

Posudek disertační práce Ing. Dany Hrubošové

## Plísně rodu *FUSARIUM* a produkce jejich toxinů

Disertační práce Ing. D. Hrubošové je zacílena jednak na výskyt plísní rodu *Fusarium* a dále na biosyntézu některých mykotoxinů. Práce byla směřována na identifikaci kmenů fusarií pomocí polymerázové řetězové reakce a na analytiku T-2 a DON toxinů. Jelikož mykotoxiny jsou hlavní hrozbou plísňových kontaminací potravin a krmiv, je předložená disertační práce velmi potřebná, neboť zdařile dokládá objektivní rizika výskytu fusarií a současné možnosti jejich kontroly a kvantifikace.

Autorka své výsledky zpracovala do celkem 106 stran textu s dodatky makroskopických snímků fusarií, tabulek a další dokumentace. Práce je členěna do čtyř úseků, čtvrtá kapitola obsahuje výsledky spojené s diskusí, což nepokládám za vhodné řešení. Literární rešerše (30 str.) je rozsáhlá a kvalitně zpracovaná, i když je zřejmé, že autorka dávala přednost domácím zdrojům před zahraničními publikacemi.

V první části výsledků je vyhodnocení odebraných vzorků na přítomnost mikromycet rodu *Fusarium*. Postrádám údaj o ročním období, ve kterém byly odběry provedeny. Jednalo se o různé obiloviny, kukuřici a řepku. Tyto rostliny mají rozdílnou dobu zrání a bylo by zajímavé vědět, v jakém vegetačním stadiu se nacházely v okamžiku odběru, a zda vzdušné spady byly měřeny ve stejnou dobu. To je moje **první otázka**.

Mezi příslušníky rodu *Fusarium* byl dále hledán *TRI5* gen, jehož přítomnost je známkou možné toxinogenity. Z celkem 73 takto identifikovaných izolátů byly k testování produkce mykotoxinů *in vitro* vybrány tři kmeny: *F. poae*, *F. graminearum* a jeden blíže neurčený izolát. **Druhá otázka**: jaká byla kritéria výběru těchto kmenů k dalším pokusům?

**Třetí dotaz** mám pro upřesnění metody izolace mykotoxinů. Postup uvedený pod bodem 3.8.1 neuvádí, zda k analýze byl odříznut kousek agarového media s narostlým myceliem, nebo zda bylo odebráno pouze mycelium. Grafy a tabulky ukazují vliv teploty a přídavky fungicidů na tvorbu sledovaných mykotoxinů. **Další dotaz** směřuje k aplikaci fungicidů: byly přidávány do kultivačního media, nebo byly aplikovány až na rostoucí mycelium?

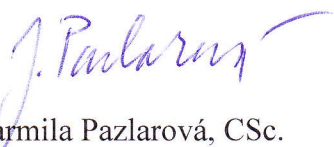
Zajímavé výsledky ovlivnění množství mykotoxinů byly zjištěny při společné kultivaci potenciálně toxinogenního fusaria (přítomnost *TRI5* genu) dalších netoxinogenních mikromycet. Na straně 116 je ukázka vzhledu směsných kultur po 14 dnech kultivace. Byly analýzy na přítomnost T-2 toxinu a DON prováděny v tomto případě také po 14 dnech kultivace? Vzhledem k poměrně velkým odchylkám množství mykotoxinů mezi kontrolními a

směsnými kulturami bych ocenila údaj z kolika nezávislých kultivací byly hodnoty uvedené v tabulce 15. získané, neboť v textu to není uvedeno.

