

## MYKOLOGICKÁ ANALÝZA POTRAVIN

### a.

#### Souhrn

V roce 2011 byl ukončen druhý dvouletý cyklus nově uspořádaného Monitoringu dietární expozice člověka a tím i pozměněného projektu "MYKOMON". Vzhledem k detailnějšímu mykologickému sledování toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus* sekce *Nigri*, producentů ochratoxinu A, byl počet vzorků potravin dříve odebíraných v jednom roce monitorovacího období opět rozdělen do dvou let (2010 - 2011).

Specializované mykologické vyšetření bylo i nadále zaměřeno na popis a charakterizaci nebezpečí výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (plísni) v potravinách. Ve čtyřech odběrových termínech bylo odebráno 9 druhů komodit na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 108 vzorků potravin.

Byla získána frekvenční data o kvalitativním a kvantitativním výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub v potravinách v ČR. U vybraných potravin byl stanoven celkový počet vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g potravin) a charakterizován jejich mykologický profil. Výskyt sledovaných druhů toxinogenních vláknitých mikroskopických hub byl dále charakterizován indexem kontaminace ( $I_k$ ), tzn. poměrem počtu potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g potravin) k celkovému počtu vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g potravin).

Byla prokázána přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus flavus*, producentů aflatoxinů, celkem ve 11 vzorcích (tj. 18 %) uvedených typů potravin: kaše obilná dětská, čaj ovocný, čaj černý, mouka polohrubá, mouka hladká.

Potenciálně toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri* (producenti ochratoxinu A) byly stanoveny celkem ve 30 vzorcích (63 %) následujících potravin: rozinky, čaj ovocný, čaj černý, kaše obilná dětská.

Přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Penicillium crustosum* (potenciálního producenta mykotoxinu penitremu A) nebyla v tomto monitorovacím období ve vlašských ořeších prokázána.

### b.

#### Spolupracující organizace a odborníci

Státní zdravotní ústav, Centrum zdraví, výživy a potravin v Brně, Národní referenční centrum pro mikroskopické houby a jejich toxiny v potravinových řetězcích (doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc., Mgr. Jarmila Škarková, Pavlína Křemečková, Ivana Procházková), Sběrka kultur hub (CCF) katedry botaniky přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (RNDr. Alena Kubátová, CSc.).

### c.

#### Základní informace

Toxinogenní vláknité mikroskopické houby jsou mikroorganismy, které mají schopnost produkovat mykotoxiny. Patří k významným faktorům, které mohou v negativním smyslu ovlivnit zdraví člověka. Zaplesnivělé potraviny, obsahující toxinogenní vláknité mikroskopické houby a mykotoxiny, představují významné nebezpečí pro zdraví populace v ČR, zejména z hlediska tzv. pozdních toxických účinků (např. karcinogenních, vývojové toxicity). K nejvýznamnějším toxinogenním vláknitým mikroskopickým houbám patří producenti aflatoxinů a ochratoxinu A. Potraviny jsou vhodným substrátem pro kontaminaci, růst a rozmnožování toxinogenních vláknitých mikroskopických hub a následně pro produkci mykotoxinů. Z celkového počtu asi 114 druhů vláknitých mikroskopických hub, které mají význam v potravinách, je 65 druhů toxinogenních. Potraviny kontaminované

toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami tedy představují významné nebezpečí tzv. "skrytých mykotoxinů".

Jestliže byla u některého kmene určitého druhu vláknitých mikroskopických hub dříve zjištěna produkce určitého mykotoxinu, je možné považovat všechny kmeny tohoto druhu za *potenciálně toxinogenní*, tj. schopné produkovat určitý mykotoxin. Stanovení reálné toxinogenity kmenů se provádí kultivací na specifických živných půdách (např. YES médiu) s následným analytickým stanovením příslušných mykotoxinů. V posledních letech jsou ke stanovení toxinogenity používány metody molekulárně biologické (PCR). Pomocí nich lze detekovat specifické geny, které kódují enzymy, podílející se na biosyntéze mykotoxinů.

