

Vědecký výbor výživy zvířat

Transformace mykotoxinů střevními mikroorganismy

**Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.
Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

Praha, listopad 2012



Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,

PSČ: 104 01, www.vuzv.cz

Obsah

1	Přehled základních mykotoxinů	5
1.1	ÚVOD	5
1.2	AFLATOXINY	6
1.3	FUMONISINY.....	7
1.4	OCHRATOXINY	9
1.5	TRICHOTHECENY	10
1.5.1	T-2 toxin.....	10
1.5.2	Deoxynivalenol	12
1.5.3	Nivalenol	13
1.6	ZEARALENON	13
1.7	PROBLEMATIKA MASKOVANÝCH MYKOTOXINŮ	14
2	Snižování dopadu mykotoxinů na zdraví zvířat.....	16
2.1	PŘEDSKLIZŇOVÁ ÚPRAVA A ŠLECHTĚNÍ REZISTENTNÍCH ODRŮD.....	16
2.2	SKLADOVÁNÍ KRMIV	17
2.3	FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ METODY SNÍŽENÍ MYKOTOXINŮ V KRMIVECH	17
2.3.1	Tepelná úprava	17
2.3.2	Chemické prostředky – oxidační a redukční činidla	18
2.4	ADSORBENTY	20
2.4.1	Aktivní uhlí	20
2.4.2	Bentonity a zeolity	20
2.4.3	Organojíly.....	21
2.5	ADSORBENTY NA BÁZI GLUKANŮ A MIKROORGANISMŮ	22
2.6	ANTIOXIDANTY – SOUČÁSTI KOMPLEXNÍCH VYVAZOVAČŮ	22
2.6.1	Karotenoidy	23
2.6.2	Vitaminy.....	23
2.6.3	Polyfenoly, přírodní látky a extrakty.....	24
3	Mikroorganismy a jejich role v adsorpci nebo enzymatické degradaci mykotoxinů	31
3.1	ADSORPCE.....	31
3.1.1	Složení buněčných stěn kvasinek	31
3.1.2	Složení buněčných stěn bakterií mléčného kvašení	33
3.1.3	Požadavky na vlastnosti mikrobiálních vyvazovačů.....	33

3.1.4	Mikrobiální adsorpce aflatoxinů	34
3.1.5	Mikrobiální adsorpce trichothecenů	36
3.1.6	Mikrobiální adsorpce zearalenonu	36
3.1.7	Mikrobiální adsorpce ochratoxinu A.....	37
3.1.8	Mikrobiální adsorpce fumonisinů	39
3.2	ENZYMATICKÁ TRANSFORMACE MYKOTOXINŮ	40
3.2.1	Transformace aflatoxinů	41
3.2.2	Transformace OTA	41
3.2.3	Transformace ZEN	42
3.2.4	Transformace trichothecenů	44
3.2.5	Degradace fumonisinů.....	45
4	Závěr.....	47
	Reference.....	49

Seznam zkratek

15-ADON	15-acetyl deoxynivalenol
3-ADON	3-acetyl deoxynivalenol
AF	aflatoxin
AFB ₁	aflatoxin B ₁
AFB ₂	aflatoxin B ₂
AFG ₁	aflatoxin G ₁
AFG ₂	aflatoxin G ₂
AFM ₁	aflatoxin M ₁
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
BMK	bakterie mléčného kvašení
Caco-2	buněčná linie kolorektálního adenokarcinomu člověka
CEC	kationtově výměnná kapacita
D3G	deoxynivalenol-3-glukosid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DON	deoxynivaleon
DONS	deoxynivaleon sulfát
EC ₅₀	střední účinná (efektivní) koncentrace
ER- α , ER- β	estrogenní receptor α a β
EU	Evropská unie
FB	fumonisin
FB ₁	fumonisin B ₁
FB ₂	fumonisin B ₂
FHB	fusarióza klasu
HFB ₁	hydrolyzovaný FB ₁
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSCAS	NovaSil, hydratovaný sodno-vápenatý hlinito-křemičitan
IHKE	buněčná linie renálního epithelu
LD ₅₀	koncentrace vedoucí k 50% mortalitě sledovaných živočichů
MDE	„mycotoxin-degrading enzyme“ (součást produktu Mycofix)
MOS	mannanové oligosacharidy

MRS	de Man, Rogosa and Sharpe medium
NIV	nivalenol
NOAEL	„no observed adverse effect level“; nejvyšší dávka, při které se u testovaných zvířat ještě neprojeví žádné negativní účinky
norDON	nor-deoxynivalenol
OTA α	ochratoxin α
OTA	ochratoxin
PBS	fosfátový pufr
SBS	pyrosiřičitan sodný
UDP	glukuronosiltransferasa
USA	Spojené státy americké
ZAL	zearelanol
ZAN	zearalanon
ZEN	zearalenon
ZOL	zearalonol
ž. hm.	živá hmotnost
α -ZAL	α -zearalonol
α -ZOL	α -zearalonol
β -ZAL	β -zearelanol
β -ZOL	β -zearelenol

1 PŘEHLED ZÁKLADNÍCH MYKOTOXINŮ

1.1 Úvod

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní, mohou se vyskytovat v různých krmivech, jako jsou píce, siláže, a hlavně v různých obilovinách. Obiloviny a zelené rostliny sklízené ke krmným účelům vždy obsahují spory toxikogenních plísní. Naštěstí nízká vodní aktivita zabraňuje jejich růstu. Růst plísní může být redukován také přidávkou organických kyselin, hlavně kyseliny propionové (Lacey, 1989). Pro eliminaci již vytvořených mykotoxinů v krmivech neexistuje zatím spolehlivý postup, nejefektivnější a relativně nejlevnější je optimalizace agrotechniky a skladování, kontrola a třídění krmiv.

Rozvíjejí se ale nové metody účinné v průběhu skladování nebo na straně spotřebitele – farmy i zvířat. Obsah aflatoxinů přijatých zvířaty s krmivem lze snížit pomocí přísad s adsorbentem jako je aktivní uhlí, hlinitokřemičitany jako jsou bentonit a zeolit, nebo glukany z kvasinek (Jard et al., 2011). Velmi kontaminované krmivo by v žádném případě nemělo být podáváno zvířatům, kontaminované obiloviny tak lze například využít pro produkci ethanolu (Hinton, 2000).

Lidem hrozí pravděpodobně nejvyšší riziko otrav mykotoxiny z přímé konzumace kontaminovaných obilovin, luštěnin a zeleniny. Z potravin živočišného původu je riziko pravděpodobně menší, i když mykotoxiny byly nalezeny v masu, mléku, vejcích a také ve zpracovaných surovinách např. v párkách (Park and Liang, 1993; Ramos et al., 1996a).

Limity mykotoxinů v potravinách stanovuje Nařízení komise (ES) č. 1881/2006. Maximální limity v krmivech jsou definovány Směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES. Tato směrnice ale řeší pouze aflatoxiny. Limity pro ostatní mykotoxiny jsou specifikovány v platném doporučení komise 2006/576/ES – O přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 toxinu, HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat. Toto doporučení nemá formu závazné normy pro výrobce krmiv. Výrobci směsí a chovatelé zvířat by přesto měli v zájmu ochrany veřejného zdraví a zdraví zvířat intenzivně monitorovat krmiva určená ke krmení zvířat a prověřovat soulad se směrnými hodnotami. Producenti krmných surovin by dále měli respektovat Doporučení Komise 2006/583/ES – Doporučení k prevenci a snižování fusariových toxinů v obilovinách a výrobcích z obilovin, které shrnuje známé zásady správné agrotechniky pro snížení obsahu mykotoxinů. Mezi

hlavní mykotoxiny nalézané v krmivech patří aflatoxin B₁ – AFB₁ (produkovaný *Aspergillus flavus*), fumonisin (*Fusarium* spp.), ochratoxin (*Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum*) a trichothecenové mykotoxiny deoxynivalenol (DON) a T-2 toxin (*Fusarium* spp.) (Meronuck and Concibido, 1996).

1.2 Aflatoxiny

Aflatoxiny (AF) byly první objevené mykotoxiny. Produkčním organismem je *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* (Jay, 1996). Následkem akutní otravy uhynulo v Anglii v 60. letech minulého století 100 000 krůtích brojlerů po zkrmování kontaminovaného šrotu z podzemnice olejné (Jay, 1996). Dnes jsou rizika spojena zejména s kukuřicí, bavlněným semenem a maniokem, především, jsou-li skladovány v tropických oblastech při vyšší teplotě a vlhkosti (Larbier and Leclercq, 1992). Jsou známy čtyři hlavní druhy aflatoxinů, označované jako aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂; svítí modře po ozáření ultrafialovým světlem), aflatoxin G₁ (AFG₁) a aflatoxin G₂ (AFG₂; svítí zeleně). Nejčastějším a zároveň nejtoxičtějším aflatoxinem je AFB₁ (Hussein and Brasel, 2001), proto 90 % experimentů je zaměřeno na něj, stejně tak i legislativní normy. Na aflatoxiny jsou citlivá zejména kuřata, krůťata a prasata (Tab. 1). Skot a ovce jsou odolnější, pravděpodobně v důsledku přítomnosti bachoru a souvisejících mikroorganismů nebo enzymových aktivit (Patterson and Allcroft, 1970). Aflatoxiny mají kancerogenní účinky, zejména v játrech. Tvorbu tumorů mohou vyvolat dávky již od 1 mg/kg. Zvláště citlivá je vodní drůbež, na kachňata negativně působí již 30 µg/kg. LD₅₀ pro jednotlivá zvířata je uvedena v Tab. 1, jsou v rozmezí 0,05–10 mg/kg.

Aflatoxiny mohou způsobovat akutní a chronickou toxicitu, karcinogenitu, teratogenitu, genotoxicitu a imunotoxicitu (Creppy et al., 2004). Místem vzniku nádorů u zvířat jsou obvykle játra (Hussein and Brasel, 2001), následované ledvinami. Aflatoxin M₁ (AFM₁) je metabolit, který se objevuje v mléce krav vystavených vysokým dávkám AFB₁. Karcinogenní potenciál AFM₁ je 10× nižší než je tomu u AFB₁ (Wild and Gong, 2010).

Tab. 1: Vybrané hodnoty LD₅₀ pro AFB₁ (mg/kg)

Druh	Dávka (mg/kg)	Druh	Dávka (mg/kg)
Králík	0,3	Potkan	5,5
Kočka	0,6	Makak	7,8
Pes	0,05-1,0	Myš	9,0
Prase	0,6	Křeček	10,2
Pavián	2,0	Člověk	0,54–1,62

(Wild and Gong, 2010)

V novém konsolidovaném znění 2002/32/ES ze dne 06.09.2012 jsou maximální povolené limity AFB₁ oproti původnímu nařízení zpřísněny a jsou 20 µg/kg u komponent krmných směsí a 10 µg/kg u kompletních krmných směsí, 5 µg/kg u dojnic a mláďat (viz. Tab. 2).

Tab. 2: Maximální povolené limity AFB₁ v krmivech pro hospodářská zvířata dle konsolidovaného znění Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 06.09.2012

Nežádoucí látka	Produkt pro účely výživy zvířat	Směrné hodnoty obsahu (mg/kg) pro krmivo o 12% vlhkosti
Aflatoxin B ₁	Komponenty krmných směsí	0,02
	Doplňková a kompletní krmiva	0,01
	s výjimkou: krmiv pro dojnice, telata, ovce na produkci mléka, jehňata, kozy na produkci mléka, kůzlata, selata a mláďata drůbeže	0,005
	krmiv pro skot (s výjimkou dojnic a telat), ovce (s výjimkou ovcí na produkci mléka a jehňat), koz (s výjimkou koz na produkci mléka a kůzlat) a drůbež (s výjimkou mláďat)	0,02

1.3 Fumonisin

Fumonisin (FB) jsou mykotoxiny produkované plísněmi *Fusarium* sp. Vyskytují se hlavně na kukuřici, ale i ostatních obilovinách (Stockmann-Juvala and Savolainen, 2008). V oblastech zvýšeného výskytu jednoho z produkčních kmenů – *F. moniliforme*, byl zaznamenán větší výskyt rakoviny jícnu u lidí (Rheeder et al., 1992). Chronickou intoxikaci fumonisinem často doprovází rakovina jícnu ale i jater (Marasas, 2001). Poškozují také nervovou soustavu (Waes et al., 2005) a způsobují kardiovaskulární obtíže (Fincham et al.,

1992). Skot a drůbež jsou odolnější vůči FB než koně, prasata, králíci nebo laboratorní zvířata (Voss et al., 2007).

Kontaminace kukuřice je běžná a FB bývá detekován často u 100 % vzorků krmiv (Grajewski et al., 2012). Zatímco produkty z kukuřice určené pro lidskou výživu zpravidla obsahují méně než 1 mg/kg fumonisinu B₁ (FB₁), krmiva pro zvířata bývají často těžce kontaminována. Jsou popsány mykotoxikózy jako je leukoencefalomalácie u koní a plicní edémy u prasat způsobené fumonisinem. Např. až 330 mg/kg FB₁ bylo dříve nacházeno v krmivu pro prasata (Shephard et al., 1996). Ve studii publikované Grajewskim byla mezi polskými krmivy v letech 2006–2009 míra positivity u kukuřice na zrno 52–100 %, s váženým průměrem v některých letech až 1 mg/kg. U siláží byl ve stejném screeningu zjištěn vážený průměr dokonce 2 mg/kg. V běžných letech se vážený průměr u siláží a kukuřičných krmných směsí pohyboval ale mezi 10–19 µg/kg (Grajewski et al., 2012). Pro fumonisin přitom nejsou zákonem určeny maximální limity, Evropská komise ale doporučuje maximální limity na základě 2006/576/ES (Tab. 3).

Tab. 3: Maximální limity pro fumonisin v krmivech pro hospodářská zvířata dle Doporučení komise 2006/576/ES

Nežádoucí látka	Produkt pro účely výživy zvířat	Směrné hodnoty obsahu (mg/kg) pro krmivo o 12% vlhkosti
Fumonisin B ₁ a B ₂	Krmné suroviny	
	kukuřice a produkty kukuřice	60
	Doplňková a kompletní krmiva pro:	
	prasata, koně (Equidae), králíky a zvířata v zájmovém chovu	5
	ryby	10
	drůbež, telata (< 4 měsíce), jehňata a kůzlata	20
dospělé přežvýkavce (> 4 měsíce) a norky	50	

U potkanů dochází k výskytu rakoviny při dávkách 2,2 a 6,6 mg/kg živé hmotnosti (ž. hm.) na den nebo také 0,50 mg FB₁/kg diety (Howard et al., 2001). U koní fumonisin vyvolávají leukoencefalomalacii, kterou je možná pozorovat již od 7. dne po otravě, obvykle ale 14. až 21. den (Morgavi and Riley, 2007).

Drůbež je relativně odolná vůči toxickým účinkům fumonisinů. Kuřata krmená 100–400 mg FB₁/kg krmiva po dobu 21 dní měla nižší přírůstky hmotnosti a zvětšená játra s příznaky

jaterní nekrózy od ≥ 200 mg FB/kg krmiva (Ledoux et al., 1992). Jaterní enzymy mohou být indikátorem subletálního příjmu kolem 20–80 mg FB₂/kg krmiva (Henry et al., 2000). Příjem FB v krmivu v koncentraci 150 mg/kg snižuje odolnost kuřat vůči infekci *Salmonella gallinarum* a vede k častějším průjmům (Deshmukh et al., 2005).

1.4 Ochratoxiny

Existuje celkem asi sedm ochratoxinů, z nichž nejznámější je ochratoxin A (OTA), který je zároveň i nejvíce toxický (Jay, 1996). Hlavním produkčním organismem je *Aspergillus ochraceus*, dále pak *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus* a další plísňe tohoto rodu. OTA je produkován také penicilii: *Penicillium viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. variable* a dalšími (Jay, 1996). Tento mykotoxin byl nalezen v kukuřici, bobu, kakau, sójových bobech, ovsu, ječmeni, citrusových plodech, podzemnici olejné a kávě (Jay, 1996). V krmivech pro hospodářská zvířata bývá nalézán v menší koncentraci a méně často než AFB₁. Rozsáhlou studii na výskyt OTA v krmivech v sousedním Polsku publikoval Grajewski (2012). Od roku 2006 pokleslo zamoření polských krmných obilovin OTA z 88 % na 27 %. Vážený průměr pozitivních vzorků se stále pohybuje v rozmezí 0,6-10,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Maximum bylo 760 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a vážený průměr pozitivních vzorků 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U siláží a kukuřic byly záchyty o něco nižší, ne ale u kompletních směsí, kde byl vážený průměr 1,8–14,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U kompletních krmných směsí byla nižší celková maxima, nikoliv ale vážené průměry, což je způsobeno promícháním surovin a ředěním ve výrobnách. U většiny hospodářských zvířat je limit toxicity pro OTA kolem 1 mg/kg (Larbier and Leclercq, 1992). Podrobné review na současné počty a trendy výskytu mykotoxinů v krmivech publikovala Streit et al. (2012). Ochratoxin A se v závislosti na zemi EU a provedené studii vyskytoval u 2–87 % vzorků. Průměrný počet pozitivních krmiv ale byl v EU kolem 30 % (Streit et al., 2012).

Toxicita OTA je závislá na živočišném druhu, pohlaví a způsobu podání (Pfohl-Leskowicz and Manderville, 2007). Mezi hlavní účinky patří nefrotoxicita (Milicevic et al., 2008) a poškození jater (Malagutti et al., 2005). OTA vykazuje ale i imunotoxický účinek (Al-Anati and Petzinger, 2006). To vede k vyšší míře běžných onemocnění zvířat a snížení užitkovosti. Mimo jiné snižuje účinnost vakcinace (Stoev et al., 2002). LD₅₀ při perorálním podání se pohybuje od 0,2 mg/kg ž. hm. u psů nebo 30,3 mg/kg ž.hm u potkanů. Dávky 0,2 mg/kg ž. hm. vedou u potkanů k častým výskytům nádorů ledvin (Boorman et al., 1992).

Orální podávání 400 a 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ž. hm. OTA potkanům vedlo ke snížení příjmu, poklesu sérového thyroxinu, k 37% poklesu počtu červených krvinek ve srovnání s kontrolou.

Snížil se také počet bílých krvinek, došlo k výraznému nárůstu hmotnosti žaludku a docházelo k hromadným úhynům (Elaroussi et al., 2006). Pro OTA nejsou zákonem určeny maximální limity, Evropská komise ale doporučuje maximální limity na základě 2006/576/ES (Tab. 4).

Tab. 4: Maximální povolené limity pro OTA v krmivech pro hospodářská zvířata dle Doporučení komise 2006/576/ES

Nežádoucí látka	Produkt pro účely výživy zvířat	Směrné hodnoty obsahu (mg/kg) pro krmivo o 12% vlhkosti
Ochratoxin A	Krmné suroviny	
	obiloviny a produkty obilovin	0,25
	Doplňková a kompletní krmiva:	
	doplňková a kompletní krmiva pro prasata	0,05
	doplňková a kompletní krmiva pro drůbež	0,1

1.5 Trichotheceny

Jsou toxiny produkované *Fusarium* spp., které se vyskytují hlavně v kukuřici, příležitostně ve špatně skladované rýži a pšenici. Nejznámějšími zástupci jsou T-2 toxin a DON (Larbier and Leclercq, 1992). U obou látek je toxický limit pro kuřata 4 mg/kg (Larbier and Leclercq, 1992). Stejný limit platí i pro nosnice u kterých jsou vyšší dávky spojeny s dramatickým poklesem snášky a dochází i k poklesu kvality vajec (Brake et al., 2002). Trichotheceny bývají nalézány také v krmivech pro prasata, které je mohou částečně transformovat a zřejmě i detoxikovat pomocí vlastní střevní mikroflory (Eriksen et al., 2002).