**Závěr:**

Předložená disertační práce Ing. D. Hrubošové „Plísňe rodu *Fusarium* a produkce jejich toxinů“ rozšiřuje způsoby identifikace toxinogenních mikromycet o postupy molekulární biologie, hodnotí jejich výskyt a kvalifikovaně používá současné analytické postupy. Zadáání této práce bylo aktuální, náročné, autorka se s nároky kladené na disertační práce vyrovnala. Ing. D. Hrubošová prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje, podle § 47, odst. 4, zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a navrhuji komisi přijmout její práci jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze dne 30.10.2014



Doc. RNDr. Jarmila Pazlarová, CSc.

doc. RNDr. František Malíř, Ph.D, UHK, PŘF, Katedra biologie, Hradec Králové: Oponentský posudek: Plísně rodu *Fusarium* a produkce jejich toxinů

Dat.: 30. října 2014

**Děkan**

Univerzita Pardubice

**Fakulta chemicko-technologická**

Studentská 95

532 10 Pardubice 2

**p. prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.**

cestou předsedy komise pro obhajobu disertační práce

**p. doc. Ing. Jana Fischera, CSc.**

**Věc: Oponentský posudek disertační práce, Fakulta chemicko-technologická, Pardubice.**

**„PLÍSNĚ RODU *FUSARIUM* A PRODUKCE JEJICH TOXINŮ“**  
**„*FUSARIUM* FUNGI AND PRODUCTION OF THEIR TOXINS“**

Kandidát:

**Ing. Dana Hrubošová**

Vedoucí práce:

doc. Ing. Jarmila Vytrasová, CSc.

Katedra :

biologických a biochemických věd

Doktorský studijní program: P1419 Analytická chemie, obor Analytická chemie

Zpracoval: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Univerzita Hradec Králové  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biologie  
Rokitanského 62  
500 03 Hradec Králové

Disertační práce: „Plísně rodu *Fusarium* a produkce jejich toxinů“ (Pardubice, 2014) je vyzrálou, zdařilou a přehlednou studií, která se zabývá sledováním výskytu plísní rodu *Fusarium* a tvorbou vybraných mykotoxinů z této skupiny. U všech identifikovaných kmenů *fusarií* byla provedena polymerázová řetězová reakce pro potvrzení *TRI 5* genu, který kóduje tvorbu trichotecenových mykotoxinů. Produkce T-2 toxinu a deoxynivalenolu byla sledována v přítomnosti různých dezinfekcí a fungicidů a v přítomnosti jiných plísní, vyskytujících se na obilovinách – a to pomocí ELISA a HPLC.

Po formální stránce byla zvolena pro disertační práci koncepce, umožňující velmi dobrou orientaci v této relativně složité problematice. V souhrnu má práce 127 stran (včetně tabulek, obrázků, vzorců, bezpečnostních listů). Grafické zpracování a úprava mají vysokou úroveň.

Práce předložená k obhajobě je v základu rozdělena na 5 částí.

Anotace

Seznam použitých zkratk (2 str.)

1. část

**Úvod** (2 str.)

2. část

**Teoretická část** (celkem 29 str.): se zabývá: plísněmi rodu *Fusarium*, fusariovými mykotoxiny, charakteristikou mykotoxinů, trichotecenovými mykotoxiny a jejich zástupci, mezi které patří např. T-2 toxin, deoxynivalenol (DON) a nivalenol, dále jsou vysvětleny některé další fusariové mykotoxiny (včetně některých syntéz), např. fumonisiny, fumonisin B<sub>1</sub>, zearalenon (ZEN; F-2 toxin), informací o maskovaných mykotoxinech, stanovením mykotoxinů vhodnými analytickými metodami (HPLC, GC, TLC), imunochemickými metodami a biosenzory. Detailněji je vysvětlena Polymerázová řetězová reakce (PCR) a konečně se teoretická část zabývá omezením růstu plísní a produkce mykotoxinů a dekontaminačními způsoby.

3. část

**Vlastní experimentální část** (celkem 15 str.): V této části jsou uvedeny přístroje a pomůcky, chemikálie, reagentie pro PCR, použité kmeny plísní, kultivační media, identifikace a monitoring výskytu plísní rodu *Fusarium*, izolace DNA plísní rodu *Fusarium*, izolace fusariových mykotoxinů- produkovaných v přítomnosti dezinfekcí, fungicidů aj. plísní a konečně informace o kvantitativním stanovení T-2 toxinu a DON pomocí ELISA kitů a pomocí HPLC.

4. část

**Výsledky a diskuse** (celkem 23 str.): Sestávají z hodnocení výskytu plísní rodu *Fusarium*, modifikace PCR a četnosti výskytu *fusarií* s *TRI 5* genem, produkce T-2 toxinu a DON v přítomnosti dezinfekčních a fungicidních prostředků a v přítomnosti jiných plísní. Kapitola je zakončena porovnáním metod ELISA a HPLC.

