod : nakladatelství OSSIS, 2009. ISBN: 978-80-86659-16-9.
66. Velíšek, J., *Chemie potravin 3*, Tábor, OSSIS 2002, ISBN 80-86659-02-X, 368
67. Walker, G.M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antoni van Leeuwenhoek*, 2011, 99, 25-34
68. Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52, 485-511
69. Whips, J., Lumsden, R., Mechanism of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. In *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth: Symposium of the British Mycological Society held at the University of Sussex* [online]. [cit. 2014-04-03]. British *Mycological Society by Cambridge University Press*,



1989, 9., 191 – 218. Dostupné z: <[http://books.google.cz/books?id=rBB6DE-ouXIC&hl=cs&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.cz/books?id=rBB6DE-ouXIC&hl=cs&source=gbs_navlinks_s). ISBN: 978-0-521-38236-6>.

70. Wisniewski, M., C. Biles, and S. Droby. The use of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent: characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. In Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables, workshop proceedings. Agricultural Research Service document ARS-92. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., 1990, 167-183
71. Yazadr, S., a Omurtag G.Z.,. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Science*. 2008, 9(11), 2062-2090.
72. Zeman, P., *Vliv přídavných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu*. Fakulta technologická : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007, 80
73. Ziino, M., Lo Curto, R.B., Salvo, F., Signorino, D., Chiofalo, B., Giuffrida, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. *Bioresource Technology*, 1999, 67, 7–11.