1.5.1 T-2 toxin

T-2 toxin se běžně vyskytuje v pšenici, ječmeni, ovsu a kukuřici (Eriksen and Pettersson, 2004), díky čemuž je jeho příjem u zvířat vysoký. Projevem chronického příjmu T-2 toxinu je hubnutí, snížení počtu erytrocytů a leukocytů, snížení glykémie. Dále dochází k patologickým změnám na žaludku a játrech a snížení odolnosti k onemocněním, zvracení, letargii, různým nekrózám a poškození chrupavčitých tkání (Glavits et al., 1989). Zvířata na tento toxin jsou různě citlivá (Tab. 5).

Tab. 5: Hodnoty LD₅₀ T-2 toxinu pro různé živočišné druhy v závislosti na způsobu aplikace

Druh	Způsob podání	LD ₅₀ (mg/kg)	Druh	Způsob podání	LD ₅₀ (mg/kg)
Myš	orálně	10	Prase	orálně	5,0
Myš	intraperitoneálně	5,2	Prase	intraperitoneálně	1,5
Potkan	orálně	4,0	7-denní brojler	orálně	4
Potkan	intraperitoneálně	1,5	Nosnice	orálně	6,3
Morče	orálně	3,06	Jednodenní kohoutek	orálně	1,83
Morče	intraperitoneálně	1,2	7-denní kuře	orálně	5

(Burmeister, 1971; DeNicola et al., 1978; Huebner et al.; Li et al., 2011b; Williams, 1989)

Toxicitu T-2 toxinu ovlivňuje celá řada faktorů, jako je způsob podání, čas expozice, dávka, stáří zvířete, pohlaví, celkový zdravotní stav a přítomnost dalších mykotoxinů v krmivu. LD₅₀ T-2 toxinu u sedmidenních kuřecích brojlerů je 5 mg/kg krmiva. Ve srovnání s ostatními mykotoxiny je T-2 toxin jeden z nejtoxičtějších (Tab. 6), je genotoxický, cytotoxický a má imunostatické účinky (Sokolovic et al., 2008).

Tab. 6: Toxicita mykotoxinu na sedmidenní kuřecí brojler

Mykotoxin	LD ₅₀ (mg/kg)	Mykotoxin	LD ₅₀ (mg/kg)
Aflatoxin	6,8	Deoxinovalenol	140
HT-2	9,33	Ochratoxin	2,1
T-2 toxin	4,97	Diacetoxyscirpenol	2,0-5,9

(Sokolovic et al., 2008)

T-2 toxin má toxický vliv na téměř všechny buněčné procesy v trávicím traktu. Už při malé dávce může dojít k poškození sliznice trávicího traktu a zhoršení vstřebávání živin. Mohou se objevit nekrózy projevující se jako bíle-nažloutlé léze v dutině ústní (Girish and Devegowda, 2006), žaludku, střevní sliznici a játrech (Konjevic et al., 2004). Léze a snížený přírůstek se objevují i po jediné aplikaci toxinu v množství 5 mg/kg krmiva, častěji ale po např. týdenním krmení kontaminovaného krmiva s obsahem toxinu v množství 1–5 mg/kg krmiva (Brake et al., 2000).

U prasat T-2 toxin ovlivňuje příjem krmiva a snižuje imunitu již při krmení 0,5 mg T-2 toxinu/kg krmiva. Prasata obecně jsou velmi citlivá, u prasat je stanovena nejvyšší dávka, při

kteře se nedostaví negativní účinky – „No observed adverse effect level“ (NOAEL) na koncentraci 0,2 mg/kg krmiva. Naproti tomu skot je vůči T-2 toxinu velmi odolný, z velké části zřejmě díky mikrobiální degradaci v batoru (Eriksen and Pettersson, 2004).

1.5.2 Deoxynivalenol

Deoxynivalenol je méně toxický než T-2 toxin, nicméně extrémní dávky mohou způsobit šok a následně smrt. Akutní toxicitu provází zvýšené slinění, nevolnost, průjem, zvracení a anorexie, proto je DON označován jako vomitoxin. Minimální emetická dávka je u prasat 50 µg/kg ž. hm. nebo 75 µg/kg krmiva (Pestka, 2007). NOAEL je stanoven na 25 µg/kg ž. hm. (Forsell et al., 1987). Kuřata nejsou tak citlivá na DON jako prasata a přítomnost 5 mg/kg v krmivech nezpůsobuje žádné škody (Eriksen and Pettersson, 2004). Výzkum, který provedl Yunus et al. (2012) však naznačuje, že DON může snížit užitkovost brojlerů. Se vzrůstající koncentrací DON v krmivu je pozorován negativní vliv na střevní epitel, délky a počty klků a s rostoucí dobou expozice dochází ke zkracování tenkého střeva a klesá schopnost vstřebávání živin.

U psů koncentrace 8 mg DON/kg krmiva indukuje zvracení. Při koncentraci menší než 6 mg/kg již zvracení není indukované a NOAEL je 0,4 mg/kg ž. hm., podobný efekt při srovnatelných dávkách je pozorovatelný u koček (Hughes et al., 1999). Pro trichotheceny zatím nejsou zákonem určeny maximální limity, Evropská komise ale doporučuje maximální limity pro DON na základě doporučení 2006/576/ES (Tab. 7), limity pro T-2, jeho metabolit HT-2 a NIV se ale připravují.

Tab. 7: Maximální limity pro DON v krmivech pro hospodářská zvířata dle Doporučení komise 2006/576/ES

Nežádoucí látka	Produkt pro účely výživy zvířat	Směrné hodnoty obsahu (mg/kg) pro krmivo o 12% vlhkosti
Deoxynivalenol	Krmné suroviny	
	obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších kukuřičných produktů	8
	vedlejší kukuřičné produkty	12
	Doplňková a kompletní krmiva s výjimkou	5
	doplňkových a kompletních krmiv pro prasata	0,9
doplňkových a kompletních krmiv pro telata (<4 měsíce), jehňata a kůzlata	2	

1.5.3 Nivalenol

Nivalenol (NIV) se přirozeně vyskytuje v obilovinách, je obdobně toxický jako DON a má imunotoxické a hematotoxické účinky. Nivalenol je pomalu absorbovatelný z gastrointestinálního traktu a je vylučován výlučně stolicí. Pro NIV nejsou dle našeho průzkumu literatury zjištěné hodnoty NOAEL při orálním podání při dlouhodobých studiích.

Zatímco u potkanů krmených krmivem NIV v koncentracích 0,4–6,9 mg/ kg ž. hm. po dobu 90 dnů došlo k výraznému poklesu hmotnosti a průmům, mladá prasata krmená 0–5 mg/kg čistého NIV po dobu 3 týdnů byla i v nejvyšší koncentraci bez příznaků. Mikroskopické zhodnocení stavu gastrointestinálního traktu u nich ale ukázalo patologické změny v ledvinách (Hedman et al., 1997). K poklesu příjmu krmiva dochází až v koncentracích od 5,8 mg NIV/kg ž. hm. (Williams and Blaney, 1994).

1.6 Zearalenon

Zearalenon (ZEN) je známý pro své estrogenní účinky na zvířata, kdy se váže na receptory ER- α a ER- β , má tedy slabý estrogenní efekt a představuje problém související se sníženou reprodukcí hospodářských zvířat (Hussein and Brasel, 2001). Akutní toxicita u ZEN je poměrně nízká a není dávana obvykle do souvislosti s přímou toxicitou. LD₅₀ u myší, potkanů nebo morčat je 2000–20000 mg/kg. Bylo zjištěno, že prasata a ovce jsou citlivější než hlodavci, NOAEL u prasat je 40 μ g/kg ž. hm. na den ve srovnání s potkanem, kde NOAEL je 100 μ g/kg ž. hm. (Kuipergoodman et al., 1987). Mimo vlivu na reprodukci je ZEN v podezření z karcinogeneze (Zinedine et al., 2007). Studie poukazují na ZEN jako na možnou příčinu vyššího rizika vzniku rakoviny prsu (Ahamed et al., 2001).

U březích samic ZEN zvyšuje pravděpodobnost úhynu plodu nebo může snížit hmotnost plodu (D'Mello et al., 1999). Příjem ZEN ovlivňuje i dělohu, snižuje sekreci luteinizačního hormonu a progesteronu a může vést ke změnám v morfologii děložní tkáně (Etienne and Dourmad, 1994). ZEN u kanců tlumí produkci testosteronu, ovlivňuje funkci varlat, spermatogenezi, potlačuje samčí libido a může vyvolat feminizaci. U krav způsobuje neplodnost a snižuje produkci mléka (D'Mello et al., 1999). Byly pozorovány i změny hmotnosti ledvin a morfologické změny na štítné žláze. Ovlivňuje hypofýzu nebo sekreci progesteronu a estradiolu v organismu (Kuipergoodman et al., 1987). Samci dostávající 20 mg/kg ž. hm. ZEN denně po dobu pěti týdnů měli zvýšené množství sérového prolaktinu, menší varlata a došlo ke změnám spermatogeneze (Milano et al., 1995). Evropská komise

doporučuje maximální limity pro ZEN v krmivech na základě doporučení 2006/576/ES (Tab. 8).

Tab. 8: Maximální povolené limity pro ZEN v krmivech pro hospodářská zvířata dle Doporučení komise 2006/576/ES

Nežádoucí látka	Produkt pro účely výživy zvířat	Směrné hodnoty obsahu (mg/kg) pro krmivo o 12% vlhkosti
Zearalenon	Krmné suroviny	
	obiloviny a produkty obilovin s výjimkou vedlejších produktů kukuřice	2
	vedlejší produkty kukuřice	3
	Doplňková a kompletní krmiva:	
	doplňková a kompletní krmiva pro selata a prasničky (mladé prasnice)	0,1
	doplňková a kompletní krmiva pro prasnice a výkrm prasat	0,25

1.7 Problematika maskovaných mykotoxinů

Od 80. let se diskutuje o tzv. „maskovaných“ mykotoxinech. Jedná se většinou o glykosidy nebo acetylované formy. Zatím je známo velmi málo o tom, jak vznikají, v jakých organelách a strukturách jsou ukládány, biologické aktivitě a metabolismu v plísňích nebo napadených rostlinách. Některé z nich byly objeveny nedávno. Například dnes velmi známý a v krmivech rozšířený metabolit deoxynivalenolu – deoxynivalenol-3-glukosid (D3G) nebyl konvenčními analytickými metodami zjištěn až do roku 2005 (Berthiller et al., 2005), přitom jeho koncentrace v krmivech jsou často vysoké a převyšující vlastní DON. V kukuřici činil podíl D3G 70 % z celkového DON a v jiné studii provedené na pšenici D3G dokonce dominoval (Berthiller et al., 2009).

Maskované mykotoxiny vznikají v plísňích buď *de novo*, zřejmě jako prekurzor nativního mykotoxinu, nebo druhotně v napadených rostlinách. Ty se tímto procesem chrání před toxickými účinky xenobiotika. Maskované mykotoxiny mohou být zpětně uvolňovány a aktivovány na nativní formu v průběhu fermentace, například silážování, a zřejmě i v trávicím traktu živočichů (Berthiller et al., 2011).

Mykotoxiny jsou v rostlinách detoxikovány a enzymaticky metabolizovány do polárnější a tedy rozpustné formy, která je uložena např. ve vakuole nebo konjugována s komponenty buněčné stěny. Metabolické procesy probíhající v rostlině zahrnují deepoxidace, deacetylace a isomerace nebo konjugace. Během těchto reakcí jsou reaktivní funkční skupiny redukovány či maskovány tak, aby se toxicita nově vzniklého produktu snížila či eliminovala. Při konjugaci jsou volné mykotoxiny vázány na glukosu, sulfát či glutathion (Berthiller et al., 2005). Účinnost detoxikačních procesů v rostlině je zřejmě základem rezistence odrůd pšenice vůči plísním, například fusarióze klasu (FHB = *Fusarium Head Blight*), která souvisí se schopností přeměňovat DON na pro rostlinu méně toxický konjugát deoxynivalenol-3-O-glukosid (D3G) (Berthiller et al., 2009).

Rostliny kromě DON detoxikují i řadu dalších mykotoxinů. Například *Arabidopsis thaliana* rychle transformuje ZEN na spektrum 17 různých sloučenin, glykosidů, malonyl-glykosidů, dihexosidů, pentosylhexosidů a metabolitů α -ZOL and β -ZOL. Důležitou roli v této biotransformaci hraje enzym glukosyltransferasa (Berthiller et al., 2007). Suspenzní kultura *A. thaliana* také vytváří D3G z prekursoru DON v reakci katalyzované enzymem UDP-glukosyltransferasou (Poppenberger et al., 2003). Jsou známy maskované konjugáty fumonisinů i OTA (Berthiller et al., 2009).

V napadených rostlinách bývají nacházeny jak glykosilované tak i acetylované formy mykotoxinů. Deoxynivalenol je v krmivech přítomen také jako 3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON) nebo 15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON), a není vždy zřejmé, který pochází z rostlin nebo z plísní. Vlastní DON je ale vždy přítomen v koncentracích o řád vyšších (Berthiller et al., 2009; Mirocha et al., 1989).

Konjugáty mykotoxinů mohou být ale enzymaticky uvolňovány a tedy aktivovány v průběhu fermentace potravin a krmiv. Sladké kynuté pečivo obsahovalo 1,2–1,9× více DON než mouka, ze které bylo vyrobeno, zřejmě díky konverzi neznámého konjugátu na nativní DON (Young et al., 1984). Kostelanska et al. (2009) zjistila vysoké množství D3G v pivu. Navíc, stejný tým zjistil, že D3G v pivu stoupá v průběhu sladování. Podílí se na tom zřejmě dva procesy - *de novo* syntéza související s růstem plísně v průběhu klíčení zrna, ale i enzymatické uvolnění D3G z dalších nerozpustných forem (Kostelanska et al., 2009). Není nic známo o podobných procesech např. při silážování (Lancova et al., 2008).

Otázkou zůstává, nakolik jsou maskované mykotoxiny biologicky aktivní ve srovnání s původním mykotoxinem. Aktivita je podmíněná hydrolýzou a je otázkou, zda k ní v průběhu trávení dojde.

Podle nedávno provedené studie je D3G velmi stabilní v 0.02M HCl, žaludeční šťávě, umělých střevních šťávách, odolnost vůči mandlové i šnečí glukuronidase a lidské β -glukosidase. Účinně ho ale štěpila na DON cellobiasa z *Aspergillus* sp. a o něco méně cellobiasa z *Trichoderma* sp. Schopnost zpřístupňovat D3G je tak zřejmě doménou střevních mikroorganismů a příslušných glukosidas. Významnou roli zřejmě hrají mikroorganismy trávicího traktu. V rámci širokého screeningu různých druhů byla zjištěna schopnost štěpit D3G u *Bifidobacterium adolescentis*, zástupců *Enterococcus* sp., a *Lactobacillus plantarum* (Berthiller et al., 2011). Endogenní enzymy produkované buňkami tenkého střeva zřejmě D3G hydrolyzovat nedokáže. Při experimentech s D3G na trávicím modelu tvořeným buněčnou linií CaCo-2 nebyl D3G hydrolyzován ani absorbován, na rozdíl od DON (De Nijs et al., 2012).

2 SNIŽOVÁNÍ DOPADU MYKOTOXINŮ NA ZDRAVÍ ZVÍŘAT

2.1 Předsklizňová úprava a šlechtění rezistentních odrůd

Pro snížení předsklizňové kontaminace polních plodin jsou v konvenčním zemědělství používány fungicidy. Hledají se však nové alternativní a efektivní způsoby, mezi nimi šlechtění polních plodin s vyšší rezistencí. Tento přístup se jeví jako velmi perspektivní a je podrobně shrnut v review (Munkvold, 2009). Intaktní vosková vrstva semene na povrchu perikarpu je zřejmě jedním z faktorů rezistence a šlechtění za účelem zesílit tuto vrstvu vede k vyšší odolnosti semen (Sampietro et al., 2009). Pozornost se zaměřuje i na křížení odolnosti pšenice proti fusarióze klasu FSB způsobované *Fusarium graminearum*, které v napadených klasech vytváří DON. V množství vyprodukovaného DON hraje roli nejen kmen *Fusarium* sp., ale je zřejmý i vliv odrůdy. Bylo pozorováno, že v některých odrůdách je vyšší obsah DON při stejné míře napadení (Mesterházy, 2002). Nejnovější výzkumy ale ukazují, že to zřejmě souvisí s přeměnou DON na D3G nebo jiné konjugáty, které zvolené analytická metoda nezachytne (Berthiller et al., 2009), i když mohou být stále biologicky aktivní.

Jako perspektivní se dále jeví možnost biologické kontroly výskytu *A. flavus* a *A. parasiticus* v polních plodinách prostřednictvím netoxikogenních kmenů *A. flavus*, tzv. biokompetitivní exkluze (Horn et al., 2001). Mnoho z těchto kmenů jsou stejně virulentní jako kmeny toxikogenní a efektivně snižují kontaminaci zemědělských plodin. Aplikace spor netoxikogenní plísně „La3328“ současně s vybraným toxikogenním kmenem na semeno před setím vedlo ke snížení výskytu aflatoxinů v zrně o 70–99 % ve srovnání s kontrolou

zaočkovanou pouze toxikogenním kmenem (Atehnkeng et al., 2008). Ne všechny netoxikogenní kmeny však skutečně produkci aflatoxinů snižují (Cleveland et al., 2003).

2.2 Skladování krmiv

Pro prevenci zaplísnění krmiv je důležitá důkladná inspekce v průběhu skladování. Skladování nesmí probíhat při vlhkosti vyšší než 15 %. Důležitým bodem skladování je snížení výskytu tzv. vlhkých kapes, kde dochází k masivnímu rozvoji plísně a vysoké koncentraci toxinů (Kabak et al., 2006). Vlhká místa mohou vznikat i v důsledku střídání teplot při skladování a kondenzace vody, např. při povrchu obalu (ES 006/583/ES). Tyto lokální zdroje kontaminace se bez povšimnutí smísí s normálním krmivem a způsobí celkové zvýšení koncentrace toxinů. Monitoring a odstranění lokálních ložisek je účinná strategie, například, okrajování jablek v průběhu zpracování jablečného džusu vede k 90% snížení obsahu mykotoxinu patulinu (Lovett et al., 1975). Kontaminované obilí má obvykle jiný vzhled, což třídění usnadňuje. Podobně mytí suroviny vede ke snížení obsahu mykotoxinů. Například mytí pšenice před mletím sníží koncentraci DON v produktu o více než 20 % (Visconti et al., 2004).

2.3 Fyzikální a chemické metody snížení mykotoxinů v krmivech

Jsou známy procesy, které transformují mykotoxiny na netoxické produkty. Přehled o těchto metodách poskytuje nedávno publikované review (Kabak et al., 2006). He et al. (2010) zase publikoval rozsáhlé review na možnosti transformace a detoxikace trichothecenových mykotoxinů.