Vzhledem k tomu, že v ČR nebyla k dispozici aktuální data o míře kvalitativní a kvantitativní kontaminace potravin vláknitými mikroskopickými houbami a ucelená spolehlivá data o výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub - producentů aflatoxinů a ochratoxinu A v potravinách, byla připravena a je realizována studie ("MYKOMON"). Cílem studie je získat informace o míře aktuální kontaminace potravin uvedenými toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami v ČR. Ke specializovanému mykologickému vyšetření jsou použity vzorky potravin zakoupené v tržní síti v rámci projektu monitoringu dietární expozice chemickým látkám. Výběr vyšetřovaných komodit je proveden s využitím dat spotřebního koše potravin a je zaměřen na ty významné skupiny potravin, které byly v minulosti u nás a ve světě kontaminovány sledovanými toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami. Vzorky zakoupené náhodně v tržní síti ČR simulují reálnou situaci při nákupu potravin spotřebitelem. Získané výsledky mykologického vyšetření modelují aktuální situaci před konzumací potravin v domácnostech, nikoliv pouze stav u výrobce, či v obchodní síti, protože zohledňují i „nákup, transport potravin spotřebitelem a uchování potravin v domácnostech“. Tím se zaměření studie liší od kontroly potravin prováděné dozorovými orgány MZe ČR.

Získaná data studie ("MYKOMON") a vyhodnocení trendů výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub v potravinách jsou prvním předpokladem pro realizaci hodnocení dietární expozice a zdravotního rizika toxinogenních vláknitých mikroskopických hub v potravinách v ČR.

#### d.

#### **Použitá metodika**

Mykologická analýza byla prováděna podle platných norem a doporučení Mezinárodní komise mykologie potravin (ICFM) k použití diagnostických živných půd pro identifikaci toxinogenních vláknitých mikroskopických hub. Jednotlivé zkoušky byly zpracovány do formy standardních operačních postupů (SOP) a byly akreditovány u Českého institutu pro akreditaci.

Výskyt toxinogenních vláknitých mikroskopických hub byl pro potřebu hodnocení kontaminace potravin charakterizován stanovením jejich celkového počtu (KTJ/g) a indexem kontaminace ( $I_k$ ), tzn. poměrem počtu potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g) k celkovému počtu vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g). Jedná se o původní pomocný ukazatel, který byl zaveden pro potřeby studie. Index  $I_k$  nabývá hodnot 0 - 1. Čím více se index blíží číslu 1, tím je kontaminace potravin toxinogenními vláknitými mikroskopickými houbami závažnější. Při indexu  $I_k = 1$  se toxinogenní vláknité mikroskopické houby vyskytují v potravinách v monokultuře. V odborné literatuře se uvádí, že v monokultuře bývá mnohem vyšší produkce mykotoxinů (např. aflatoxinů) než ve směsné kultuře, kde se mohou uplatnit kompetitivní (ochranné) vztahy mezi vláknitými mikroskopickými houbami.

#### **Interní metodiky :**

<b>M_PK_01</b>	Stanovení mikromycetů v potravinách a krmivech
<b>M_SM_01</b>	Stanovení kontaminace prostředí laboratoře mikromycety (plísněmi)
<b>MM_01</b>	Příprava a sanitace LPPV při odběru vzorků pro mikrobiologické a mykologické vyšetření
<b>AF/AP_TM_01</b>	Stanovení a identifikace toxinogenních mikromycetů <i>Aspergillus flavus</i> a <i>Aspergillus parasiticus</i> v potravinách

#### **Technické normy :**

**ČSN ISO 21517** Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní  
**ČSN ISO 6887** Všeobecné pokyny pro přípravu ředění při mikrobiologickém zkoušení

ČSN ISO 7667 Standardní struktura metod mikrobiologického zkoušení

ČSN ISO 6611 Mléko a mléčné výrobky – Stanovení počtu jednotek kvasinek a/nebo plísni tvořících kolonie

ČSN ISO 13681 Maso a masné výrobky – Stanovení počtu kvasinek a plísni – technika počítání kolonií

ČSN ISO 7698 Obiloviny, luštěniny a odvozené výrobky – Stanovení počtu bakterií, kvasinek a plísni

e.