5. část

**Závěr:**

V této kapitole shrnuje kandidátka získané výsledky disertační práce.

Konečně uvádí seznam použité literatury (21 str.)

Text disertační práce je zpracovaný čtivě, přehledně a didakticky vyváženě – bez věcných chyb. Celé pojetí zpracované problematiky svědčí o odborných kvalitách kandidátky.

#### **Aktuálnost zvolené problematiky:**

Problematika plísní a mykotoxinů a jejich analýz je v popředí stále většího zájmu-jak výzkumníků, tak pracovníků rutinních laboratoří.

DON-deoxynivalenol patří mezi nejvíce zemědělsky škodlivé mykotoxiny /společně s aflatoxiny, fumonisiny, ochratoxinem A a zearalenonem, které podstatně snižují úrodu a způsobují významné ekonomické ztráty, narušují obchod (Miller, 1995; Santos et al., 2009) / a navíc představují významné riziko pro zdraví lidí a zvířat. Mykotoxiny jsou navíc již mnoho let většinovým důvodem zamítnutí vstupu zemědělských plodin na trh EU(ES)-viz výsledky v Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). Oba, v práci zmíněné mykotoxiny, DON a T-2 toxin, patří do skupiny trichotecenů. Trichoteceny jsou největší skupinou mykotoxinů, která zahrnuje více jak 170 chemických individuů (Čonková, 2011). U různých živočichů, zvířat a konečně u člověka pak mykotoxiny ze skupiny trichotecenů způsobují poruchy trávicího traktu- zvracení, průjem, nechutenství, dále krvácivost - žaludku, střev, plic, močového měchýře a ledvin, edémy, poškození orálního systému- např. nekrózy bukální sliznice, dále dermatitidy- záněty kůže, krevní onemocnění – leukopenie (Richard et al., 2003; USAMRIID, 2005; Pestka, 2007; 2010).

Navíc fusariové a alternariové plísně se v ČR vyskytují velmi často. Už při koncentraci DON 100 µg/kg v surovinách a potravinách dochází k depresi T- lymfocytů (zásahem do T-helperů) a následně k inhibici imunity až o 80 % (Berek et al., 2001). Po dietární expozici trichotecenům byla u lidí prokázána např. septická angina, alimentární toxická aleukie (ATA), akutní DON toxikóza, Akabi-byo toxikóza, otrava červenou plísní, indická endemická artritida, onemocnění kloubů u dětí – Kashin Beck Disease. Otravy trichoteceny způsobené DON, považovaným za etiologické agens akutního GIT onemocnění v Číně v letech 1984-1985 (Luo, 1988) a dále v Indii, v Kašmíru, v září 1987 (Bhat et al. 1989). K otravě v Číně došlo po zaplísnění kukuřice a „strupaté“ pšenice. Dále byla popsána např. T-2 toxikóza v Číně po konzumaci rýže kontaminované T-2 toxinem (Weidenborner, 2001), kdy 60 % ze 165 lidí, kteří jedli rýži kontaminovanou T-2 toxinem mělo nauzea, závratě, zvracení, mrazení, bolesti břicha, dušností na hrudi, průjem s latentní periodou 10-30 min.

DON i T-2 toxiny jsou zajímavé z hlediska mechanismu účinků, např.: DON inhibuje syntézu DNA a RNA a proteinů na úrovni ribozomů. V akutních dávkách navozuje zvracení např. u prasat, při nízkém přívodu způsobuje hmotnostní úbytky a odmítání krmiva. Toxin působí hemolýzu erytrocytů. V CNS postihuje serotoninergní aktivitu a na periférii serotoninové receptory. Dále bylo zjištěno, že poškozuje expresi cytokinů a zvyšuje hladinu intracelulárního vápníku, což vede k aktivaci kaspasy (hlavního enzymu v regulaci apoptózy) a následným zlomům DNA a proteinů s následnou apoptózou buněk. Makrofágy, jako hlavní zdroj cytokinů, jsou velmi pravděpodobně klíčové při stimulaci produkce imunoglobulinů IgA (zřejmě prostřednictvím cytokin-interleukinu-6).