2.3.1 Tepelná úprava

Mykotoxiny jsou obecně velmi stabilní. V průběhu normálního vaření, parní úpravy nebo pražení nedochází k významnému úbytku. Teplotní stabilita u různých mykotoxinů se ale liší. Uvádí se například, že teploty nutné pro zničení aflatoxinů jsou 207–306 °C. Přesto například vaření různých potravin vedlo k 41% úbytku AFB₁ a AFB₂ (Kabak and Dobson, 2009). Podobně i vaření nebo pražení kukuřice vedlo k 28% a 38–54% snížení AFB₁ v kukuřici. Vaření rýže v nadbytku vody s následným slitím vedlo až k 89% snížení obsahu AFB₁. Vysoký úbytek AFB₁ je pozorován při tlakovém vaření. Také pražení je významným krokem v úpravě podzemnice. V průběhu pražení se ztrácí 43–83 % obsahu aflatoxinů (Kabak and Dobson, 2009).

Ochratoxiny jsou rovněž poměrně labilní. Z pohledu lidské výživy je výskyt ochratoxinů velkým problémem v kávě, v průběhu komerčního pražení však údajně dochází k 65–90% snížení. Zvláštní je, že tyto údaje jsou v rozporu s laboratorními studiemi, které vliv pražení na redukci OTA v kávě zpochybňují. V průběhu pražení kávy při 200 °C po dobu 20 min došlo maximálně ke 12% snížení obsahu OTA. Vaření rýže v nadbytku vody vedlo k 83% úbytku OTA. Několik studií ale upozorňuje na fakt, že v průběhu tepelné úpravy v závislosti na matrici může dojít k izomerizaci na maskované produkty, které jsou možná méně toxické, ale stále přítomny (Kabak and Dobson, 2009). Zvolené analytické metody mohou vést k falešně negativním výsledkům, neboť tyto maskované mykotoxiny nezachytí. Příkladem toho je dříve zmiňovaný D3G, který dlouho unikal pozornosti (Berthiller et al., 2005).

Fumonisin jsou také poměrně stabilní molekuly. Běžné vaření potravin nebo pasteurace mléka nevede k jejich snížení. Dekompozice fumonisinu B₁ začíná při tepelné úpravě nad 150 °C. Například zahřátí šrotu na 190 °C po dobu 60 min vede pouze k 60–80% snížení FB₁. Až 218 °C po dobu 15 minut vedlo ke kompletní ztrátě fumonisinu. Opět zde platí, že produkty hydrolýzy fumonisinu nebo produkty Maillardovy reakce fumonisinu s redukujícími cukry v matrici krmiva mohou mít stále podstatnou biologickou aktivitu a toxicitu a mohou být aktivovány v trávicím traktu (Humpf and Voss, 2004). U Maillardovy reakce ale dochází k blokování aminoskupiny a to vedlo k nižší toxicitě *in cellulo* na potkaních hepatocytech a také v testech *in vivo* (Humpf and Voss, 2004). Deoxynivalenol je seskviterpen, a z mykotoxinů zřejmě nejstabilnější. Tepelná úprava nemá významný vliv s výjimkou smažení při teplotách nad 169–243 °C, kdy dojde až k 60 % úbytku. K významnému úbytku ale dochází v průběhu alkalického vaření, kdy 30 minutový záhřev při 120 °C a pH 10 vedl ke kompletní degradaci DON. Produkty degradace DON nejsou ještě dostatečně známy, dosud byly popsány deriváty norDON A, B a C, D, E, F a laktony. Tyto nor-deriváty vykazují mnohem nižší toxicitu, při testech na IHKE buňkách nevykazovaly toxicitu ani při 100 μM koncentraci (Bretz et al., 2006). Zearalenon je stabilní sloučenina, která v krmivech vydrží záhřev při 120 °C po dobu 4 h, je ale degradována při 225 °C po 30 min. Produkty jeho degradace např. v průběhu pečení chleba mají po zpracování nižší estrogení aktivitu (Kabak and Dobson, 2009).

2.3.2 Chemické prostředky – oxidační a redukční činidla

Oxidační činidla, jako ozon nebo peroxid vodíku mají potenciál degradovat mykotoxiny. Například krmivo pro brojlerů s přísadkou AFB₁, které bylo upraveno

elektrochemicky vzniklým O₃, vykazovalo po podání nižší toxicitu u krocanů. Oxygreen[®] proces (<http://www.oxygreen.com>) je patentovaný postup úpravy pekařských mouk a živočišných krmiv, při kterém výrobce garantuje snížení obsahu mikroorganismů, reziduí pesticidů, mykotoxinů a usmrčení žijícího hmyzu. Na webových stránkách výrobce uvádí 94% účinnost při oxidační degradaci OTA. Podobně Lemke et al. (1999) demonstroval, že aplikace ozónu snížila estrogenní aktivitu zearalenonu u myši (Lemke, 1999). Ozón mimo to snižuje toxicitu trichothecénů, pravděpodobně štěpením v místě dvojné vazby (McKenzie et al., 1997).

Redukční činidla, jako kyselina askorbová, siřičitany a pyrosiřičitany snižují množství AFB₁ a DON v krmivech. Pyrosiřičitan sodný (SBS) například transformuje DON na DON-sulfonát (DONS), který je méně toxický než DON a krmivo ošetřené tímto prostředkem v dávce 5 g/kg nevykazovalo u selat příznaky toxicity způsobované DON (Dänicke et al., 2005). DONS byl také hlavním metabolitem v krvi selat krmených SBS-ošetřovaným krmivem. Metoda byla neúčinná v případě zearalenonu. Vzhledem k tomu, že prasata jsou velmi citlivá na DON, jedná se o velmi perspektivní směr výzkumu (Dänicke et al., 2010). Redukující cukry D-glukosa a D-fruktosa jsou zase účinné při detoxikaci FB₁. Při extruzi krmiv s obsahem glukosy reaguje velká část FB₁ na N-(deoxy-D-fructos-1-yl)-fumonisin B₁. Ten je méně toxický než původní produkt. Bez glukosy byl vliv na FB₁ nižší, samotná extruze krmiva bez přídavku redukujících cukrů vedla ke snížení kolem 20 % (Jackson et al., 2012).

Mimo výše zmíněné byly na krmivech a potravinách testovány hydroxid vápenatý, monomethylamin, plynný chlor, kyselina askorbová, kyselina chlorovodíková, sirovodík a formaldehyd nebo oxid siřičitý. Chemické ošetření, přestože je v mnoha případech účinné, je poměrně drahé a silná oxidační nebo redukční činidla mohou vést k degradaci některých živin. Z tohoto důvodu nejsou v praxi příliš uplatnitelné (Awad et al., 2010).

Jednou z možností jak snižovat toxicitu mykotoxinů v potravinách a krmivech je použití amoniaku (Park, 1993). Použití amoniaku k detoxikaci aflatoxinů v krmivech je procedura schválená v některých státech USA, Francii, Velké Británii či Senegalu. Průměrné náklady této procedury se pohybují mezi 5 a 20 % ceny komodity. Mezi největší nevýhody této metody patří neúčinnost na jiné mykotoxiny kromě aflatoxinů a možné poškození zdraví zvířat rezidui amoniaku v krmivu (Huwig et al., 2001).

2.4 Adsorbenty

Fyzikální a chemické metody jsou drahé, navíc často není zřejmé, zda nevedou jen k maskování mykotoxinu, který může být později aktivován v trávicím traktu. Proto je alternativním přístupem deaktivace mykotoxinů *in vivo* v trávicím traktu zvířat, například adsorpcí na inertní částice nebo mikroorganismy, které odchází s výkaly. V současné době je známo několik desítek adsorbentů na bázi modifikovaných hlinitokřemičitanů nebo aktivního uhlí.

2.4.1 Aktivní uhlí

Aktivní uhlí ve vodném roztoku je schopné za *in vitro* podmínek efektivně absorbovat většinu mykotoxinů, zatímco ale *in vivo* žádný vliv u různě aktivovaných uhlí pozorován nebyl. Aktivní uhlí vzniká pyrolýzou organické hmoty za nepřístupu kyslíku, grafitové destičky vytváří spoustu mikropórů a poskytují velkou absorpční plochu, přibližně 800–1600 m²/g. Jedná se ale o adsorbent nespecifický. Jeho relativně nízká účinnost *in vivo* s sebou navíc nese vysoké riziko adsorpce jiných nepostradatelných živin (Ramos et al., 1996a).

2.4.2 Bentonity a zeolity

Na rozdíl od aktivního uhlí, jílovité horniny mají vyšší specifitu. Ve výživě hospodářských zvířat se jako adsorbenty používá několik druhů jílovitých hornin. Mezi nimi kaolinit, bentonity nebo zeolity. Jedná se o velmi porézní horniny, které obsahují trojrozměrné matrice tetraedrů AlO_4 a SiO_4 tvořící síťovou strukturu s vysokou schopností vázat vodu. Díky kationtově-výměnné kapacitě řady dalších přítomných iontů váží i řadu jiných organických molekul (Anthony et al., 1990)

Kaolinit je vodnatý křemičitan hlinitý ($Al_2Si_2O_5(OH)$). Je to minerál ve velké míře zastoupený v horninách kaolínech. Mimo AlO_4 a SiO_4 nemá žádné další substituce jinými prvky. Bentonit oproti tomu chemicky proměnlivá a hůře definovaná hlinitokřemičitá hornina, jejíž hlavní složkou jsou smektity, nejčastěji montmorillonit (vodnatý křemičitan hlinitý a hořečnato-vápenatý, $(Na;Ca)_{0.3}(Al;Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$). Kromě toho obsahuje i další příměsi jako kaolinit (Anthony et al., 1990).

V závislosti na složení se rozlišují tzv. silně bobtnavé a méně bobtnavé bentonity, přičemž ty silně bobtnavé jsou považovány za kvalitnější. Bobtnavost je dána obsahem smektitů, tedy hlavně montmorillonitu. Dalším měřítkem kvality v přímé souvislosti se schopností vázat mykotoxiny je kationtově výměnná kapacita (CEC). Dříve byly považovány za standard kvality bentonity z USA, nové studie ukazují, že některé hnědé bentonity z Indie nebo Řecka mohou být i kvalitnější (Ahonen et al., 2008). Z bentonitů zřejmě nejvíce

prozkoumaný je Novasil (Novasil PLUSTM) (distribuován firmou BASF; původně Kaiser Chemicals, Cleveland, OH), který je znám také jako HSCAS a je selektivní vyvazovač AFB₁, není tedy efektivní v případě jiných mykotoxinů. První studii na HSCAS publikoval (Phillips et al., 1988), kdy u brojlerů podávání HSCAS při současné intoxikaci AFB₁ v dávce 7,5 mg/kg krmiva významně snížil dopad intoxikace, téměř na úroveň kontroly. Pozitivní efekt byl pozorován i u neintoxikované normální kontroly s přídávkem HSCAS. Výsledky byly potvrzeny i v dalších studiích (Ramos and Hernandez, 1996). *In vitro* i *in vivo* je HSCAS téměř dvakrát účinnější než vyvazovače na bázi kvasinek (Li et al., 2010). Při přídávku 0,5 % NovaSil HSCAS do krmiva s 3 mg/kg AFB₁ došlo ke zvýšení přírůstku na úroveň 84 % kontroly bez AFB₁. Jeho účinek byl ale srovnatelný s HSCAS od jiného výrobce (Harvey et al., 1994). Adsorpce ostatních mykotoxinů jako zearalenon, ochratoxin A a fumonisin je ale slabší nebo vůbec žádná (DON) (Friend et al., 1984; Huff et al., 1992; Kubena et al., 1990; Ramos et al., 1996b).

Kromě bentonitů jsou jako absorpční jíly využívány zeolity. Zeolity jsou širokou skupinou jílovitých hornin, z nichž nejnámější je klinoptiolit. Zeolity nebo bentonity mohou být chemicky modifikovány obohacováním o NaCl, což mění jejich sorpční kapacitu a specifitu. Lin et al. (2012), takto demonstroval vliv modifikace prostřednictvím NaCl na schopnost vázat amoniak. Modifikace prostřednictvím Ca²⁺, K⁺, Cu²⁺, Co²⁺ rovněž významně mění sorpci amoniaku, vyšší podíl Ca²⁺ ovlivňuje sorpci negativně (Ivanova et al., 2010). Zeolity jsou mimo jiné využívány jako iontoměniče při úpravách a odsolování vody. Klinoptiolit je přírodní zeolit často využívaný ve výživě zvířat. Mimo to se uplatňují syntetické zeolity, které nachází četné průmyslové aplikace, mj. jako molekulová síta, rozměry dutin jsou ale obvykle mnohem větší než u přírodních zeolitů (Sherman, 1999).

2.4.3 Organojíly

Limitem jílových vyvazovačů je jejich specifický účinek pouze k aflatoxinům a jejich nízký případně velmi malý účinek k ostatním mykotoxinům (Phillips, 1999). Toto omezení může být překonáno chemickými modifikacemi. Podstatou těchto modifikací jsou změny povrchových vlastností, kterých se dosahuje výměnou strukturálních kationtů nahrazených kvartérními amoniiovými sloučeninami s vysokou molekulovou hmotností. Touto změnou vzrůstá hydrofobicita (Papaioannou et al., 2005). V několika studiích byla testována schopnost organozeolitů vázat některé mykotoxiny *in vitro* (Dakovic et al., 2007; Daković et al., 2007; Daković et al., 2005; Daković et al., 2003). Výsledky těchto studií prokázaly, že modifikované zeolity (organozeolity) efektivně adsorbují AFB₁, ZEA, OTA a FB₁. Adsorpce

AFB₁ však u modifikovaných zeolitů poklesla ve srovnání s nemodifikovanými zeolity. Výsledky, které prokázaly rozdílná množství navázaných ZEA, OTA a AFB₁ naznačují rozdílnosti funkčních skupin a rozdílný tvar molekul těchto mykotoxinů. To potvrzuje, že fyzikální a chemické vlastnosti mykotoxinů ovlivňují schopnost organo-minerálních materiálů je vázat. Na základě provedených studií lze říci, že organozeolity mohou být využívány jako krmná aditiva adsorbující mykotoxiny, pokud však bude jejich účinnost prokázána také v *in vivo* studiích (Kolosoza and Stroka, 2011) Jiným příkladem organojílu je produkt, který je součástí komerčního produktu Amadeite[®] (Olmix, s.a.) tento produkt je montmorillonitem modifikovaný extraktem ze zelených mořských řas. V procesu zvaném interkalace dojde k navázání polysacharidů z mořských řas mezi jednotlivé vrstvy horniny a vytvoření nanokompozitu s vlastnostmi spojujícími organické i anorganické adsorbenty (Laza et al., 2007).

Z organických látek je v následující kapitole věnována pozornost polysacharidům a jejich komplexům s proteiny. Z jiných organických vyvazovačů byla v literatuře věnována pozornost cholestyraminu, není ale známo, že by byl testován na zvířatech (Hartinger and Moll, 2011).

2.5 Adsorbenty na bázi glukanu a mikroorganismů

Anorganické vyvazovače na bázi jílovitých hornin jsou problematické z hlediska účinnosti, jsou specifické zejména k aflatoxinům a mohou nespecificky vázat řadu dalších živin a tím snižovat nutriční hodnotu krmiv. Byly také popsány případy, kdy přidání jílu dokonce zvyšovalo toxický účinek mykotoxinů (Jard et al., 2011). Z tohoto důvodu se pozornost v poslední době obrací na mikroorganismy (Binder, 2007). Mikroorganismy jsou schopny snižovat toxický účinek mykotoxinů na organismus zvířete několika způsoby, jedním z nich je adsorpce, druhým enzymatická detoxikace. Tato aktivita byla popsána u řady mikroorganismů, jak např. půdních hub, tak i některých přirozeně se vyskytujících v trávicím traktu zvířat (Pizzolitto et al., 2012a).

2.6 Antioxidanty – součásti komplexních vyvazovačů

Po několika letech experimentů a prodeje komerčních produktů založených na HSCAS a dalších bentonitech je v tomto sektoru zřetelný trend vedoucí k vývoji širokospektrálních vyvazovačů založených na glukanech, hlinitokřemičitanech a enzymech vedoucích k

biologické transformaci mykotoxinů na metabolicky méně aktivní nebo neaktivní produkty. Častým doprovodným faktorem těchto komplexních přípravků jsou přírodní antioxidanty.

Antioxidanty jsou potencionálně účinné v oblasti ochrany organismu proti toxickým účinkům mykotoxinů několika možnými mechanismy. Prvním z nich je záchyt volných radikálů a jiných reaktivních forem kyslíku a omezení poškození DNA, druhým mechanismem je zvýšení exprese detoxikačních enzymů v játrech, jako je katalasa, superoxid dismutasa a zejména glutathion-S-transferasa a glutathion peroxidasa. Metabolismus mykotoxinů probíhá obvykle v játrech prostřednictvím cytochromů P450. Aktivace některých enzymů tohoto systému zodpovědných za detoxikaci některého z mykotoxinů je účinnou metodou prevence aflatoxikózy. Tento efekt byl například popsán u léčiva fenobarbitalu, ale i některých flavonoidů (Mezes et al., 2010). Z přírodních sloučenin jsou jako nejvýznamnějšími antioxidanty rostlinná barviva: karotenoidy, chlorofyl, anthokyany, polyfenoly dále vybrané vitaminy a selen.

2.6.1 Karotenoidy

Většina mykotoxinů, jako například AFB₁, T-2 toxin nebo OTA vyvolává v organismu poškození buněčných membrán způsobené peroxidací lipidů a tvorbou volných radikálů. Například β-apo-8'-karotenal (E160e), kantaxanthin (E161g) a astaxanthin (E161j) používané jako barviva u drůbeže, snižují v játrech vznik preneoplastických lézí, poškození DNA, karcinogenezi a genotoxicitu, zřejmě tím, že zvyšují detoxikaci AFB₁ na jeho méně genotoxický produkt AFM₁ (Gradelet et al., 1998). U přírodního β-karotenu a lycopenu byl rovněž popsán vliv na snižování vlivu mutageny způsobené AFB₁ a T-2 toxinem (Galvano et al., 2001; Leal et al., 1999; Rauscher et al., 1998).

2.6.2 Vitaminy

Proti mykotoxikózám se doporučuje například přidavek vitamínu B₁, neboť plísně produkují mimo mykotoxinů i anti-AFB₁ faktory, T-2 toxin je zase znám tím, že snižuje přístupnost vitamínu E (Weber et al., 2007). Dle interního manuálu firmy BASF údajně zvýšení přídávku vitamínu C, A a vitamínu E o 25 % oproti standardní dávce snižuje toxicitu AFB₁ a environmentální stres u krůt (Weber et al., 2007). Podobně i Webster et al. (1996) popsali, že karcinogeneze AFB₁ byla vyšší u potkanů s nedostatkem vitamínu A, naopak se radikálně snížila u potkanů krměných zvýšeným množstvím vitamínu A ve formě karotenoidů. Kromě vitamínu C, A a E, také riboflavin má zřejmě potenciální chemopreventivní účinek proti poškození DNA indukovaném AFB₁ in vivo u potkanů (Webster et al., 1996a, b).