### Výsledky laboratorní analýzy

V roce 2011 byla studie zaměřena na výskyt toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (plísni) - producentů aflatoxinů a ochratoxinu A v potravinách, s cílem získat další data o kontaminaci potravin v ČR.

Ve dvou termínech bylo odebráno 9 druhů komodit<sup>1</sup> na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 108 vzorků potravin. V prvním odběrovém termínu byly mykologicky vyšetřeny rozinky (celkem 12 vzorků). Ve druhém odběrovém termínu byly mykologicky vyšetřeny: mouka polohrubá, mouka hladká, mouka hrubá, vločky ovesné, krupice pšeničná, kaše obilná dětská, čaj černý a čaj ovocný (celkem 96 vzorků).

V uvedených potravinách byla získána sada frekvenčních dat o kvalitativním a kvantitativním výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub. Byl stanoven celkový počet kolonie tvořících jednotek vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g) a mykologický profil vybraných toxinogenních vláknitých mikroskopických hub, který byl dále charakterizován indexem kontaminace ( $I_k$ ).

e. 1

### Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub

Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g) v potravinách v roce 2011 je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1:

**Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g) v potravinách v roce 2011**

Potravina	Počet vzorků n	Aritmetický průměr* (KTJ/g)	Medián* (KTJ/g)	Rozsah (min/max) (KTJ/g)
Rozinky	12	767	104	5 - 4400
Čaj černý	12	163	125	5 - 600
Čaj ovocný	12	1061	405	10 - 5900
Kaše obilná dětská	12	88	10	5 - 680
Krupice pšeničná	12	48	42	5 - 100
Mouka hladká	12	231	100	30 - 980
Mouka polohrubá	12	216	145	30 - 530
Mouka hrubá	12	130	72	5 - 500
Vločky ovesné	12	10	5	5 - 32

\* U celkového počtu vláknitých mikroskopických hub < 10 KTJ/g byla pro výpočet aritmetického průměru a mediánu použita hodnota 1/2 limitu stanovitelnosti = 5 KTJ/g

<sup>1</sup> Vzhledem k detailnějšímu mykologickému sledování toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus* sekce *Nigri*, producentů ochratoxinu A a *Aspergillus* sekce *Flavi*, producentů aflatoxinů byl počet vzorků potravin dříve odebíraných v jednom roce monitorovacího období rozdělen do dvou let (2010 - 2011).

**e. 2**

***Aspergillus flavus***

Byla prokázána přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus flavus*, producentů aflatoxinů, celkem ve 11 vzorcích (tj. 18 %) uvedených typů potravin: kaše obilná dětská, čaj ovocný, čaj černý, mouka polohrubá, mouka hladká (viz tabulka č. 2).

Tabulka č. 2 :

**Frekvence výskytu potenciálně toxinogenních kmenů *Aspergillus flavus* v potravinách v roce 2010**

Potravina	Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem)	%
Kaše obilná dětská	6/12	50
Čaj ovocný	2/12	17
Čaj černý	1/12	8
Mouka polohrubá	1/12	8
Mouka hladká	1/12	8
<b>Celkem</b>	11/48	18

Index kontaminace ( $I_k$ ) *Aspergillus flavus* je uveden v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 :