*T-2 toxin* inhibuje syntézu proteinů a nukleových kyselin (DNA i RNA) jak „*in vivo*“, tak „*in vitro*“. Dále poškozuje strukturu i funkci buněčné membrány – inaktivací různých enzymů a inhibicí funkce mitochondrií. Je cytotoxický pro buňky kostní dřeně, epitelální buňky GIT a zárodečné buňky, dále je induktor apoptózy v lymfocytech, v thymu aj. orgánech. Exponovaná zvířata *T-2* toxinu jsou mnohem méně rezistentní k bakteriálním a virovým infekcím. U experimentálních zvířat byla ještě jako mnohem závažnější prokázána inhalační expozice- se závěrem, že je 10 x 50 x toxičtější než u orálního podání (Stark, 2005). To všechno jsou důvody, proč jsou DON a *T-2* toxin v pořadí zájmu světové legislativy- s cílem minimalizace těchto rizik v surovinách i potravinách. Mezi hlavní toxické účinky *T-2* toxinu patří poškození GIT, nevolnost, slabost, nauzea, zvracení, krvavý průjem, závratě a bolesti hlavy, dále dermatotoxicita, leukopenie, krvácivost, destrukční působení na kostní dřeň, její atrofie, nekrotická angina a celková sepse (Malíř, Ostrý a kol., 2003; Woods et al., 2005; Malíř et al., 2007; Klaassen, 2008; Novotny et al., 2011).

### **Cíl disertační práce**

Cíl předložené disertační práce „Plísně rodu *Fusarium* a produkce jejich toxinů“ byl splněn a je zde zcela zřetelně vidět množství práce vykonané kandidátkou.

### **Zvolené metody práce:**

Zvolené metody práce odpovídají stavu poznání v dané době, dále technickému vybavení a možnostem pracoviště. Kandidátka dále správně vybrala reagenty, chemikálie a spotřební materiál k dané práci, výborně se v této práci orientovala a navíc k tomu využila i nejnovější podklady získané na základě vlastních zkušeností získaných z monitorování sladoven a na základě zkušeností získaných z řešení diplomových magisterských prací.

### **Výsledky práce:**

a) V rámci disertační práce bylo odebráno z *šesti míst v ČR celkem 881 různých vzorků* - a to stěry, spady ze vzduchu, různé obiloviny, kukuřice, řepka a slady. Práce byla zaměřena především na oblast sladovnického ječmene a ostatních obilovin. Vedle plísní rodu *Fusarium* byly zjištěny z doprovodné mikroflóry další rody plísní, např. *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria* aj.

b) Celkem kandidátka *vyizolovala 259 kmenů fusarií, z nichž 73 kmenů mělo TRI 5 gen.* Vedle toho se kandidátce podařilo *modifikací PCR zkrátit časovou náročnost metody.*

c) Velmi cenné je především zjištění, že *použití nesprávných aplikací, např. nižších koncentrací dezinfekčních a fungicidních přípravků může působit jako stresový faktor, stimuluje naopak produkci mykotoxinů, kterými se plíseň brání.* (Jako nejúčinnější dezinfekční prostředky proti růstu plísní a mykotoxinů byly zjištěny např. Desanal A plus a ProCura spray (s obsahem troclosen natria), z fungicidů pak Horizon 250 EW s obsahem tebuconazolu).

d) *Zajímavý je také účinek doprovodných plísní, kdy dochází ke snížení nebo zvýšení T-2 toxinu a DON.*

e) Navíc kandidátka došla ke shodným výsledkům při kvantitativním stanovení *T-2* toxinu a DON a konečně dospěla k závěru, že komerčně vyráběné sety a ELISA jsou ve srovnání s HPLC vhodným řešením – a to díky menší náročnosti.

**Přednosti disertační práce:**

Práce je kvalitním přehledem řešené problematiky s detailními popisy, velmi hodnotnými výsledky, shrnutými v tabulkách, grafech a obrázcích, doloženými zatím 3 publikacemi s IF, a to v rozsahu od 0,5 do 1,7, kde je autorka jednou první autor a 2 x spoluautor a dalšími 2 odeslanými (předloženými) pracemi do časopisů. Výsledky předložené disertační práce byly dále prezentovány celkem na 4 mezinárodních konferencích a na 11 domácích odborných konferencích.