2.6.3 Polyfenoly, přírodní látky a extrakty

Některé přírodní látky jako fenolické kyseliny, kumarin, chlorofyl a jeho deriváty ale i extrakty z léčivých rostlin jsou také známy jako účinná prevence mykotoxikóz (Galvano et al., 2001). V testech prováděných na potkanech s přidavkem rostlinných polyfenolů se urychlila detoxikace AFB₁. Flavonoidy jako kvercetin, kemferol, morin, naringin, katechin a fenolické kyseliny (kávová, chlorogenová), další fenolické látky jako eugenol a thymol zvyšují aktivitu glutathion-S-transferasy, která je klíčová k detoxikaci metabolicky aktivovaných karcinogenních epoxidů AFB₁ (Guengerich et al., 1996). Například sylimarin, směs flavolignanů z ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) má vliv na zvýšení aktivity antioxidantních enzymů u potkanů exponovaných AFB₁ (Rastogi et al., 2001). Z rostlinných látek byl poměrně podrobně zkoumán kurkumin, látka obsažená v zázvorovitých rostlinách rodu *Curcuma* sp.. Podávání kurkuminu snižovalo toxicitu způsobovanou AFB₁ (Soni et al., 1997) a vedlo ke snížení DNA-adduktů tím, že zvýšilo expresi některých cytochromů P450 (Firozi et al., 1996). Perspektivou je použití prostředků tradiční čínské medicíny, tzv. adaptogeny jako schizandra čínská, ženšen, nebo kotvičník zemní snižovaly karcinogenní vliv AFB₁ in vitro na buněčných liniích (Ip et al., 1996). Řada produktů uvedených v Tab. 9., např. Elitox, Ultrabond, Zetox antioxidanty obsahuje jako součást formulace. Uvedená tabulka přehledně ukazuje, které produkty byly testovány na které mykotoxiny a dále které produkty jsou dostupné na trhu. Tabulka nemá za cíl být úplná, usnadňuje orientaci v jednotlivých typech produktů.

Tab. 9: Přehled produktů na eliminaci mykotoxinů v krmivech dostupných na trhu v EU (upraveno podle EFSA Scientific Report, 2009; <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/22e.pdf>)

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
Bentonit-montmorillonit	Astra Ben 20®	Prince Agri-product	Bentonit sodný	AFB ₁ , AFM ₁	S
	Red Crown®	Prince Agri-product	Bentonit vápenatý	AFB ₁ , AFM ₁	S
	Flow Guard®	Laporte Biochem, Inc.	Bentonit sodný	AFB ₁ , AFM ₁	S
	Microsorb®	American Colloid Co.	Barva bílá; nerozpustný ve vodě, sodný bentonit	AFB ₁ , AFM ₁	S
	Volclay FD-181	Volclay International Pty Ltd	Prášek; pH: 8,0 – 10,5 v 6 % sušině, chemické složení: 63,02 % SiO ₂ , 21,08 % Al ₂ O ₃ , 3,25 % Fe ₂ O ₃ , 0,35 % FeO, 2,67 %	AFB ₁	S

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
	Bentonit sodný		MgO, 2,57 % Na ₂ O, 0,65 % CaO, bentonit sodný Průměrná velikost částic: 53 μm; chemické složení: 54,91 % SiO ₂ , 1,41 % Al ₂ O ₃ , stopy Fe ₂ O ₃ , 0,01 % MnO, 0,1 % TiO ₂ , stopy CaO, 2,81 % MgO, 1,70 % Na ₂ O, 0,16 % K ₂ O, stopy SO ₃ , 0,05 % P ₂ O ₅ , 5,59 % H ₂ O, pH: 8,5	AFB ₁ , FB ₁	S
	ATOX®	Tolsa	Světle krémová barva, vlhčený prášek, jíl s obsahem smektitu a sepiolitu	AFB ₁ , AFM ₁	S, P
	Bentonit	Sigma chemical		FB ₁	S
	Agrabond	Agranco Corp.	Složení: SiO ₂ - 72,8 %, Al ₂ O ₃ – 26,4 %, Fe ₂ O ₃ – 0,1 %, K ₂ O- 0,3 % MgO- .1%, CaO- 0,2 % Na ₂ O- 0,1 %; šedý prášek, modifikovaný hlinitokřemičitan vápenatý	Fusariové a aspergillové mykotoxiny	P
	Mycosil a Topsil	Dresen Quimica (Mexiko)			S
	BIONIT®S	Süd-Chemie AG	Montmorillonit, modifikovaný	AFB ₁	P
	Toxisorb®, Toxisorb® Classic a Toxisorb® Premium	Süd-Chemie AG	Modifikovaný montmorillonit	AFB ₁ , FB ₁ , částečně ZEN i OTA	P
	Fixat® Binder E558	Süd-Chemie AG	Bentonit-montmorillonit	AFB ₁ , ZEN, OTA, FB ₁	P
	Sodno-vápenatý montmorillonit	Engelhard Chemical corp.		AFB ₁ , ZEN	S
	Organicky modifikovaný montmorillonit	Süd-Chemie	Chemické složení: 54,8 % SiO ₂ , 15,6 % Al ₂ O ₃ , 4,2 % Fe ₂ O ₃ , 2,0 % CaO, 3,5 % MgO, 1,5 % K ₂ O, 3,5 % Na ₂ O	DON, ZEN	S
	Montmorillonit	Aldrich-Chemie	Prášek; povrch 20–40 m ² /g, objemová hustota: 800–850 g/l, průměrná velikost částic < 1μm	Aflatoxiny	S
	Nano-kompozitně upravený montmorillonit	Feed science institute, China	Velikost částice: 10–60 nm	Aflatoxiny	S
	Milbond-TX®: bentonit	Milwhite Inc	Chemické složení: 54,6–65,6 % SiO ₂ , 14,5–19,7 % Al ₂ O ₃ , 4,05– 5,02 % Fe ₂ O ₃ , 0,64–0,97 % CaO, 0,94–2,08 % MgO, 0,6– 1,19 % K ₂ O, 0,54–1,37 % Na ₂ O, 0,63–0,77 % TiO ₂	AFB ₁	S
	Swy-2: Wyoming	Source Clay	Velikost částic < 2μm		S

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
	montmorillonit sodný	Repository of the Clay Minerals Society			
	NovaSil™ (HSCAS)	Engelhard Chemical corporation	Prášek	AFB ₁ , AFM ₁	S
	Myco-Ad®	Special Nutrients	Prášek, HSCAS	Aflatoxiny, FB ₁ , OTA, ZEA	P
	Myco-Ad® A-Z (alternativní názvy: CoBind AZ, ToxFree, MycoAd ZT)	Special Nutrients	HSCAS, pro prasata		P
	Myco-Ad DF		HSCAS, pro drůbež		P
	Hydratovaný sodno-hořečnatý- vápenatý hlinitokřemičitan	Silver and Baryte Ores Mining Co.	Velikost < 1 mm Chemické složení: 68,26 % SiO ₂ , 13,30 % Al ₂ O ₃ , 0,08 % Fe ₂ O ₃ , 4,34 % CaO, 1,05 % MgO, 0,94 % K ₂ O, 0,26 Na ₂ O, 11,6 %		S
	Myco-Binder®	Matura Tech, Inc.			P
	Sorbatox	Kiotechagill		Aflatoxiny, FB ₁ , OTA, ZEN, T-2 toxin	P
	EMBI-100	Agri-growth International Inc.			P
	FLO-BOND	Agri-Tec			P
	FLO-BOND PLUS	Agri-Tec			P
	Azomite® (HSCAS)	Azomite Mineral Products, Inc			S
	Toxfin® Dry	Kemin	Bentonit s obsahem sepiolitu (hydratovaný hořečnatý křemičitan)		P
	MexSil™	Grupo Karluis - Luis A. Espejel (Mexiko)	HSCAS		S
	Solis® Prisma	Novus		ZEN, aflatoxiny	P
	Calibrin-A	AmlanInt. (IL, USA)	Přírodní montmorillonit	AFB ₁	P
	Calibrin-Z	AmlanInt. (IL, USA)	Modifikovaný montmorillonit pro širší spektrum látek	AFB ₁ , ZEN	P
	Mycobond	Optivite, GB	Nespecifikovaný hlinitokřemičitan	AFB ₁	P

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
Zeolity	Klinoptilolitový-heulanditový jíl			OTA NIV, DAS, T-2 toxin, ZEN AFB ₁	S
	Klinoptilolit	Engelhard Chemical Corporation	Průměr částice: 2,68 μM , specifický povrch: 1,35 m ² /g	AFB ₁ (+ ostatní aflatoxiny)	S
	ZAR-MIN	Zeo Inc.	Kationtově-výměnná kapacita 1,75 meq	AFB ₁ , ZEN, OTA, T-2, NIV. DON, FB1	P
	Ocra-TOX		Křemelina, max.70 % oxidu křemičitého		P
Aktivní uhlí	Aktivní uhlí	Sigma F.I.S.	Velmi porézní, nerozpustný prášek s velkou plochou na hmotnostní průměr	ZEN, FB ₁ , FB ₂ , OTA, DON, AFB ₁ , AFM ₁	S
	Filtrisorb 400	Calgon carbon corporation	Lehce alkalický charakter, granulovaný produkt, průměrná velikost částic 0,55–0,75 mm	Aflatoxin	S
	Aquacarb™ 207EA	Waterlink Sutcliffe carbon	Lehce alkalický charakter, pH 7–8, povrchová plocha : 950–1100 m ² /g	Aflatoxin	S
	GCN 1240	Norit	Lehce alkalický charakter	Aflatoxiny	S
	Nuchar® SA-20	Westvaco	Prášek, pH 4–6; plocha: 1400–1800 m ² /g	AFB ₁ , AFM ₁	S
	Darco KB-B	Aldrich Chemical Co.	prášek; průměr částic 45 μm	AFB ₁ , OTA	S
	Super aktivní uhlí	Requa, Inc.	Plocha: 2000 m ² /g, granulovaný	Aflatoxiny, T-2 toxin	S
	Aktivní uhlí	Carlo Erba	FB ₁ , FB ₂	Aktivní uhlí	S
	SORBOPOR MV 125	Camel Environment S.r.L	Původ: různé dřevěné zdroje, plocha: 1116 m ² /g	FB ₁	S
Buněčné stěny kvasinek	Buněčná stěna kvasinek	Alltech Lesaffre Group		Aflatoxin, OTA, ZEN, T-2 toxin	P
	MTB-100® (polymerní glukomannan extrahovaný z buněčných stěn kvasinek)	Alltech	Světle hnědá barva, mírně rozpustní ve vodě	OTA, FB ₁ , Moniliformin, ZEN, AFB ₁ , AFM ₁ , T-2 toxin, DAS, kyselina fusarová	P
	Mycosorb™ (absorbent mykotoxinu na bázi	Alltech	Jemně světle hnědá barva,	FB ₁ , ZEN, DON, NIV,	P

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
	glukanu z kvasinek): polymerní glukomannan		nerozpuštěný ve vodě	T-2 toxin, Aflatoxin	
	Esterifikovaný glukomannan	Alltech		AFB ₁ , OTA, T-2 toxin	S
	EX16 (cukrovarnické výpalky obsahující 16% buněčných stěn kvasinek) (roztok obsahující 16 % buněčných stěn)	Lesaffre (Bio- Springer)		OTA	S
	BETA (čištěná frakce glukanů z buněčných stěn)	Lesaffre (Bio- Springer)		OTA	S
	LEC (sušené frakce buněčných stěn kvasinek)	Lesaffre (Bio- Springer)		OTA	S
Živé kmeny kvasinek	Kvasinky <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>			OTA, ZEN, DON	S
	<i>Phaffia rhodozyma</i> a <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> izoláty			OTA	S
	Mycotox® NG	CEVA Animal Health	Oxicinol, thymol, prášek z kvasinek	Aflatoxin	P, S
	Mycofix®	Biomin		FB ₁ , ZEN, DON, NIV, DAS, T-2 toxin, OTA	P
Ostatní houby	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Eurotium herbariorum</i> , <i>Rhizopus</i> spp., netoxikogenní kmen <i>A. flavus</i>			AFB ₁ , Aflatoxiol	S
	<i>A. parasiticus</i> NRRL 2999 a NRRL 3000			AFB ₁	S
Živé bakterie	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain GC, <i>Lactobacillus helveticus</i> 46 a 72, <i>Lactobacillus jugurti</i> 63, <i>Lactobacillus lactis</i> 170, <i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>Casei</i> C3 <i>Streptococcus thermophilus</i> NG40Z a C5, <i>Lactobacillus paraplantarum</i>	INRA		DON, FB ₁ , FB ₂ , ZEN	S
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> kmen GG, <i>Lactobacillus</i>	Valio Ltd.		AFB ₁ , ZEN,	S

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
	<i>rhamnosus</i> kmen LC-705				
	<i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. typhimurium</i>			AFB ₁	S
	<i>Eubacterium</i> sp. BBSH 797	Biomin Ltd.	Bachorová tekutina	T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 tetraol, T-2 triol, scirpentriol	S,P
	<i>Nocardia asteroides</i> <i>Mycobacterium fluoranthenivorans</i> sp. nov. <i>Rhodococcus erythropolis</i>			AFB ₁	S
	Směsná kultura (<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp. a <i>Pseudomonas</i> sp.)			ZEN	S
	<i>Curtobacterium</i> sp. strain 114-2			T-2 toxin	S
Vláknina	ADFIMAX®	REALDYME	Mletá vláknina - částice <100 μm	OTA	S,P
	<i>ToxTrap</i> ™ (vyvazovač na bázi vlákniny)	ABAC R&D Ltd.(CH)		OTA, ZEN, aflatoxiny	S,P
Ostatní polymery	Cholestyramin	Bristol-Myers Sigma Chemical		ZEN, FB ₁ , FB ₂ , OTA	S
	Antitox Vana (Polyvinylpyrrolidon)	Qualitech Products Inc.		DON	S
	Polyvinylpyrrolidon	Sigma Chemical	Skupenství: pevné; slabě běžový prášek	Aflatoxiny, ZEN	S
Enzymy	Proteasa A	Amano Inc.	<i>Z Aspergillus niger</i>	OTA	S
	Pankreatin	Biocatalysts	Prasečí slinivka	OTA	S
	Epoxidasa z <i>Eubacterium</i> BBSH 797			ZEN, OTA, DON	S,P
	Aflatoxin-detoxifizyme (ADTZ)		<i>Armillariella tabescens</i>	AFB ₁	S,P
	Laktanohydralasa		<i>Clonostachys rosea</i> IFO 7063	ZEN	S
Směsné komerční produkty	T5X®	Guyokrma - Evialis	Hlinitokřemičitany, buněčné stěny kvasinek		P
	Neutox	Kiotechagill	Směs aluminosilikátů, křemelina, čištěná frakce z buněčných stěn kvasinek,	Aflatoxiny, FB ₁ , OTA, ZEN, T-2	P

Kategorie absorbentu	Produkt	Výrobce	Fyzikálně-chemické vlastnosti	Cílené mykotoxiny	Uplatnění*
	M-TOX+	Iframix	propionová kyselina Organojily – montorillonit modifikovaný polysacharidy z řas (Almadeite® - Olmix, s.a.)	toxin Aflatoxiny, FB ₁ , OTA, ZEN, T-2 toxin	P
	Kombinace z <i>Eubacterium</i> BBSH 797 a <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	Biomin		OTA, ZEA	P
	Agrotox	Agromed GmbH (AT)	Složení není známo		P
	Mycofix®Plus	Biomin	38 % bentonit, 30 % inaktivované kvasnice, 25 % křemalína, 5 % šrot z mořských řas a 2 % bylinné komponenty.		P
	Elitox®	Impextraco	Směs chitosanu a HSCAS, doplněná nespecifikovanými enzymy, extrakty a vitamínem C.		P
	Myc-Met®	Matura Tech, Inc	Přečištěná mannanová frakce, β-1-3, 1-6 D–glukan, hlinotokřemičitan cholestiramin, trávící enzymy a kvasničný extrakt		P
	Ultrabond	Optivite, GB	Zřejmě hlinotokřemičitany s flavonoidy (ve formě extraktu)	AFB ₁ , ZEN, OTA, T-2, NIV. DON, FB1	P
	Zetox	Optivite, GB	Směsný produkt, nespecifikovaný vyvazovač, antimikrobiální extrakty, inhibitory plísní		P
	UT-Aflatrol	Ultra-Biologics Inc.	Obsahuje MOS a hlinotokřemičitany	AFB ₁ , T-2, DON	P
	Myc-Pro	Protocol technologies (TX, USA)	Směs MOS, hlinotokřemičitanů a fermentačních produktů kvasinek		P

*S, studie: výsledky byly publikovány formou studie, výrobek může být na trhu jako komerční produkt nebo jeho součást; pro reference <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/22e.pdf>;

P, je na trhu jako komerční produkt pro konečného spotřebitele;

Pozn.: tabulka není kompletní studií všech produktů na trhu, vznikla převzetím a rozšířením výše uvedeného zdroje

3 MIKROORGANISMY A JEJICH ROLE V ADSORPCI NEBO ENZYMATICKÉ DEGRADACI MYKOTOXINŮ

3.1 Adsorpce

Mezi organické agens s potenciálem mykotoxiny vázat a tím je odstraňovat z trávicího traktu organismu patří kvasinky a bakterie mléčného kvašení (BMK). Studie se zaměřují především na probiotické kmeny BMK (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*) a kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*). Několik desítek pokusů potvrdilo schopnost kvasinek a BMK vázat některé molekuly, jako jsou např. toxiny a ionty kovů prostřednictvím vazebných struktur na povrchu buněčných stěn (Shetty and Jespersen, 2006). Výhodou je, že se tyto mikroorganismy často přirozeně vyskytují jak v traktu zvířat, tak i ve fermentovaných potravinách a krmivech. Některé skupiny BMK jsou již dnes využívány jako aditiva a to především při silážování. Řada studií potvrzuje jejich účinek na dostupnost mykotoxinů, ale i dalších xenobiotik *in vitro* (Fazeli et al., 2009; Kolosova and Stroka, 2011).

Mikroorganismy jsou schopny snižovat toxický účinek mykotoxinů na organismus zvířete několika způsoby, jedním z nich je adsorpce. Adsorpce na povrch buněčné stěny je interakce mezi toxinem a funkčními skupinami na povrchu buňky, založené na fyzikální adsorpci, výměně iontů a komplexaci. Tyto interakce nejsou závislé na metabolismu buňky. Komponenty buněčné stěny zahrnují polysacharidy, proteiny a lipidy, které vytvářejí velkou i mezidruhovou variabilitu navzájem odlišných adsorpčních center na bázi různých vazebných mechanismů (vodíkové můstky, iontové a hydrofobní interakce) (Huwig et al., 2001).

3.1.1 Složení buněčných stěn kvasinek

Buněčné stěny *S. cerevisiae* představují asi 30 % celkové hmotnosti buňky. Strukturální část stěn kvasinek *S. cerevisiae* je tvořena (1→3)- β -D-glukanem a (1→6)- β -D-glukanem. Většina proteinu buněčných stěn (mannoproteinů) je s glukanem kovalentně spojena přes β -1,6-glukanové řetězce. Tyto proteiny jsou velice heterogenní skupinou glykoproteinů a je jich identifikováno asi 70. Sacharidová frakce tvoří asi 90 % mannoproteinů. 50 % z těchto sacharidů jsou mannanové oligosacharidy (MOS). Mannoproteinové jádro široce rozvětvují manosové postranní řetězce (spojené se zbytky asparaginu) a krátké výběžky a shluky oligomanosylových řetězců. Manosylové zbytky mohou být fosforylovány. Dalším důležitým rysem jsou fosfodiesterové můstky na manosylové straně řetězců, které přispívají k negativnímu náboji povrchu buněk. Buněčná stěna je vysoce dynamická struktura rychle

reagující na změny prostředí a stres (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003). Na základě chemického složení, a fyzikální podstaty buněčných stěn kvasinek *S. cerevisiae* je opodstatněné se domnívat, že buněčný povrch poskytuje nesčetné množství vazebných míst pro fyzikální adsorpci různorodých molekul (Shetty and Jespersen, 2006).