**Index kontaminace ( $I_k$ ) *Aspergillus flavus* v roce 2010**

Počet izolátů	Označení izolátu	Izolován ze vzorku	Počet <i>A. flavus</i> (KTJ/g)	$I_k$
1	<i>Aspergillus flavus</i> 21/11	kaše obilná dětská	5	1
2	<i>Aspergillus flavus</i> 29/11	kaše obilná dětská	10	1
3	<i>Aspergillus flavus</i> 48/11	mouka polohrubá	20	0,038
4	<i>Aspergillus flavus</i> 49/11	mouka hladká	50	0,051
5	<i>Aspergillus flavus</i> 53/11	kaše obilná dětská	30	0,111
6	<i>Aspergillus flavus</i> 61/11	kaše obilná dětská	10	0,556
7	<i>Aspergillus flavus</i> 62/11	čaj černý	10	0,091
8	<i>Aspergillus flavus</i> 63/11	čaj ovocný	10	0,034
9	<i>Aspergillus flavus</i> 71/11	čaj ovocný	30	0,188
10	<i>Aspergillus flavus</i> 85/11	kaše obilná dětská	300	0,441
11	<i>Aspergillus flavus</i> 101/11	kaše obilná dětská	10	0,5

Toxinogenita izolovaných kmenů nebyla testována.

**e. 3**

***Aspergillus tamarii***

Přítomnost vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus tamarii* nebyla v tomto monitorovacím období prokázána.

**e. 4**

***Aspergillus* sekce *Nigri***

Potenciálně toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri* (producenti ochratoxinu A) byly stanoveny celkem ve 30 vzorcích (63 %) následujících potravin: rozinky, čaj ovocný, čaj černý, kaše obilná dětská (viz tabulka č. 4).

Tabulka č. 4:

**Frekvence výskytu potenciálně toxinogenních kmenů *Aspergillus* sekce *Nigri* v potravinách v roce 2011**

Potravina	Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem)	%
Rozinky	8/12	67
Čaj ovocný	11/12	92
Čaj černý	10/12	93
Kaše obilná dětská	1/12	8
Celkem	30/48	63

Index kontaminace ( $I_k$ ) *Aspergillus* sekce *Nigri* je uveden v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5:

**Index kontaminace ( $I_k$ ) izolovaných kmenů *Aspergillus* sekce *Nigri* v roce 2011**

Počet izolátů	Kmen izolován ze vzorku	Počet A. sekce <i>Nigri</i> (KTJ/g)	$I_k$
1	rozinky	4400	1,00
2	rozinky	330	1,00
3	rozinky	3000	1,00
4	rozinky	27	1,00
5	rozinky	77	1,00
6	rozinky	45	1,00
7	rozinky	1000	1,00
8	rozinky	130	1,00
9	čaj černý	400	1,00
10	čaj ovocný	5900	1,00
11	čaj ovocný	380	1,00
12	čaj černý	130	1,00
13	čaj ovocný	68	1,00
14	čaj černý	14	1,00
15	čaj ovocný	430	1,00

16	čaj černý	70	0,58
17	čaj černý	100	0,91
18	čaj ovocný	80	0,28
19	kaše obilná dětská	10	1,00
20	čaj černý	130	0,87
21	čaj ovocný	50	0,31
22	čaj černý	100	0,56
23	čaj ovocný	250	0,46
24	čaj černý	10	1,00
25	čaj ovocný	700	0,88
26	čaj černý	160	0,70
27	čaj ovocný	2300	1,00
28	čaj ovocný	1500	1,00
29	čaj černý	500	0,83
30	čaj ovocný	350	1,00

**e. 5**

**Stanovení aflatoxinů v potravinách**

Aflatoxiny nebyly ve sledovaných potravinách v tomto monitorovacím roce testovány.

**e. 6**

**Stanovení ochratoxinu A v potravinách**

Ochratoxin A nebyl ve sledovaných potravinách v tomto monitorovacím roce testován.

**e. 7**

***Penicillium crustosum***

Přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Penicillium crustosum* (potenciálního producenta mykotoxinu penitremu A) nebyla v tomto monitorovacím období prokázána.

**f.**

**Závěr**

Studie ("MYKOMON") nebude v roce 2012 v uvedené podobě již realizována. Získané výsledky ze studie "MYKOMON" v letech 1999 – 2011 budou prezentovány na konferenci Monitoringu v Milovech a publikovány v tuzemských a zahraničních časopisech.