**Nedostatky disertační práce** (pozn.: týkají se především teoretické části):

a) Někde je vidět, že kandidátka neměla k dispozici novější literární zdroje, např. na str. 20 uvádí, že existuje 300 mykotoxinů, což už není pravda, protože jsou objeveny stále další mykotoxiny. Uvádí se, že jich je více než 400 (Rai, Varma, 2009).

b) Přípomínka ke str. 25- k limitům obsahu DON v potravinách, lépe než citovat Bártová, 2002, bych raději citoval nařízení EK v aktuálním znění.

c) Pokud se týká nivalenolu (NIV) mohlo být zmíněno, že v některých oblastech světa (východní Asie, jihovýchodní Evropa, Oceánie, ale i v ČR aj.) DON a NIV kontaminují obilí společně. NIV vykazuje biologické účinky - akutní, chronické a imunotoxické (podobně jako DON), ale ve srovnání s DON ještě mnohem silnější účinky na orgány krvetvorby. Regulace DON existují, ale dosud žádná země zatím nereguluje NIV, i přesto, že má toxicitu podobnou nebo silnější než DON a představuje vážný problém kontaminace v mnoha zemích

d) Pozn.: Také fumonisinů je mnohem více, než autorka uvádí v tabulce struktury fumonisinů, přibližně asi 90 fumonisinů (Bartók et al., 2008).

e) Na str. 32 lze také polemizovat s tvrzením, že maskované mykotoxiny mohou hydrolýzou v zažívacím traktu *přecházet na původní formy mykotoxinů – více toxické.*

Je známo, že v potravinách na bázi obilovin a v krmivech byly v posledním desetiletí izolovány a chemicky charakterizovány vedle mykotoxinů deoxynivalenolu a zearalenonu také jejich konjugáty – glukosidy: deoxynivalenol-3-glukosid (DON-3-Glc) (Poppenberger et al., 2003) a zearalenon-4-O-glukosid (ZEA-4-O-Glc), které vznikají enzymatickou činností rostlin, které se tímto způsobem brání proti toxickému účinku deoxynivalenolu (Lemmens et al., 2005) a zearalenonu. Mezi nejběžnější konjugáty rostlin patří konjugáty se sacharidy – glukosidy. Zatímco u živočichů jsou metabolity či konjugáty eliminovány z organismu převážně ve formě exkrementů (např. močí), u rostlin jsou glukosidy akumulovány uvnitř rostlinných buněk, a to v závislosti na jejich rozpustnosti. DON-3-Glc a ZEA-4-O-Glc patří mezi rozpustné konjugáty a proto jsou akumulovány ve vakuolách rostlinných buněk.

Dosud se pořádně neví o jejich osudu, pokud se dostanou do zvířecího a lidského organismu a v posledních letech se v odborné veřejnosti diskutuje výskyt DON-3-Glc a dále např. ZEN-4-O-Glc v potravinách z obilovin a krmivech a jejich význam pro zdraví člověka a hospodářských zvířat. V současné době se vede odborná diskuse o osudu DON-3-Glc (a dále např. ZEN-4-O-Glc) v trávicím traktu savců, s cílem zjistit, zda je možná jeho transformace zpět na deoxynivalenol, respektive na zearalenon.

Výzkumníci v pilotní experimentální studii konstatovali, že hydrolýza DON-3-Glc a ZEN-4-O-Glc v žaludku savců je nepravděpodobná a tudíž i vznik „emerging“ DONu a zearalenonu.