3.1.2 Složení buněčných stěn bakterií mléčného kvašení

Přestože jsou BMK poměrně heterogenní skupinou mikroorganismů, mají typickou buněčnou stěnu Gram-pozitivních bakterií, která je dosti odlišná od struktury buněčných stěn kvasinek *S. cerevisiae*. Buněčná stěna BMK je složena z peptidoglykanové matrix tvořící hlavní strukturální komponent, na který jsou vázány další komponenty jako teichoová kyselina a lipoteichoová kyselina, S-layer proteiny a neutrální polysacharidy. Tyto komponenty mají mnoho funkcí, jež zahrnují i adhezi a makromolekulární vazbu, tuto úlohu mají především fibrilární síť teichoové kyseliny a neutrální polysacharidy (Shetty and Jespersen, 2006). Na základě experimentů se předpokládá, že ve vazbě toxinu hrají důležitou roli hlavně peptidoglykan a polysacharidy (Zhang and Ohta, 1991). Nedávné studie ukázaly, že přestože hlavní roli ve vazebném procesu hrají, peptidoglykan a polysacharidy, role proteinů se také jeví jako významná (Haskard et al., 2000). Nedávné studie naznačily možnost, že jak vazba mykotoxinu tak adheze mikroorganismu na střevní mukózu využívají stejná vazebná místa. V pokusu, kdy byly inkubovány nejdříve se střevní mukózou a poté s aflatoxinem (či naopak), byla ovlivněna následná vazebná schopnost mikroorganismů (Gratz et al., 2004).

Literatura o mechanismu vazby různých mykotoxinů na buněčnou stěnu a o podstatě tohoto komplexu je stále omezená, především u *S. cerevisiae*. Dostupné zdroje naznačují, že na vazbě toxinu, a to jak u BMK, tak u kvasinek, se podílí polysacharidová část buněčné stěny. Je složité porovnávat vazby obou těchto mikroorganismů s mykotoxiny, neboť dosud neexistuje srovnávací studie těchto interakcí. Nicméně, základní rozdíly ve struktuře jejich buněčných stěn naznačují možnost rozdílné schopnosti vazby, z hlediska její kapacity i síly. Dále je také zapotřebí dalších studií odhalujících podstatu vazby, především za podmínek v gastrointestinálním traktu (Shetty and Jespersen, 2006).

3.1.3 Požadavky na vlastnosti mikrobiálních vyvazovačů

Vyvazovač musí být schopný efektivně odstraňovat jednotlivé mykotoxiny pro které je určen. V některých případech je výhodné, pokud je adsorbent specifický vůči jednomu mykotoxinu, naopak v jiných je cílem co nejširší spektrum účinku. Adsorbent (vyvazovač), by měl významně zabraňovat toxickému účinku látek na zvíře a neměl by mít žádné vedlejší účinky, nebo by přinejmenším měly pozitivní účinky převážet ty negativní. Cena musí být dostatečně nízká, aby umožnila praktické využití. Rezidua mykotoxinu, která zůstala ve zvířecích tělech po použití adsorbentu, by neměla mít negativní vliv na potravinářské

produkty. Mykotoxiny v krmivech by těmito adsorbenty neměly být maskovány, tak aby byla znemožněna jejich detekce. Adsorbenty by měly být takové povahy, aby byla možná jejich fyzikální použitelnost a jejich komerční výroba. Použití a úspěšnost těchto látek by měla být ověřitelná. Vazba mezi adsorbentem a mykotoxinem by měla být velmi silná, tak aby nebylo možné její vymytí, či její rozpojení po interakci s jinými látkami, např. živinami. Důležitým kritériem je úspěšnost adsorbentů při různém pH (především kyselém a neutrálním), neboť adsorbent by měl být schopen vázat mykotoxin po celé délce trávicího traktu. Adsorbent by měl vyvazovat pouze látky, pro které je určen tak, aby nedocházelo k odstranění i některých esenciálních živin (Jard et al., 2011).

3.1.4 Mikrobiální adsorpce aflatoxinů

Fruhauf et al. (2012) porovnávali 30 komerčně dostupných produktů s obsahem buněčných stěn kvasinek a jejich schopnost vázat AFB₁ a ZEN v roztocích s rozdílným pH (pH 3,0 a pH 6,5) a v žaludeční šťávě. Vazebná schopnost korelovala s obsahem popelovin v těchto přípravcích. Naopak nekorelovala s obsahem mannooligosacharidů (MOS) ani β-glukanů. Produkty s obsahem popelovin vyšším než 30 % vykazovaly vazebnou schopnost AFB₁ vyšší než 90 % alespoň v jednom z roztoků. U zearalenonu také nenalezli korelaci mezi vyvazovací schopností a obsahem MOS a β-glukanů. Avšak nejnižší úspěšnost našli u produktů s obsahem MOS a β-glukanů menší než 10 % naopak nejvyšší u produktů s obsahem těchto látek vyšším než 50 %.

Jeden z mála pokusů *in vivo* provedli Haouthout et al. (2011). Šedesáti potkanům podávali roztoky s *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus reuteri* v dávkách 10 ml/kg ž. hm. a krmivo kontaminované aflatoxiny (3 mg/kg krmiva po čtyři týdny). U skupiny potkanů s krmivem s aflatoxiny (bez BMK) byl zjištěn významný pokles příjmu krmiva a snížení tělesné hmotnosti. Dále u této skupiny významně poklesla antioxidační kapacita sledovaná rozbořením biochemických parametrů z krve. *Lactobacillus reuteri* byl ve snižování toxického efektu mykotoxinů účinnější než *Lactobacillus casei*.

V pokusu Pizzolitta et al. (2012a) autoři sledovali schopnost čtyř kmenů *S. cerevisiae* izolovaných z výkalů brojlerů vázat AFB₁. Také sledovali schopnost těchto kvasinek přežít za podmínek podobných prostředí v zažívacím traktu a za zvýšené slanosti. Nejlépe toxin adsorbovaly kmeny *S. cerevisiae* 08 a 01. Tato schopnost byla ovlivněna koncentrací mykotoxinů i množstvím kvasinek. V testovaných prostředích nejlépe přežívaly kvasinky *S. cerevisiae* kmene č. 08, a to až s 98 % úspěšností, a *S. cerevisiae* kmene č. 01 s úspěšností

75 %. Podle autorů je kvasinka *S. cerevisiae* 08 nejlepším kandidátem pro budoucí *in vivo* studie zabývající se snižováním účinků AFB₁.

Velmi zajímavou studii uspořádali Dogi et al. (2011), kteří testovali schopnost různých kmenů *S. cerevisiae* vázat AFB₁ za podmínek podobných trávicímu traktu přežvýkavců. Také sledovali životaschopnost těchto kmenů kvasinek v tomto prostředí a jejich účinek na bachorovou fermentaci. Všechny kmeny kvasinek byly schopny vázat AFB₁ a přežít při různých pH. Nejlepší schopnost vázat AFB₁ prokázal kmen *S. cerevisiae* RC016 při všech třech testovaných pH. Kmeny *S. cerevisiae* RC008 a RC016 zvyšovaly počty celulólytických bakterií v bachorové tekutině, tyto kmeny také zvyšovaly tvorbu kyseliny octové a propionové při fermentaci. Další příklady adsorpce aflatoxinu prostřednictvím mikroorganismů viz Tab. 10.

Tab. 10: Vazba/adsorpce aflatoxinu prostřednictvím mikroorganismů

Mikroorganismus	Aflatoxin	Vazba (%)	Podmínky
Bakterie			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LBGG), <i>L. rhamnosus</i> (LC-705)	AFB ₁	80	2x10 ¹⁰ CFU/ml, 0 h, 37 °C, tekuté médium
<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. bifidum</i>	AFB ₁	20–50	3 h
<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>Propionibacterium freudereichii</i> spp <i>Shermanii</i> JS LC705	AFB ₁	74, 63, 37	10 ¹⁰ CFU/ml, 1 h, 37 °C, in vitro, kuřecí duodenum
<i>Lactobacillus</i> sp. a <i>Propionibacterium</i> sp. (směs)	AFB ₁	57–66, 25	10 ¹¹ CFU/ml, 30–60 min., 37 °C, PBS ¹ , kuřecí duodenum
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp.	AFB ₁	5,6–59,7	10 ¹⁰ CFU/ml, 24 h, 37 °C, PBS
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactococcus</i> sp.	AFM ₁	18–62, 19–70	10 ¹⁰ CFU/ml, 16 h, 37 °C, PBS, nízkotučné a plnotučné mléko
<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp.	AFM ₁	25,7–32,5, 21,2–29,3	24 h, 37 °C, PBS, nízkotučné mléko
<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	AFB ₁	25–61	2x10 ¹⁰ CFU/ml, 72 h, 37 °C, tekuté médium
<i>Enterococcus faecium</i> M74 a EF031	AFB ₁	19,3–37,5	10 ¹⁰ CFU/ml, 48 h, pH 7,0, tekuté médium
<i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Selangorensis</i> sp., <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Weissella confusa</i>	AFB ₁	15–60	10 ⁹ CFU/ml, 72 h, 25 °C, roztok PBS
Kvasinky			
<i>S. cerevisiae</i>	AFB ₁	40	10 ⁷ CFU/ml, 1 h, 37 °C, roztok PBS
<i>Saccharomyces</i> sp. a <i>Candida</i> sp.	AFB ₁	15–60	10 ⁸ CFU/ml, 72 h, 25 °C,

Mikroorganismus	Aflatoxin	Vazba (%)	Podmínky
<i>S. cerevisiae</i> (komponent buněčných stěn – esterifikovaný glukomanan EGM)	AFB ₁	81,6	roztok PBS 3 h, 37 °C, pH 4,5, kontaminované krmivo, 0,1 % EGM
<i>S. cerevisiae</i>	AFB ₁	10–40	10 ⁹ CFU/ml, 12 h, 25 °C, roztok PBS

(Guan et al., 2011)

3.1.5 Mikrobiální adsorpce trichothecenů

El-Nezami et al. (2002b) testovali schopnost *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705 a *Propionibacterium freundenreichii* ssp. *schermanii* JS zachytit trichotheceny z kapalného media. Sledovali deoxinivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, nivalenol, fusarenol, diacetoxyscirpenol, T-2 toxin a HT-2. V pokusech byly použity, jak živé, tak tepelně usmrcené BMK. Autoři demonstrovali schopnost BMK odstraňovat trichotheceny (20 µg/ml). Tato schopnost závisela na kmeni bakterie a na množství toxinu. Živé i usmrcené bakterie kmene *L. rhamnosus* GG měly větší úspěšnost vyvazování než kmen *L. rhamnosus* LC705. Nejúčinnější kmeny bakterií byly schopny vyvazovat čtyři ze sedmi testovaných toxinů. Účinnost vyvazování se pohybovala mezi 18 a 93 %. Žádný kmen BMK nebyl schopen vyvazovat 3-acetyldeoxynivalenol. HT-2 byly schopny vyvazovat pouze deaktivované bakterie kmene *L. rhamnosus* GG a LC705.

3.1.6 Mikrobiální adsorpce zearalenonu

Long et al. (2012) porovnávali schopnost osmi kmenů BMK izolovaných z bacheru vázat zearalenon *in vitro* v MRS (de Man, Rogosa a Sharpe) médiu. Schopnost vyvazovat toxin u těchto kmenů kolísala od 25,64 % do 69,33 %. Nejvyšší schopnost vyvazovat toxin byla prokázána u *L. mucosae* 1m4208. Adsorpce byla ovlivněna délkou kultivace, pH a teplotou. Schopnost adsorpce byla snížena při kultivaci s žaludeční a střevní šťávou, avšak stále zůstávala na vysoké úrovni.

El-Nezami et al. (2002a) testovali schopnost *L. rhamnosus* GG a *L. rhamnosus* LC705 vyvazovat zearalenon a jeho derivát α -zearalenon z tekutého média. Bylo navázáno významné množství obou toxinů (38 a 46 %) bakteriálními peletami. Dále nebyly nalezeny žádné produkty degradace zearalenonu a α -zearalenonu po třech dnech inkubace. Vazby byly schopny jak bakterie ošetřené teplotou tak kyselinou. Což naznačuje, že toxin nebyl odstraněn metabolickou cestou. Proces byl rychlý a závisel na množství buněčných stěn a koncentraci

toxinu. Společná inkubace mikroorganismů se zearalenonem a α -zearalenon snížila procento vazeb u obou látek, což naznačuje, že se oba toxiny váží na stejná vazebná místa.

Nieder Korn et al. (2008) sledovali stabilitu vazby mezi BMK *Streptococcus thermophilus* RAR1 a zearalenonem v bacherové tekutině a v prostředí, které simulovalo podmínky v trávicím ústrojí. Po 18 hodinové inkubaci v bacherové tekutině zůstalo 70 % vazeb zachováno. Po další inkubaci spolu s pepsinem, lysozymem, pankreatickou šťávou a žlučí, zůstalo zachováno 50 % původních vazeb, nehledě na to zda byl komplex inkubován dohromady s těmito látkami či postupně.

3.1.7 Mikrobiální adsorpce ochratoxinu A

Piotrowska a Zakowska (2005) sledovaly 29 kmenů BMK patřící do rodů *Lactobacillus* a *Lactococcus* a jejich schopnost vyvazovat OTA z kapalného media. Všechny testované kmeny byly schopny vyvazovat OTA a většina z nich byla necitlivá vůči toxicitě OTA. Nejvyšší schopnost adsorpce, více než 50 %, vykazoval *L. acidophilus* CH-5, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* BS, *L. brevis* a *L. sanfranciscensis*. (Tab. 11).

Tab. 11: Pokles množství ochratoxinu A při *in vitro* testu adsorpce na vybrané kmeny

Mikroorganismus (druh)	Kmen	Pokles koncentrace ochratoxinu A (%)	Mikroorganismus (druh)	Kmen	Pokles koncentrace ochratoxinu A (%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CH-2	45,1 ± 0,72	<i>Lactobacillus casei</i>	B	11,5 ± 0,44
	A92	50,2 ± 0,62		150	29,8 ± 0,30
	CH-5	70,5 ± 0,98		18H	5,7 ± 0,44
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	J7	5,9 ± 0,62	<i>Lactococcus lactis</i>	18 cz	16,6 ± 0,46
	P7	34,3 ± 0,46		168	16,8 ± 0,62
	171 ₂	9,6 ± 0,26		CZ	45,7 ± 0,26
	SL	28,3 ± 0,53		147	21,0 ± 0,53
<i>Lactobacillus helveticus</i>	8	67,1 ± 0,46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8FD	7,8 ± 0,61
	D (a)	11,9 ± 0,44		202	59,6 ± 0,44
	3035	17,0 ± 0,26		B 1074	11,9 ± 0,75
	E 8	31,0 ± 0,36		B 1149	35,5 ± 0,46
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BS	56,2 ± 0,72	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	BS	56,2 ± 0,72
	GG	87,5 ± 0,66		BS	52,0 ± 0,53

(Piotrowska and Zakowska, 2005)

Piotrowska (2012) sledovala schopnost buněk *S. cerevisiae* vázat OTA. Živé a tepelně inaktivované buňky inkubovala v PBS s ochratoxinem A. Poté měřila metodou HPLC rezidua toxinu v supernatantu. Buňky navázaly 20 % toxinu při koncentraci 1 mg sušiny v biomase (buněk) na ml, 29 % při 5 mg/ml a 75 % při 50 mg/ml. Také prokázala, že tepelně inaktivované buňky odstraňovaly z roztoku větší množství mykotoxinu než buňky živé. Proces adsorpce byl velmi rychlý, za 30 minut po smíchání buněk s toxinem hladiny toxinu výrazně poklesly. Komplex OTA s inaktivovanými buňkami byl méně pevný než s živými. Adsorpce toxinu je ve vztahu k zastoupení buněčných stěn kvasinek, protože buňky bez buněčných stěn (protoplast) ztrácely schopnost adsorpce OTA.

Armando et al. (2012), zkoumali schopnost různých kmenů kvasinek *S. cerevisiae* vyvazovat ochratoxin A a zearalenon. Dále sledovali vztah mezi tloušťkou buněčné stěny a detoxikační schopností kvasinek. Byla porovnávána schopnost vázat toxin při různých koncentracích toxinu a dále byl sledován efekt za simulovaných gastrointestinálních podmínek. Všechny sledované kmeny potvrdily schopnost odstraňovat OTA a ZEN. Kmeny *S. cerevisiae* RC012 a RCO16 vykazovaly nejvyšší procento navázaného toxinu OTA a kmeny RC009 a RC012 nejvyšší schopnost vyvazovat ZEN. Autoři také prokázali pozitivní korelaci mezi množstvím buněčné stěny a schopností vyvazovat mykotoxiny (Tab. 12).

Tab. 12: Schopnost vybraných kmenů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* vázat ochratoxin a zearalenon

Mykotoxin (koncentrace)	Kmen kvasinek <i>S. cerevisiae</i> a množství navázaného toxinu (%)			
	RC008	RC009	RC012	RC016
OTA (1 µg·ml ⁻¹)	46,0	43,0	63,0	74,0
OTA (5 µg·ml ⁻¹)	16,0	16,0	39,2	30,4
OTA (10 µg·ml ⁻¹)	14,5	49,4	56,4	58,0
OTA (40 µg·ml ⁻¹)	17,9	37,3	39,2	39,2
OTA (100 µg·ml ⁻¹)	56,7	67,2	71,2	74,2
ZEN (1 µg·ml ⁻¹)	48,0	85,0	87,0	53,0
ZEN (5 µg·ml ⁻¹)	56,6	72,8	78,0	60,6
ZEN (10 µg·ml ⁻¹)	56,7	67,2	71,2	74,2
ZEN (20 µg·ml ⁻¹)	61,7	64,1	52,0	51,7
ZEN (50 µg·ml ⁻¹)	41,1	66,8	58,4	68,7

(Armando et al., 2012)

Dalšími, kdo sledovali schopnost BMK vyvazovat OTA byli Fuchs et al. (2008). Z třiceti sledovaných kmenů testovaných v bujónu nejlépe vyvazoval kmen *Lactobacillus acidophilus* VM 20, a to s úspěšností přesahující 95 %. Vliv na procento vazeb měly koncentrace toxinu, počtu buněk, pH a životaschopnost bakterií (Fuchs et al., 2008).

3.1.8 Mikrobiální adsorpce fumonisinů

Nieder Korn et al. (2006) byl první, kdo testoval *in vitro* interakce mezi fumonisiny, deoxynivalenolem a BMK. Schopnost 29 kmenů BMK a tří kmenů *Propionibacterium* odstraňovat FB₁, FB₂ a DON z okyseleného MRS bujónu (pH 4,0) byla potvrzena. FB₂ byl odstraňován s větší úspěšností. Většina z kmenů byla schopna odstraňovat všechny tři toxiny, avšak mezi kmeny byly nalezeny významné rozdíly ve schopnosti vázat mykotoxiny. Obecně lze říci, že *Propionibacterium* sp. byl méně úspěšný než BMK. Vazebná schopnost byla ovlivněna pH a to pouze u fumonisinů. Při pH 7 BMK nebyly schopny vychytávat FB₁ a FB₂ (viz Tab. 13).

Tab. 13: Adsorpce/odstranění (%) deoxynivalenolu a fumonisinů živými bakteriemi z média

BMK	číslo	Deoxynivalenol			Fumonisinů	
		DON (%)	FB ₁ (%)	FB ₂ (%)	FB ₁ (%)	FB ₂ (%)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ATCC53103	54 ± 3	74 ± 1	94 ± 0		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	R0011	30 ± 4	67 ± 0	87 ± 0		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	R1039	40 ± 4	61 ± 1	92 ± 0		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	R1012	20 ± 0	74 ± 2	91 ± 0		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	R1027	23 ± 0	74 ± 1	92 ± 1		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	R1051	13 ± 1	72 ± 2	97 ± 0		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	R1096	19 ± 2	74 ± 1	97 ± 0		
<i>Lactobacillus brevis</i>	R0002	32 ± 1	ND	82 ± 3		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	R0052	34 ± 1	54 ± 3	78 ± 1		
<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>bulg.</i>	R0149	55 ± 1	72 ± 1	95 ± 0		
<i>Lactobacillus reuteri</i>	R0365	22 ± 3	35 ± 2	81 ± 1		
<i>Lactobacillus buchneš</i>	R1102	19 ± 1	ND	57 ± 5		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	46	ND	51 ± 1	92 ± 0		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	72	21 ± 1	51 ± 7	81 ± 1		
<i>Lactobacillus jugurti</i>	63	19 ± 0	14 ± 3	32 ± 4		
<i>Lactobacillus lactis</i>	170	27 ± 3	52 ± 2	81 ± 2		
<i>Lactobacillus casei</i> spp. <i>Casei</i>	C3	36 ± 1	65 ± 1	90 ± 2		
<i>Pediococcus acidilactici</i>	R1001	ND	57 ± 2	87 ± 0		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	R1044	ND	79 ± 1	92 ± 0		

BMK	číslo	Deoxynivalenol	Fumonisinů	
		DON (%)	FB ₁ (%)	FB ₂ (%)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	R1018	31 ± 3	ND	91 ± 0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NG40Z	22 ± 3	ND	83 ± 2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	B5	37 ± 0	ND	95 ± 0
<i>Lactococcus lactis</i>	CS 43	23 ± 1	ND	100 ± 0
<i>Lactococcus lactis</i>	CS 202	40 ± 5	ND	100 ± 0
<i>Lactococcus lactis</i>	CS 197	23 ± 1	ND	100 ± 0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	R1107	46 ± 1	82 ± 0	96 ± 0

(Niderkorn et al., 2006); ND = nejsou data

Cílem studie Pizzolitta et al. (2012) bylo ověřit schopnost kvasinek *S. cerevisiae* CECT 1891 a bakterií *Lactobacillus acidophilus* 24 odstraňovat FB₁ z tekutého prostředí. Dalšími cíli bylo objasnit podstatu vazby mezi FB₁ a mikroorganismy, určit, zda přidání AFB₁ ovlivňuje tuto vazbu a prověřit stabilitu vazby. Procento adsorpce bylo podobné při všech testovaných koncentracích: ~60 % u kvasinek a ~20 % u bakterií. Rozdílná úroveň vazeb poukazuje, podle autorů, na specifickou podstatu vazeb u jednotlivých mikroorganismů. Vznik vazby byl velmi rychlý, protože po 1 minutě byl počet navázaného mykotoxinu stejný jako po 4,5 hodinách. Po usmrcení buněk (teplotou) stoupla vazebná kapacita bakterií 2× a kvasinek 1,5×. Množství navázaného FB₁ záviselo na koncentraci mikroorganismů. Stabilita vazby testovaná promýváním acetonitrilem byla u laktobacilů 50 %, a u kvasinek 20–25 % původně navázaných vazeb, při promývání fosfátovým pufrům bylo uvolněno 10 % vazeb s bakteriemi a 5 % vazeb s kvasinkami. Při společném podání FB₁ a AFB₁ nebylo procento vytvořených vazeb ovlivněno ani u jednoho mykotoxinu jak u kvasinek, tak u bakterií. To naznačuje, že oba toxiny zřejmě využívají rozdílná vazebná místa. Po navázání se nezměnila chemická struktura molekul FB₁ a zůstala také zachována strukturální integrita buněčných stěn mikroorganismů.

3.2 Enzymatická transformace mykotoxinů

Omezení vyplývající z použití metod chemických a fyzikálních logicky přivádí k myšlence eliminace mykotoxinů biologicky, enzymatickým rozkladem s pomocí čistých izolátů mikroorganismů nebo z nich purifikovanými enzymy. Řada mikroorganismů patřících mezi bakterie, vláknité houby nebo kvasinky má schopnost biotransformace mykotoxinů a mnohé z nich jsou součástí trávicího traktu živočichů.

3.2.1 Transformace aflatoxinů

Eliminace a transformace AFB₁ je předmětem stovek studií, bohužel v poslední době byl nalezen produkt této transformace, který je stále metabolicky aktivní. Jeden z prvních mikroorganismů, u něhož byla tato transformace studována je *Flavobacter aurantiacum* (synonymum *Nocardia corynebacteroides*). Sumární extrakt z něj eliminoval AFB₁ (Ciegler et al., 1966). Line et al. (1994) a Lillehoj et al., (1967), ale i další týmy došly k názoru, že této transformační aktivity byly schopny pouze živé buňky, buněčné lyzáty nebo teplem inaktivované buňky, vázaly pouze část AFB₁ nespecificky na buněčnou stěnu. Je tedy zřejmé, že na této aktivitě se podílejí enzymy (Smiley and Draughon, 2000). Podobně izoláty *Stenotrophomonas maltophilia*, které byly kultivovány na mediu obsahujícím pouze kumarin jako zdroj uhlíku (chemická složka AFB₁ molekuly) ukázaly, že jsou schopny transformace AFB₁ (Guan et al., 2008). Kmen *Bacillus subtilis* DB-9111 byl patentován jako kmen s potenciálem snižovat dopad AFB₁ v krmivu u hospodářských zvířat (Kubo, 1996). *Bacillus subtilis* je kmen také potenciálně perspektivní jako vyvazovač mykotoxinů. Bylo provedeno několik screeningových studií a byly izolovány kmeny *B. subtilis* s nejvyšší enzymatickou aktivitou proti AFB₁. Zajímavé je, že ty s vysokou aktivitou vykazovaly rovněž enzymovou aktivitu vedoucí k degradaci OTA. Jiné kmeny měly ale aktivitu selektivní proti i jen jednomu z testovaných mykotoxinů (Petchkongkaew et al., 2008). Aktinomycety, jako *Mycobacterium fluoranthenivorans* byly schopny *in vitro* degradovat AFB₁ (Hormisch et al., 2004; Teniola et al., 2005). Zhao et al. (2011) izoloval 32 kDa enzym z *Myxococcus fulvus* se schopností degradovat AFB₁, AFG₁ a AFM₁. I nepřečištěný supernatant z kultury měl stejnou, jen o něco nižší schopnost. Jsou známy extracelulární enzymy z makroskopické houby *Pleurotus ostreatus*, které otevírají laktonový kruh aflatoxinů, čímž významně redukuje jejich toxicitu (Motomura et al., 2003). Oproti tomu enzym z *Armillariella tabescens* otevírá difuranový kruh (Liu et al., 1998).

3.2.2 Transformace OTA

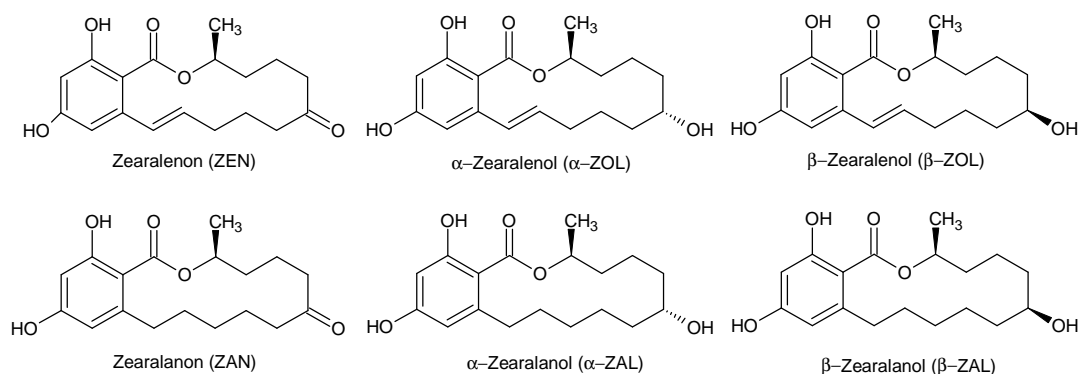
Některé bakterie, plísně, kvasinky, ale i rostliny jsou schopny transformovat OTA a mnohé z nich tak činí přeměnou OTA na mnohem méně toxický OTα (Jard et al., 2011). *Aspergillus niger* možná rozkládá OTA na jiný produkt než OTα, ale metabolická dráha k rozkladu OTA prostřednictvím otevření isokumarinového kruhu není známa. Byla zkoumána OTA detoxikace prostřednictvím netoxigenního *A. niger* 120.49 a izolátů *Rhizopus* sp. a bylo shledáno, že kmen *A. niger* byl schopen eliminovat OTA z tekutého i pevného media a degradační produkt OTα byl následně také rozložen. Mezi další plísně schopné této

enzymatické degradace patří *Penicillium* sp. (Jard et al., 2011). *Aureobasidium pulluans* byl doporučen jako kmen v enologii pro zabránění OTA kontaminace vína (De Felice et al., 2008). Podobně i makroskopická houba *P. ostreatus* je schopna katalyzovat transformační reakci, ale není zatím znám degradační produkt, ani jeho toxicita. *Trichosporon mycotoxinivorans* je mikroorganismus, který byl použit pro formulaci přípravku na snížení OTA v krmivech (Molnar et al., 2004). Karboxypeptidasy (EC 3.4:17.1) jsou hlavními enzymy hub podílejícími se na přeměně OTA na OTa a existuje celá řada i komerčně využívaných karboxypeptidáz (Varga and Toth, 2005).

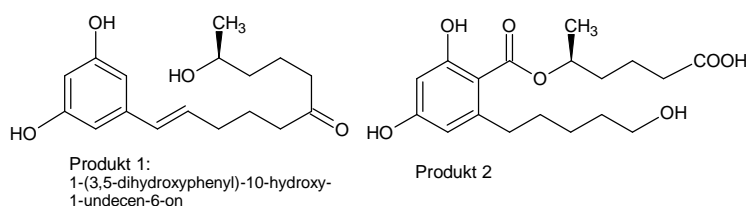
3.2.3 Transformace ZEN

Zearalenon (ZEN) může být mikrobiálně transformován na zearalanon (ZAN) dále na hydroxylované produkty odvozené od obou těchto struktur – zearalenoly (α -, β -ZOL) a zearalanoly (α -, β -ZAL). Mimo to mohou být tyto struktury na některé z pozic enzymaticky hydroxylovány, nebo dochází k substituci benzenového jádra methoxy-skupinami. Častým produktem mikrobiální degradace mohou být sulfo- a gluko-sulfo-konjugáty (Jard et al., 2011). To jsou i meziproducty jeho detoxikačního metabolismu u savců, přičemž α -ZAL má o dva řády vyšší afinitu k ER- α a ER- β než původní nativní ZEN ($EC_{50} = 0.49$ nM pro α -ZAL a 11,8 nM u ZEN v případě ER- α . OH-deriváty naproti tomu aktivitu ztrácí (Tabulka při obrázku 1; Bravin et al., 200).

Nejčastější metabolity zearalenonu



Další produkty metabolity bez estrogenní aktivity



substrát	relativní estrogenní aktivity
ZEN	1
α -ZOL	92
β -ZOL	0,44
ZAN	2,5
α -ZAL	18
β -ZAL	3,5

Obr. 1: Metabolity zearalonu podle Bravin et al. (2009) a Vekiru et al. (2010), relativní estrogenní aktivita podle (Shier et al., 2001).

Transformace ZEN na ZOL a ZAL některými plísněmi není detoxikace, neboť tyto produkty mají estrogenní aktivitu často vyšší než ZEN (Minervini et al., 2005; Vekiru et al., 2010). Zearalenonesterasa je enzym, který ale degraduje ZEN na neaktivní neestrogenní metabolity a byla identifikována sekvence genů z rodů *Rhodococcus* a *Nocardia* kódující dekarboxylaci ZEN na produkt 1 (Obr. 1). Ta byla patentována již dříve pro účely genetické modifikace kukuřice a vytvoření transgenní kukuřice (Duvick and Rood, 1999). *Trichosporon mycotoxinivorans* je další houba schopná detoxikovat ZEN (Produkt 2, Obr. 1; Vekiru et al., 2010). Sulfonace ZEN vede rovněž ke ztrátě estrogenní aktivity (Jard et al., 2011), totéž ale není jisté pro glykosilaci ZEN, kterou katalyzují některé mikrobiální enzymy. Glykosilovaný ZEN může být v trávicím traktu hydrolyzován glykosidasami.

Dokonce některé rostliny mají schopnost glykosilace mykotoxinů přirozeně a prostřednictvím glykosilace ZEN „maskují“ a ten je pak špatně detekovatelný konvenčními metodami. Glykosilovaný ZEN je ale v traktu zvířat opět aktivován (Berthiller et al., 2006).

Takahashi-Ando et al., (2002) izolovali laktonohydrolasu z *Clonostachys rosea* IFO 7063. Tento 30 kDa dimer označený jako ZHD101 je aktivní při pH 7 s optimem pH 9–10. Autoři této studie jej dále použili pro vytvoření transgenní *E. coli*, pšeničného kalusu a *S. cerevisiae*.

U této GM-modifikované transgenní *S. cerevisiae* detoxikace ZEN a jeho metabolitů nebyla 100% účinná, zejména její činnost ovlivňovala přítomnost jiných neidentifikovaných reduktasových aktivit, které vedly k hromadění hlavního stále velmi estrogenního metabolitu β -ZOL (Takahashi-Ando et al., 2004). Stejný tým vytvořil transgenní kukuřici s genem pro expresi výše zmíněné značené laktonohydrolasy z *C. rosea*. Semena této kukuřice mají ZEN-degradující aktivitu a účinnost degradace je až 24 μ g ZEN/g semen po dobu 48 h. Degradace je téměř 100% a obsah ZEN v transgenních semenech byl na hladině negativní kontroly. Experiment byl proveden *in vivo*, semena byla nabobtnána ve vodním roztoku s obsahem ZEN a následně analyzována (Igawa et al., 2007).

Zajímavé výsledky byly zjištěny při porovnávání úrovně zamoření mykotoxiny konvenční a Bt-transgenní kukuřice. I přes variabilitu počasí a klimatu v jednotlivých lokalitách bylo zjištěno, že Bt-kukuřice MON 810 obsahovala v průměru o 90 % méně fumonisinu, 50 % zearalonu a DON byl mírně vyšší. Autoři vyslovili domněnku, že se na kukuřici lépe prosazují kmeny vytvářející trichotheceny nad fumonisin -produkcí

fusariemi (Folcher et al., 2010). Tato aktivita může být nespecifická a možná souvisí s nižším poškozením bodavým a savým hmyzem, které způsobuje poranění pletiv a je vstupní branou pro mikroorganismy (Varga and Toth, 2005).

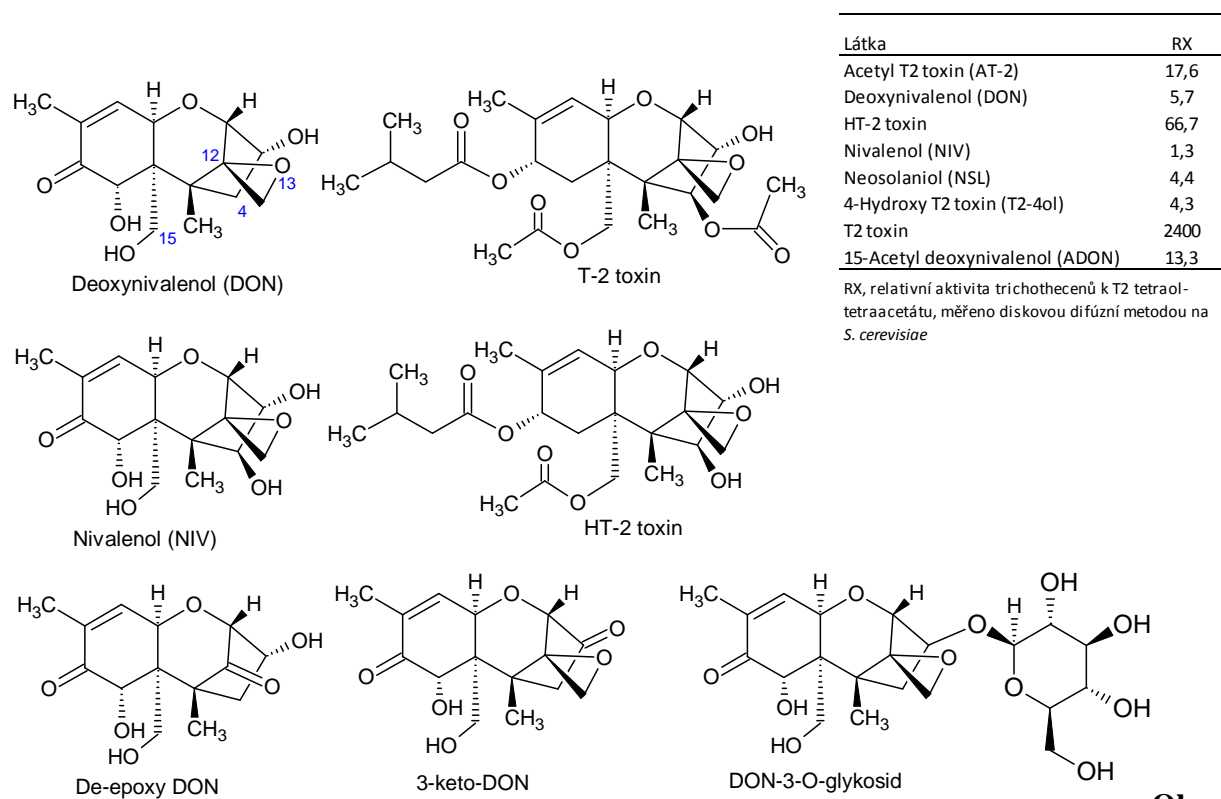
Půdní bakterie *Pseudomonas putida* kmen ZEA-1 také vytváří enzym efektivní v degradaci ZEN. Byl identifikován gen zodpovědný za tuto aktivitu a přenesen do *E. coli*, kde docházelo k jeho expresi a vzniklá rekombinantní *E. coli* byla pak schopna totální degradace ZEN v médiu. Optimum aktivity enzymu bylo pH 7–8, kdy produkt vykazuje nižší toxicitu a estrogení efekt, struktura produktu ale zatím není známa (Altalhi and El-Deeb, 2009). Degradace ZEN byla zjištěna i u nepatogenního kmene *Rhodococcus pyridinivorans* K408, mechanismus a produkt je opět nejasný, ačkoliv nemá estrogení aktivitu (Kriszt et al., 2012). Mimo zmíněné, jsou známy i další mikroorganismy se schopností rozkládat ZEN. Opět často platí, že produkty reakce nejsou známy. Přehled o tom podávají review (Jard et al., 2011; Karlovsky, 1999).

3.2.4 Transformace trichothecenů

Transformace trichothecenů byla nedávno podrobně popsána v review (He et al., 2010). Trichotheceny jsou chemicky nejrozmanitější skupinou mykotoxinů. Jsou to tricyklické seskviterpeny s bazickým 12,13-epoxy-9- trichothecenem. Nejvýznamnějšími jsou T-2 toxin, HT-2 a DON. 12,13-epoxy kruh je z části zodpovědný za jejich toxicitu, pokud je otevřen tak toxicita významně klesne. Rozhodující pro toxicitu je ale acetyl na pozici C-4 a C-15 (Madhyastha et al., 1994).