Částečná hydrolyza DON-3-Glc byla zjištěna pouze po aplikaci celulasy. Nejednoznačný je i hydrolytický účinek vybraných bakterií trávicího traktu (*Enterococcus durans*, *E. mundtii* a *Lactobacillus plantarum*). Výsledky týkající se hydrolyzy DON-3-Glc jsou zatím různorodé (Berthiller et al., 2005; Berthiller et al., 2011; Nagl et al., 2012; Berthiller et al., 2013; Dall'Erta et al., 2013; Nagl et al., 2014). Proto je a bude třeba provést další relevantní krmné studie s DON-3-Glc a ZEN-4-O-Glc. Pro analýzu rizik DON-3-Glc je proto zapotřebí více údajů o jeho toxicitě a metabolismu (JECFA, 2011). Toxikologický výzkum konjugátu DON-3-Glc a ZEN-4-O-Glc v krmných studiích je bohužel stále na počátku a odborníci se zájmem očekávají jeho další výsledky

Např. u potkanů byla prokázána hydrolyza DON-3-Glc v GIT, ale uvolněný DON se jen velmi špatně vstřebával, proto bylo konstatováno, že DON-3-Glc má u potkanů výrazně nižší toxikologický význam ve srovnání s DON (Nagl et al., 2012). U prasat bylo prokázáno, že DON-3-Glc prakticky zcela hydrolyzuje, ale je pouze částečně absorbován. Ke štěpení DON-3-Glc docházelo převážně v GIT traktu, přičemž toxin se choval po systémové absorpci jako poměrně stabilní, což opět vedlo k závěru, že DON-3-Glc je méně biologicky dostupný než mateřský toxin - DON, a tedy má podstatně nižší toxikologický význam (Nagl et al., 2014).

O tom, že se u člověka DON-3-Glc buď nedostatečně hydrolyzuje, nebo se hydrolyzuje a špatně vstřebává, svědčí také výsledky analýz lidské moče přímou LC-MS/MS metodou s využitím negativní elektropray ionizace, které prokázaly v menším množství např. DON-3Glc (Huybrechts et al., 2013).

e) Str.36- Místo: Optický biosenzor s fluorescenčně značenou protilátkou byl použit pro analýzu 12 různých vzorků včetně fumonisinu (Pohanka, 2007). Zde by mělo být spíše Optický biosenzor s fluorescenčně značenou protilátkou byl použit pro analýzu 12 analytů včetně fumonisinu (Pohanka, 2007).

f) Disertační práci by také zcela jistě prospělo, kdyby kandidátka všechny strukturální vzorce namalovala sama, aby byly stejné- a to včetně prezentovaných syntéz.

g) Drobnou připomínku mám k citaci č.190- internetový zdroj, verze dle platné vyhlášky- např.: NESTLÉ ČESKO S.R.O. 2014: Jak se dělá rozpustná káva?. *Plus pro vás od Nestlé* [online]. © 2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://www.plusprovas.cz/clanky/vyziva/jak-se-dela-rozpustna-kava>

### **Dotaz na kandidátku:**

1. Do trichotecenů typu A patří např. HT-2 toxin, T-2 toxin, T-2 tetraol, MAS (monoacetoxyscirpenol), DAS (diacetoxyscirpenol), neosolaniol; do trichotecenů typu B patří deoxynivalenol (DON), 3- ADON (3-acetyldeoxynivalenol), fusarenon X, 15-ADON (15-acetyldeoxynivalenol), NIV (nivalenol), fusarenon – X.

**Kandidátka konstatuje, že typ A je toxičtější x typu B, věděla by kolikrát ?**


**2. Jak je to s limitem T-2 toxinu v EU (ES) ?**

**Závěry:**

I přes výše zmíněné nedostatky, musím konstatovat, že kandidátka zpracovala přehlednou disertační práci na vysoké úrovni, která jasně dokumentuje získané výsledky experimentální práce a prokázala v ní velmi dobrou schopnost samostatného tvůrčího řešení. Po odborné stránce dosáhla všech hlavních cílů a splnila tak zadání stanovené na školícím pracovišti. Práce je dobře využitelná, jak v další vědecké i učitelské práci, protože představuje velmi důležitý studijní a informační materiál. Navíc vypracovaná a modifikovaná metoda PCR je velmi cenná, protože slouží ke zrychlení analýz.

**Podle § 47, odst.4, zákona č. 11/1998 Sb., o vysokých školách proto navrhuji příslušné komisi přijmout její práci jako podklad k udělení titulu PhD.**

V Hradci Králové, dne 30. října 2014



doc. RNDr. F. Malíř, Ph.D.