Některé studie uvádí možnosti transformace DON směsnými kulturami mikroorganismů, ale je známo jen několik produktů této degradace. Mezi nimi je to de-epoxidovaný DON a 3-keto-DON. Oba jsou méně toxické než DON (Jard et al., 2011). Firma Biomin má zaregistrovaný kmen *Eubacterium* sp. DSM 11798 (kmen BBSH 789), který je součástí produktu Mycofix plus. Enzym je znám také jako MDE – mycotoxin-degrading enzyme. Jedná se o kmen schopný degradovat ZEN a DON a to na principu de-epoxidace (metabolit na Obr. 2), byl prvně izolovaný, patentován a publikován Binderem *et al.*, z kravského bacheru (Binder et al., 1997), je schopen de-epoxidace trichothecenů A i B, tedy DON i T-2 toxin *in vitro*. Stejná aktivita byla pozorována v prasečím tenkém střevě (Schatzmayer et al., 2006). Až později byla tato aktivita identifikována i u jiných mikroorganismů, např. *Bacillus* sp. LS100 a S 33 a dalších izolátů z kuřecího tenkého střeva (Li et al., 2011a; Young et al., 2007).

U neacetylovaných trichothecenů dochází téměř beze zbytku k de-epoxidaci, u acetylovaných je to rozmanitější. U HT-2 převažuje de-epoxidace, zato T-2 toxin a další více acetylované trichotheceny mají převažující deacetylaci jako hlavní detoxikační reakci (Young et al., 2007). Yu et al. (Yu et al., 2010) nedávno publikovali studii, kde popisuje izolaci 10 kmenů s de-epoxidační aktivitou z drůbežích střev. Ty byly identifikovány metodu DGGE-PCR a zařazeny do 4 skupin mikroorganismů: *Clostridiales* sp., *Anaerofilum* sp., *Collinsella* sp. a *Bacillus* spp. I některé další mikroorganismy izolované z půdy jsou schopny kompletní deacetylace na T-2 triol a následně i T-2 tetraol, kdy jsou odštipnuty 4 hlavní acetyly. Už meziprodukt T-2 triol má aktivitu 20× nižší než T-2 toxin. HT-2 toxin má aktivitu také nižší než T-2 toxin (tabulka v Obr. 2; Jard et al., 2011).



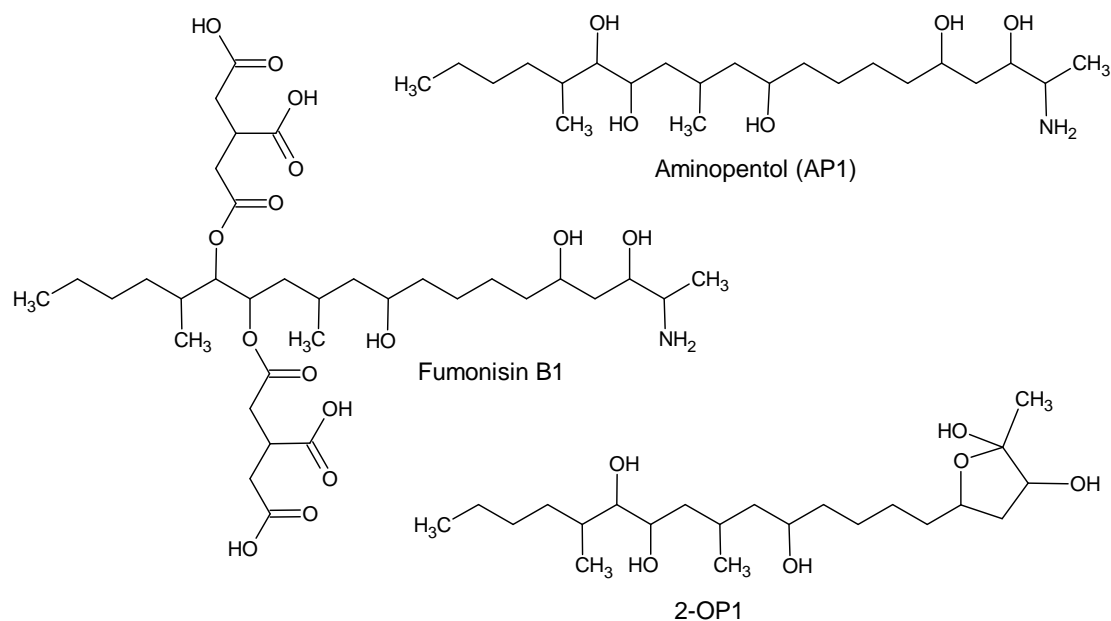
Obr.

Obr. 2: Struktury nejběžnějších trichothecenů a tabulka hodnot jejich relativní toxicity proti *S. cerevisiae*

3.2.5 Degradace fumonisinů

Fumonisinů jsou strukturálně podobné sfingolipidům, inhibují ceramidsyntasu a interferují tak se sfingolipidovým metabolismem. U fumonisinů se toxicita z velké části odvíjí od aminové skupiny a deaminace molekuly toxicitu významně sníží. Alfaproteobakterie rodu *Spinghopyxis* sp. kmen MTA144 nebo i kvasinky *Exophiala spinifera* nebo *Rhinochadiella*

atrovirens mají karboxylesterasovou aktivitu, které vede k odštěpení obou trikarboxylových kyselin a transformuje tak FB₁ na hydrolyzovanou formu – HFB₁ (také označován jako aminopentol AP₁; Duvick et al., 2005; Hartinger and Moll, 2011; Jard et al., 2011). Duvick et al. (2003) patentoval systém degradace fumonisinů karboxylesterasou izolovanou z mikroorganismů vyskytujících se na kukuřici a sekvenci úspěšně použil pro tvorbu transgenních odrůd. Jedná se o stejný tým, který se podílel na objasnění mechanismu detoxikace ZEN. Produkt AP-1 je přesto stále toxický, vzhledem k přítomnosti aminoskupiny. Testy stanovení LC₅₀ AP-1 na korýších *Artemia salina* ukázaly, že toxicita AP-1 je přibližně 7× nižší než u FB₁, teprve acetylace nebo odštěpení aminoskupiny vede k významné ztrátě toxicity (Hartl and Humpf, 2000). Některé mikroorganismy jsou však schopny tento metabolit dále konvertovat prostřednictvím aminotransferas například na 2-oxo-12,16-dimethyl-3,5,10, 14,15-icosanepentol hemiketal (2-OP1 hemiketal). Tato aminotransferasová aktivita byla zjištěna například u neidentifikovaného mikroorganismu ATCC 55552 (Heinl et al., 2011) nebo již dříve u plísně *Exophiala spinifera* (Blackwell et al., 1999). Produkty obou enzymových reakcí jsou na Obr. 3.



Obr. 3: Fumonisin a produkty jeho mikrobiální degradace

4 ZÁVĚR

Cílem této studie byl komplexní pohled na eliminaci mykotoxinů v krmivech, její těžiště spočívá v části pojednávající o mikrobiálních enzymech schopných biologické degradace mykotoxinů. Enzymové aktivity vedoucí k detoxikaci mykotoxinů byly zjištěny v trávicím traktu zvířat, ale i např. u půdních mikroorganismů nebo u napadených rostlin. Fyziologické a mikrobiální pochody v trávicím traktu zvířat mohou vést k eliminaci mykotoxinů a jsou možná zodpovědné za rozdíly v odolnosti jednotlivých druhů vůči skupinám mykotoxinů. Zásadní roli ale budou v budoucnu hrát zřejmě enzymy exogenní které budou zvířatům podávány jako přídatné látky. V takovém případě není rozhodující původ enzymu, ale aktivita a technologické vlastnosti, které předurčí jeho využití. Téměř ale neexistují studie, které by se věnovaly reakcím těchto detoxikačních enzymů na necílové molekuly, např. živiny.

V sektoru vyvazovačů pro hospodářská zvířata je zřejmý posun ke komplexním přípravkům a některé z nich již obsahují enzymy schopné detoxikace mykotoxinů. Není však zcela jednoznačné, nakolik tyto enzymy působí *in vivo* za reálných podmínek chovu. Valná většina těchto aktivit je dobře popsána *in vitro*, ale jen málo studií potvrzuje jejich účinnost *in vivo*.

Eliminace mykotoxinů v krmivech a snížení jejich negativního vlivu na zdraví zvířat musí probíhat a probíhá na třech rovinách:

- Zabránění plesnivění, využití konzervantů nebo kyselin, případně mechanická eliminace lokalizovatelných ložisek plísně
- Adsorpce v trávicím traktu mikroorganismů s použitím adsorbentů
- Degradace prostřednictvím mikroorganismů, ať již metodami adsorpce na buněčnou stěnu a jejich vyloučení ve výkalech nebo prostřednictvím enzymatické mikrobiální degradace.

K dobrému zdravotnímu stavu zvířat a prevenci mykotoxikóz mohou dále přispět antioxidanty, včetně BHT, BHA nebo diskutované fytochemikálie.

Použití vyvazovačů ve výživě hospodářských zvířat je perspektivní směr, jehož smysl stoupá současně s tím, jak se zpřísňují normy pro obsah mykotoxinů v krmivech pro hospodářská zvířata. Existuje několik typů vyvazovačů, založených na jílovitých horninách, aktivním uhlí nebo komplexech polysacharidů (ať již ve formě sacharidových frakcí, živých

nebo lyzovaných buňkách), které jsou součástí komerčních produktů a je u nich ověřena účinnost proti základním typům mykotoxinů.

Existuje řada dílčích publikací, které potvrzují vliv na vyvazování mykotoxinů *in vitro* nebo *in vivo*, je však jen málo studií, které by srovnávaly mezi sebou účinnost těchto produktů v jednotném modelu nebo experimentu, například ve validovaném gastrointestinálním modelu. Několik takových prací ale bylo publikováno a poskytují možnost srovnat výhody a nevýhody jednotlivých typů (Avantaggiato et al., 2004; Sabater-Vilar et al., 2007). Ve většině případů se studie shodují v tom, že účinnost minerálních přípravků je vysoká proti AFB₁, je ale nízká proti ostatním mykotoxinům, například DON (mezi 5–15 %), což je často v kontrastu s tvrzením výrobců (Sabater-Vilar et al., 2007). Účinnost prostředků na bázi *S. cerevisiae* je vůči DON a ZEN vyšší, i více než 60% v závislosti na koncentraci mykotoxinu (Sabater-Vilar et al., 2007). Mannanové oligosacharidy a glukany jak z hub, tak i z řas byly schopny DON vázat s účinností převyšující i 80 %, jak bylo ukázáno na Caco-2 modelu (Cavret et al., 2009). Je možné pozorovat trend odklonu výrobců od čistých jílovitých hornin a snaha vyvíjet komplexní produkty na bázi směsí jílu s glukany. Je potřeba vyvinout a validovat jednotný model, který bude schopen současně s účinností vůči jednotlivým mykotoxinům ověřit i jejich vliv na dostupnost esenciálních živin.

Reference

- Aguilar Uscanga, B., Francois, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology* 37, 268-274.
- Ahamed, S., Foster, J.S., Bukovsky, A., Wimalasena, J., 2001. Signal transduction through the Ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Molecular Carcinogenesis* 30, 88-98.
- Ahonen, L., Kivikoski, H., Korkeakoski, P., Laaksonen, R., 2008. Quality assurance of the bentonite material. *Posiva Working report* 33, 122 p.
- Al-Anati, L., Petzinger, E., 2006. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29, 79-90.
- Altalhi, A.D., El-Deeb, B., 2009. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials* 161, 1166-1172.
- Anthony, J.W., Bideaux, R.A., Bladh, K.W., Nichols, M.C., 1990. *Handbook of mineralogy. Mineral Data Publishing Tucson, Arizona.*
- Armando, M.R., Pizzolitto, R.P., Dogi, C.A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcero, A.M., Cavaglieri, L.R., 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology* 113, 256-264.
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P.S., Ikotun, T., Sikora, R.A., Cotty, P.J., Bandyopadhyay, R., 2008. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives and Contaminants* 25, 1264-1271.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A., 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology* 42, 817-824.
- Awad, W.A., Ghareeb, K., Böhm, J., Zentek, J., 2010. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives & Contaminants: Part A* 27, 510-520.

- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R., 2005. Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3421-3425.
- Berthiller, F., Krska, R., Domig, K.J., Kneifel, W., Juge, N., Schuhmacher, R., Adam, G., 2011. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicology Letters* 206, 264-267.
- Berthiller, F., Lemmens, M., Werner, U., Krska, R., Hauser, M.T., Adam, G., Schuhmacher, R., 2007. Short review: Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone in plants. *Mycotoxin Research* 23, 68-72.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., Krska, R., 2009. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1243-1252.
- Binder, E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 133, 149-166.
- Binder, J., Horvath, E.M., Schatzmayr, G., Ellend, N., Danner, H., Krska, R., Braun, R., 1997. Screening for deoxynivalenol-detoxifying anaerobic rumen microorganisms. *Cereal Research Communications* 25, 343-346.
- Blackwell, B.A., Gilliam, J.T., Savard, M.E., Miller, J.D., Duvick, J.P., 1999. *Exophiala spinifera*. *Nat. Toxins* 7, 31-38.
- Boorman, G.A., McDonald, M.R., Imoto, S., Persing, R., 1992. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicologic Pathology* 20, 236-245.
- Brake, J., Hamilton, P.B., Kittrell, R.S., 2000. Effects of the tricothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on feed consumption, body weight, and oral lesions of broiler breeders. *Poultry Science* 79, 856-863.
- Brake, J., Hamilton, P.B., Kittrell, R.S., 2002. Effects of the tricothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on egg production of broiler breeders. *Poultry Science* 81, 1807-1810.
- Bravin, F., Duca, R.C., Balaguer, P., Delaforge, M., 2009. In vitro cytochrome P450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: Possible occurrence of this metabolite in vivo. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 1824-1837.

- Bretz, M., Beyer, M., Cramer, B., Knecht, A., Humpf, H.U., 2006. Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6445-6451.
- Burmeister, H.R., 1971. T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Applied Microbiology* 21, 739-742.
- Cavret, S., Laurent, N., Videmann, B., Mazallon, M., Lecoecur, S., 2009. Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary in vitro tests. *Food Additives & Contaminants: Part A* 27, 43-53.
- Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E., Hall, H.H., 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology* 14, 934-939.
- Cleveland, T.E., Dowd, P.F., Desjardins, A.E., Bhatnagar, D., Cotty, P.J., 2003. United States Department of Agriculture—Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science* 59, 629-642.
- Creppy, E.E., Chiarappa, P., Baudrimont, P., Moukha, S., Carratu, M.R., 2004. Synergistic effects of fumonisin B-1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology* 201, 115-123.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183-205.
- Dakovic, A., Tomaoevic-Canovic, M., Rottinghaus, G.E., Matijaeovic, S., Sekulic, Z., 2007. Fumonisin B1 adsorption to octadecyldimethylbenzyl ammonium-modified clinoptilolite-rich zeolitic tuff. *Microporous and Mesoporous Materials* 105, 285-290.
- Daković, A., Matijašević, S., Rottinghaus, G.E., Dondur, V., Pietrass, T., Clewett, C.F.M., 2007. Adsorption of zearalenone by organomodified natural zeolitic tuff. *Journal of Colloid and Interface Science* 311, 8-13.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Dondur, V., Rottinghaus, G.E., Medaković, V., Zarić, S., 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46, 20-25.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Rottinghaus, G., Dondur, V., Mašić, Z., 2003. Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30, 157-165.

- De Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R., 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology* 98, 1261-1270.
- De Nijs, M., Van den Top, H.J., Portier, L., Oegema, G., Kramer, E., Van Egmond, H.P., Hoogenboom, L.A.P., 2012. Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3- β -glucoside in in vitro models. *World Mycotoxin Journal* 5, 319-324.
- DeNicola, D.B., Rebar, A.H., Carlton, W.W., Yagen, B., 1978. T-2 toxin mycotoxicosis in the guinea-pig. *Food and cosmetics toxicology* 16, 601-609.
- Deshmukh, S., Asrani, R.K., Ledoux, D.R., Jindal, N., Bermudez, A.J., Rottinghaus, G.E., Sharma, M., Singh, S.P., 2005. Individual and combined effects of *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B(1), and *Salmonella Gallinarum* infection on liver of Japanese quail. *Avian Diseases* 49, 592-600.
- Dogi, C.A., Armando, R., Ludueña, R., de LeBlanc, A.M., Rosa, C.A.R., Dalcero, A., Cavaglieri, L., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food Additives & Contaminants: Part A* 28, 1705-1711.
- Duvick, J., Maddox, J., Gilliam, J., 2003. Compositions and methods for fumonisin detoxification. Google Patents.
- Duvick, J., Rood, T.A., 1999. Zearalenone detoxification compositions and methods. Google Patents.
- Duvick, J.P., Gilliam, J.T., Maddox, J.R., Rao, A.G., Crasta, O.R., Folkerts, O., 2005. Amino polyol amine oxidase polynucleotides and related polypeptides and methods of use. Google Patents.
- Dänicke, S., Beyer, M., Breves, G., Valenta, H., Humpf, H.U., 2010. Effects of oral exposure of pigs to deoxynivalenol (DON) sulfonate (DONS) as the non-toxic derivative of DON on tissue residues of DON and de-epoxy-DON and on DONS blood levels. *Food Additives & Contaminants: Part A* 27, 1558-1565.
- Dänicke, S., Valenta, H., Gareis, M., Lucht, H.W., Reichenbach, H., 2005. On the effects of a hydrothermal treatment of deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat in the presence of sodium metabisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) on DON reduction and on piglet performance. *Animal Feed Science and Technology* 118, 93-108.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., Mykkanen, H., 2002a. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with

- zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3545-3549.
- El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkänen, H., 2002b. Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives & Contaminants* 19, 680-686.
- Elaroussi, M.A., Mohamed, F.R., El Barkouky, E.M., Atta, A.M., Abdou, A.M., Hatab, M.H., 2006. Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathology* 35, 263-U269.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H., 2004. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114, 205-239.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H., Johnsen, K., Lindberg, J.E., 2002. Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. *Archives of Animal Nutrition* 56, 263-274.
- Etienne, M., Dourmad, J.Y., 1994. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows - a review. *Livestock Production Science* 40, 99-113.
- Fazeli, M.R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M.R., Vaghari, E., Pouragahi, S., 2009. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 72, 189-192.
- Fincham, J.E., Marasas, W.F.O., Taljaard, J.J.F., Kriek, N.P.J., Badenhorst, C.J., Gelderblom, W.C.A., Seier, J.V., Smuts, C.M., Faber, M., Weight, M.J., Slazus, W., Woodroof, C.W., Vanwyk, M.J., Kruger, M., Thiel, P.G., 1992. Atherogenic effects in a nonhuman primate of *Fusarium-moniliforme* cultures added to a carbohydrate-diet. *Atherosclerosis* 94, 13-25.
- Firozi, P.F., Aboobaker, V.S., Bhattacharya, R.K., 1996. Action of curcumin on the cytochrome P450-system catalyzing the activation of aflatoxin B1. *Chemico-Biological Interactions* 100, 41-51.
- Folcher, L., Delos, M., Marengue, E., Jarry, M., Weissenberger, A., Eychenne, N., Regnault-Roger, C., 2010. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 711-719.
- Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S., Pestka, J.J., 1987. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food and Chemical Toxicology* 25, 155-162.
- Friend, D.W., Trenholm, H.L., Hartin, K.E., Young, J.C., Thompson, B.K., 1984. Effect of adding potential vomitoxin (deoxynivalenol) detoxicants or a *F-Graminearum*

- inoculated corn supplement to wheat diets fed to pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 64, 733-741.
- Fruhauf, S., Schwartz, H., Ottner, F., Krska, R., Vekiru, E., 2012. Yeast cell based feed additives: studies on aflatoxin B-1 and zearalenone. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 29, 217-231.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S., 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1398-1407.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., Galvano, G., 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of Food Protection* 64, 120-131.
- Girish, C.K., Devegowda, C., 2006. Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb®) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19, 877-883.
- Glavits, R., Vanyi, A., Fekete, S., Tamas, J., 1989. Acute toxicological experiment of t-2 toxin in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica* 37, 75-&.
- Gradelet, S., Le Bon, A.M., Berges, R., Suschetet, M., Astorg, P., 1998. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 19, 403-411.
- Grajewski, J., Błajet-Kosicka, A., Twarużek, M., Kosicki, R., 2012. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006–2009. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 870-877.
- Gratz, S., Mykkänen, H., Ouwehand, A.C., Juvonen, R., Salminen, S., El-Nezami, H., 2004. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6306-6308.
- Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., Niu, T., 2008. Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 1489-1503.
- Guan, S., Zhou, T., Yin, Y., Xie, M., Ruan, Z., Young, J.C., 2011. Microbial strategies to control aflatoxins in food and feed. *World Mycotoxin Journal* 4, 413-424.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Shimada, T., 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives* 104, 557.

- Hartinger, D., Moll, W.D., 2011. Fumonisin elimination and prospects for detoxification by enzymatic transformation. *World Mycotoxin Journal* 4, 271-283.
- Hartl, M., Humpf, H.U., 2000. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology* 38, 1097-1102.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Corrier, D.E., Phillips, T.D., 1994. Comparison of two hydrated sodium calcium aluminosilicate compounds to experimentally protect growing barrows from aflatoxicosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 88-92.
- Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J., 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions* 128, 39-49.
- Hathout, A.S., Mohamed, S.R., El-Nekeety, A.A., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. *Toxicon* 58, 179-186.
- He, J., Zhou, T., Young, J.C., Boland, G.J., Scott, P.M., 2010. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology* 21, 67-76.
- Hedman, R., Thuvander, A., Gadhasson, I., Reverter, M., Pettersson, H., 1997. Influence of dietary nivalenol exposure on gross pathology and selected immunological parameters in young pigs. *Natural Toxins* 5, 238-246.
- Heinl, S., Hartinger, D., Thamhesl, M., Schatzmayr, G., Moll, W.D., Grabherr, R., 2011. An aminotransferase from bacterium ATCC 55552 deaminates hydrolyzed fumonisin B 1. *Biodegradation* 22, 25-30.
- Henry, M.H., Wyatt, R.D., Fletcher, O.J., 2000. The toxicity of purified fumonisin B-1 in broiler chicks. *Poultry Science* 79, 1378-1384.
- Hinton, M.H., 2000. Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *The Veterinary Journal* 159, 124-138.
- Hormisch, D., Brost, I., Kohring, G.W., Giffhorn, F., Kroppenstedt, R.M., Stackebradt, E., Färber, P., Holzapfel, W.H., 2004. *Mycobacterium fluoranthenvivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 653-660.
- Horn, B.W., Greene, R.L., Sorensen, R.B., Blankenship, P.D., Dorner, J.W., 2001. Conidial movement of nontoxicogenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in peanut fields following application to soil. *Mycopathologia* 151, 81-92.

- Howard, P.C., Eppley, R.M., Stack, M.E., Warbritton, A., Voss, K.A., Lorentzen, R.J., Kovach, R.M., Bucci, T.J., 2001. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F(1) mice. *Environmental Health Perspectives* 109, 277-282.
- Huebner, K.D., Wannemacher Jr, R.W., Stiles, B.G., Popoff, M.R., Poli, M.A., 2007. Additional toxins of clinical concern In: Dembek Z.F., ed. *Medical Aspects of Biological Warfare*, 355-389.
- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., 1992. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poultry Science* 71, 64-69.
- Hughes, D.M., Gahl, M.J., Graham, C.H., Grieb, S.L., 1999. Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *Journal of Animal Science* 77, 693-700.
- Humpf, H.-U., Voss, K.A., 2004. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research* 48, 255-269.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101-134.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* 122, 179-188.
- Igawa, T., Takahashi-Ando, N., Ochiai, N., Ohsato, S., Shimizu, T., Kudo, T., Yamaguchi, I., Kimura, M., 2007. Reduced contamination by the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1622-1629.
- Ip, S.P., Mak, D.H.F., Li, P.C., Poon, M.K.T., Ko, K.M., 1996. Effect of a lignan-enriched extract of *Schisandra chinensis* on aflatoxin B1 and cadmium chloride-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacology & Toxicology* 78, 413-416.

- Ivanova, E., Karsheva, M., Koumanova, B., 2010. Adsorption of ammonium ions onto natural zeolite. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 45, 295-302.
- Jackson, L.S., Voss, K.A., Ryu, D., 2012. Effects of different extrusion conditions on the chemical and toxicological fate of fumonisin B1 in maize: a short review. *World Mycotoxin Journal* 5, 251-260.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A* 28, 1590-1609.
- Jay, J.M., 1996. *Modern food microbiology*. Chapman & Hall. 661 p.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., 2009. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of Food Protection* 72, 2006-2016.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., İş l, V., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 593-619.
- Karlovsky, P., 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins* 7, 1-23.
- Kolosova, A., Stroka, J., 2011. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal* 4, 225-256.
- Konjevic, D., Srebocan, E., Gudan, A., Lojkic, I., Severin, K., Sokolovic, M., 2004. A pathological condition possibly caused by spontaneous trichotecene poisoning in Brahma poultry: first report. *Avian Pathology* 33, 377-380.
- Kostelanska, M., Hajslova, J., Zachariasova, M., Malachova, A., Kalachova, K., Poustka, J., Fiala, J., Scott, P.M., Berthiller, F., Krska, R., 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its major conjugate, deoxynivalenol-3-glucoside, in beer and some brewing intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3187-3194.
- Kriszt, R., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Cserháti, M., Kriszt, B., Kukolya, J., Czéh, Á., Fehér-Tóth, S., Török, L., Szóke, Z., Kovács, K.J., Barna, T., Ferenczi, S., 2012. A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *rhodococcus pyridinivorans* K408 strain. *PLoS ONE* 7, e43608.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Huff, W.E., 1990. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated, sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Science* 69, 727-735.
- Kubo, K., 1996. Animal feed containing *Bacillus subtilis* FERM BP-3418 that decomposes aflatoxin. Google Patents.

- Kuipergoodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7, 253-306.
- Lacey, J., 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Microbiology* 67, 11s-25s.
- Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostalek, P., Sachambula, L., 2008. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives & Contaminants: Part A* 25, 732-744.
- Larbier, M., Leclercq, B., 1992. Nutrition and feeding of poultry. Institut National de la Recherche Agronomique. 305 p.
- Laza, A.L., Jaber, M., Miehé-Brendlé, J., Demais, H., Le Deit, H., Delmotte, L., Vidal, L., 2007. Green nanocomposites: Synthesis and characterization. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, 3207-3213.
- Leal, M., Shimada, A., Ruíz, F., González de Mejía, E., 1999. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicology Letters* 109, 1-10.
- Ledoux, D.R., Brown, T.P., Weibking, T.S., Rottinghaus, G.E., 1992. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 330-333.
- Lemke, S.L., 1999. Assessment of the estrogenic effects of zearalenone after treatment with ozone utilizing the mouse uterine weight bioassay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 56, 283-295.
- Li, J.J., Suo, D.C., Su, X.O., 2010. Binding capacity for aflatoxin B1 by different adsorbents. *Agricultural Sciences in China* 9, 449-456.
- Li, X.Z., Zhu, C., de Lange, C.F.M., Zhou, T., He, J., Yu, H., Gong, J., Young, J.C., 2011a. Efficacy of detoxification of deoxynivalenol-contaminated corn by *Bacillus* sp. LS100 in reducing the adverse effects of the mycotoxin on swine growth performance. *Food Additives & Contaminants: Part A* 28, 894-901.
- Li, Y.S., Wang, Z.H., Beier, R.C., Shen, J.Z., De Smet, D., De Saeger, S., Zhang, S.X., 2011b. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3441-3453.
- Lillehoj, E.B., Ciegler, A., Hall, H.H., 1967. Aflatoxin B1 uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *Journal of Bacteriology* 93, 464-471.

- Lin, L., Lei, Z., Wang, L., Liu, X., Zhang, Y., Wan, C.L., Lee, D.J., Tay, J.H., 2012. Adsorption mechanisms of high-levels of ammonium onto natural and NaCl-modified zeolites. *Separation and Purification Technology* 103, 15-20.
- Line, J.E., Brackett, R.E., Wilkinson, R.E., 1994. Evidence for degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection* 57, 788-791.
- Liu, D.L., Yao, D.S., Liang, R., Ma, L., Cheng, W.Q., Gu, L.Q., 1998. Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *armillariella tabescens*. *Food and Chemical Toxicology* 36, 563-574.
- Long, M., Li, P., Zhang, W.K., Li, X.B., Zhang, Y., Wang, Z., Liu, G.W., 2012. Removal of zearalenone by strains of *Lactobacillus* sp isolated from rumen in vitro. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11, 2417-2422.
- Lovett, J., Thompson Jr, R.G., Boutin, B.K., 1975. Trimming as a means of removing patulin from fungus-rotted apples. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 58, 909.
- Madhyastha, M.S., Marquardt, R.R., Abramson, D., 1994. Structure-activity relationships and interactions among trichothecene mycotoxins as assessed by yeast bioassay. *Toxicology* 32, 1147-1152.
- Malagutti, L., Zannotti, M., Scampini, A., Sciaraffia, F., 2005. Effects of ochratoxin A on heavy pig production. *Animal Research* 54, 179-184.
- Marasas, W.F.O., 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environmental Health Perspectives* 109, 239-243.
- McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Kubena, L.F., 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology* 35, 807-820.
- Meronuck, R., Concibido, V., 1996. Mycotoxins in feed. *Feedstuffs*. 68, 139.
- Mesterházy, Á., 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108, 675-684.
- Mezes, M., Balogh, K., Toth, K., 2010. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins - a review. *Acta Veterinaria Hungarica* 58, 1-17.
- Milano, G.D., Becuvillalobos, D., Tapia, M.O., 1995. Effects of long-term zearalenone administration on spermatogenesis and serum luteinizing-hormone, follicle-stimulating-hormone, and prolactin values in male-rats. *American Journal of Veterinary Research* 56, 954-958.

- Milicevic, D., Juric, V., Stefanovic, S., Jovanovic, M., Jankovic, S., 2008. Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin a and porcine nephropathy in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2169-2183.
- Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., Visconti, A., 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters* 159, 272-283.
- Mirocha, C.J., Abbas, H.K., Windels, C.E., Xie, W., 1989. Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1315-1316.
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E., Prillinger, H., 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 661-671.
- Morgavi, D.P., Riley, R.T., 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137, 201-212.
- Motomura, M., Toyomasu, T., Mizuno, K., Shinozawa, T., 2003. Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological Research* 158, 237-242.
- Munkvold, G.P., 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology* 47, 285-311.
- Niderkorn, V., Boudra, H., Morgavi, D.P., 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Journal of Applied Microbiology* 101, 849-856.
- Niderkorn, V., Boudra, H., Morgavi, D.P., 2008. Stability of the bacteria-bound zearalenone complex in ruminal fluid and in simulated gastrointestinal environment in vitro. *World Mycotoxin Journal* 1, 463-467.
- Papaioannou, D., Katsoulos, P.D., Panousis, N., Karatzias, H., 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. *Microporous and Mesoporous Materials* 84, 161-170.
- Park, D.L., 1993. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Additives & Contaminants* 10, 49-60.
- Park, D.L., Liang, B., 1993. Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science & Technology* 4, 334-342.
- Patterson, D.S.P., Allcroft, R., 1970. Metabolism of aflatoxin in susceptible and resistant animal species. *Food and Cosmetics Toxicology* 8, 43-53.

- Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137, 283-298.
- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., Lebrihi, A., 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1495-1502.
- Pfohl-Leskowicz, A., Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 61-99.
- Phillips, T.D., 1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicological Sciences* 52, 118-126.
- Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R., Heidelbaugh, N.D., 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poultry Science* 67, 243-247.
- Piotrowska, M., 2012. Adsorption of ochratoxin A by *Saccharomyces cerevisiae* living and non-living cells. *Acta Alimentaria* 41, 1-7.
- Piotrowska, M., Zakowska, Z., 2005. The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology* 54, 279-286.
- Pizzolitto, R.P., Armando, M.R., Combina, M., Cavaglieri, L.R., Dalcero, A.M., Salvano, M.A., 2012a. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B1 adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 47, 933-941.
- Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A., Dalcero, A.M., 2012b. Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. *International Journal of Food Microbiology* 156, 214.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., Adam, G., 2003. Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a udp-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47905-47914.
- Ramos, A.J., Fink-Gremmels, J., Hernandez, E., 1996a. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *Journal of Food Protection* 59, 631-641.

- Ramos, A.J., Hernandez, E., 1996. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science and Technology* 62, 263-269.
- Ramos, A.J., Hernandez, E., Pla-Delfina, J.M., Merino, M., 1996b. Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *International Journal of Pharmaceutics* 128, 129-137.
- Rastogi, R., Srivastava, A.K., Rastogi, A.K., 2001. Long term effect of aflatoxin B1 on lipid peroxidation in rat liver and kidney: Effect of picroliv and silymarin. *Phytotherapy Research* 15, 307-310.
- Rauscher, R., Edenharder, R., Platt, K.L., 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 413, 129-142.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Van Schalkwyk, D.J., 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82, 353.
- Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., van der Doelen, M.A.M., Fink-Gremmels, J., 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia* 163, 81-90.
- Sampietro, D.A., Vattuone, M.A., Presello, D.A., Fauguel, C.M., Catalán, C.A.N., 2009. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection* 28, 196-200.
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A.P., Binder, E.M., 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 543-551.
- Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenstrom, S., Sydenham, E.W., 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International* 79, 671-687.
- Sherman, J.D., 1999. Synthetic zeolites and other microporous oxide molecular sieves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3471-3478.
- Shetty, P.H., Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology* 17, 48-55.

- Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J., 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 39, 1435-1438.
- Smiley, R.D., Draughon, F.A., 2000. Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *Journal of Food Protection* 63, 415-418.
- Sokolovic, M., Garaj-Vrhovac, V., Simpraga, B., 2008. T-2 toxin: Incidence and toxicity in poultry. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 59, 43-52.
- Soni, K.B., Lahiri, M., Chackradeo, P., Bhide, S.V., Kuttan, R., 1997. Protective effect of food additives on aflatoxin-induced mutagenicity and hepatocarcinogenicity. *Cancer Letters* 115, 129-133.
- Stockmann-Juvala, H., Savolainen, K., 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology* 27, 799-809.
- Stoev, S.D., Paskalev, M., MacDonald, S., Mantle, P.G., 2002. Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53, 481-487.
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Tabuc, C., Nicolau, A., Aprodu, I., Puel, O., 2012. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—focus on europe. *Toxins* 4, 788-809.
- Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada, H., Yamaguchi, I., 2002. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochemical Journal* 365, 1.
- Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Shibata, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I., Kimura, M., 2004. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3239-3245.
- Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Färber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., Van Zyl, W.H., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H., 2005. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556T. *International Journal of Food Microbiology* 105, 111-117.
- Vekiru, E., Hametner, C., Mitterbauer, R., Rechthaler, J., Adam, G., Schatzmayr, G., Krska, R., Schuhmacher, R., 2010. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2353-2359.
- Visconti, A., Haidukowski, E.M., Pascale, M., Silvestri, M., 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters* 153, 181-189.

- Voss, K.A., Smith, G.W., Haschek, W.M., 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology* 137, 299-325.
- Waes, J.G., Starr, L., Maddox, J., Aleman, F., Voss, K.A., Wilberding, J., Riley, R.T., 2005. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an in vivo mouse model. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology* 73, 487-497.
- Weber, M., Stiller, S., Balogh, K., Wágner, L., Erdélyi, M., Mézes, M., 2007. Effect of feeding T-2 toxin contaminated feed on the utilisation of vitamin E in chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* 55, 21-27.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K., 1996a. Effect of different vitamin A status on carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *In Vivo (Athens, Greece)* 10, 113.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K., 1996b. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Letters* 98, 129-135.
- Wild, C.P., Gong, Y.Y., 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31, 71-82.
- Williams, K.C., Blaney, B.J., 1994. Effect of the mycotoxins, nivalenol and zearalenone, in maize naturally infected with *Fusarium-graminearum* on the performance of growing and pregnant pigs. *Australian Journal of Agricultural Research* 45, 1265-1279.
- Williams, P.P., 1989. Effects of T-2 mycotoxin on gastrointestinal tissues: A Review of in vivo and in vitro models. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 374-387.
- Young, J.C., Fulcher, R.G., Hayhoe, J.H., Scott, P.M., Dexter, J.E., 1984. Effect of milling and baking on deoxynivalenol (vomitoxin) content of eastern Canadian wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 659-664.
- Young, J.C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., Gong, J., 2007. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology* 45, 136-143.
- Yu, H., Zhou, T., Gong, J., Young, C., Su, X., Li, X.Z., Zhu, H., Tsao, R., Yang, R., 2010. Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. *BMC Microbiology* 10, 182.

- Yunus, A.W., Blajet-Kosicka, A., Kosicki, R., Khan, M.Z., Rehman, H., Bohm, J., 2012. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. *Poultry Science* 91, 852-861.
- Zhang, X.B., Ohta, Y., 1991. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *Journal of Dairy Science* 74, 1477-1481.
- Zhao, L.H., Guan, S., Gao, X., Ma, Q.G., Lei, Y.P., Bai, X.M., Ji, C., 2011. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology* 110, 147-155.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1-18.

Transformation of mycotoxins by intestinal microorganisms

Rada Vojtěch, Havlik Jaroslav

The aim of this study was a comprehensive view of the elimination of mycotoxins in animal feed, mainly with microbial enzymes which are capable to biologically degrade mycotoxins. Enzyme activities leading to the detoxification of mycotoxins were found in the digestive tract of animals, but also in micro-organisms in soil or in infected plants. Physiological and microbial processes in the digestive tract of animals may lead to the elimination of mycotoxins and are perhaps responsible for the differences in the resistance of each species to certain groups of mycotoxins. Crucial role in the future but will probably play exogenous enzymes that are administered to animals as food additives. In this case the origin of the enzyme is not critical, but the activity and technological properties, which will determine its use. But almost no studies that describe the reactions of detoxification enzymes to non-target molecules, such as nutrients were reported.

The sector mycotoxins adsorbents for livestock is apparently shift to complex products and some of them already contain enzymes capable to detoxify mycotoxins. But it is not entirely clear how these enzymes act *in vivo* under real farming conditions. The vast majority of these activities is well documented *in vitro*, but only a few studies confirming their efficacy *in vivo*. Elimination of mycotoxins in feed and reduce their negative impact on animal health must be carried out at three levels:

- To prevent mold, the use of preservatives or acids, or mechanical elimination of moldy focuses from feed.
- Adsorption of microorganisms in the digestive tract using adsorbents
- Degradation by microorganisms, both methods of adsorption to the cell wall and elimination in faeces via enzymatic or microbial degradation.

The good health of animals and prevention mycotoxicoses can also contribute antioxidants, including BHT, BHA or discussed phytochemicals.

PODĚKOVÁNÍ

Rádi bychom poděkovali Ing. Miroslavu Jochovi a Ing. Ivu Doskočilovi za spolupráci.