

Mykologická analýza potravin

a.

Souhrn

Rok 2009 byl druhým rokem dvouletého monitorovacího období (2008-2009) 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 (2008 - 2009).

Specializované mykologické vyšetření bylo i nadále zaměřeno na popis a charakterizaci nebezpečí výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (plísní) v potravinách. Ve čtyřech odběrových termínech bylo odebráno 16 druhů komodit na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 192 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 potraviny) 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 potraviny) k celkovému počtu vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g potraviny).

Byla prokázána přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus flavus*, producentů aflatoxinů, celkem ve 17 vzorcích (tj. 16 %) uvedených typů potravin: těstoviny, rýže, mouka hladká, mouka hrubá, mouka polohrubá, kaše obilná dětská, vločky ovesné, čaj černý a čaj ovocný. Přítomnost toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus tamarii*, producentů aflatoxinů nebyla v tomto monitorovacím období prokázána.

Aflatoxiny nebyly ve vzorcích vyšetřovaných v tomto monitorovacím období zjištěny.

Potenciálně toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri* (potenciální producenti ochratoxinu A) byly stanoveny celkem ve 36 vzorcích (60 %) následujících potravin: rozinky, čaj černý, čaj ovocný, kaše obilná dětská a vločky ovesné. Nejčastěji se toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri* vyskytují v komoditách, u nichž jsou rovněž zjišťovány nejvyšší hodnoty celkových počtů plísní (rozinky, čaj černý, čaj ovocný). U těchto komodit se často jedná o monokulturu *Aspergillus* sekce *Nigri*, a tedy i vysoké počty KTJ této toxinogenní vláknité mikroskopické houby obsažené v jednom gramu potraviny. Je zde pak značná pravděpodobnost, že za vhodných podmínek může dojít v potravině k produkci ochratoxinu A.

Na základě těchto nálezů bylo 12 vzorků rozinek analyzováno na přítomnost ochratoxinu A. Ochratoxin A byl zjištěn ve 4 (33 %) z těchto 12 vzorků rozinek (aritmetický průměr 10,7 µg/kg, maximální hodnota 114 µg/kg).

b.

Spolupracující organizace a odborníci

Státní zdravotní ústav, Centrum laboratorních činností, Odbor laboratoří hygieny výživy a bezpečnosti potravin v Brně, Národní referenční centrum pro mikroskopické houby a jejich toxiny v potravinových řetězcích (MVDr. Vladimír Ostrý, CSc., Mgr. Jarmila Škarková, Pavlína Křemečková), Odbor podpory veřejného zdraví (kolektiv pracovníků) z následujících míst: Prahy, Brna, Ostravy, Plzně, Hradce Králové, Ústí nad Labem, Českých Budějovic, Žďáru nad Sázavou, Znojma, Jablonce nad Nisou, Benešova a Šumperka, Sbirka 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 :

AF_BM_01	Stanovení aflatoxinů v biologickém materiálu
OA_PK_02	Stanovení ochratoxinu A v potravinách a krmivech
M_PK_01	Stanovení mikromycetů v potravinách a krmivech
M_SM_01	Stanovení kontaminace prostředí laboratoře mikromycety (plísňemi)
MM_02	Příprava a sanitace LPPV při odběru vzorků pro mikrobiologické a mykologické vyšetření
AF/AP_TM_01	Stanovení a identifikace <i>Aspergillus flavus</i> a <i>Aspergillus parasiticus</i> v potravinách

Technické normy :

ČSN ISO 21527-1	<i>Stanovení počtu kvasinek a plísní (kultivační metoda)</i>
ČSN ISO 21527-2	<i>Stanovení počtu kvasinek a plísní (kultivační metoda)</i>
ČSN ISO 6887	<i>Všeobecné pokyny pro přípravu ředění při mikrobiologickém zkoušení</i>
ČSN ISO 7667	<i>Standardní struktura metod mikrobiologického zkoušení</i>
ČSN ISO 6611	<i>Mléko a mléčné výrobky- Stanovení počtu jednotek kvasinek a/nebo plísní tvořících kolonie</i>
ČSN ISO 13681	<i>Maso a masné výrobky- Stanovení počtu kvasinek a plísní- technika počítání kolonií</i>
ČSN ISO 7698	<i>Obiloviny, luštěniny a odvozené výrobky- Stanovení počtu bakterií, kvasinek a plísní</i>

e.

Výsledky laboratorní analýzy

V roce 2009 byla studie zaměřena na výskyt toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (plísní) - producentů aflatoxinů a ochratoxinu A v potravinách, s cílem získat další data o kontaminaci potravin v ČR.

Ve čtyřech termínech bylo odebráno 16 druhů komodit na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 192 vzorků potravin. V prvním odběrovém termínu byly mykologicky vyšetřeny následující komodity: salám trvanlivý tepelně opracovaný (2 druhy), salám trvanlivý fermentovaný (2 druhy), těstoviny, rýže a rozinky (celkem 84 vzorků). Ve druhém odběrovém termínu byl mykologicky vyšetřen sýr tvrdý Eidam (celkem 12 vzorků). Ve čtvrtém 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 2009 je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1:

Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g) v potravinách v roce 2009

Potravina	Počet vzorků n	Aritmetický průměr* (KTJ/g)	Medián* (KTJ/g)	Rozsah (min/max) (KTJ/g)
Čaj černý	12	561	345	110 - 2100
Čaj ovocný	12	4379	2350	150 - 19000

Kaše obilná dětská	12	43	5	<10 - 250
Krupice pšeničná	12	51	36	18 - 140
Mouka hladká	12	698	385	77 - 3900
Mouka hrubá	12	49	41	<10 - 150
Mouka polohrubá	12	126	116	55 - 260
Rozinky	12	5446	260	<10 - 47000
Rýže	12	18	5	<10 - 64
Salám trvanlivý fermentovaný 1	12	37	5	<10 - 230
Salám trvanlivý fermentovaný 2	12	413	12	<10 - 3900
Salám trvanlivý tepelně opracovaný 1	12	65	5	<10 - 350
Salám trvanlivý tepelně opracovaný 2	12	219	5	<10 - 2100
Sýr tvrdý Eidam	12	172	5	<10 - 1800
Těstoviny	12	33	5	<10 - 220
Vločky ovesné	12	35	16	<10 - 140

* 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

e. 2

Aspergillus flavus

Byla prokázána přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus flavus*, producentů aflatoxinů, celkem ve 17 vzorcích (tj. 16 %) uvedených typů potravin: těstoviny, rýže, mouka hladká, mouka hrubá, mouka polohrubá, kaše obilná dětská, vločky ovesné, čaj černý a čaj ovocný (viz tabulka č. 2).

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

Toxinogenita izolovaných kmenů nebyla testována.

Tabulka č. 2 :

Frekvence výskytu potenciálně toxinogenních kmenů *Aspergillus flavus* v potravinách v roce 2009

Potravina	Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem)	%
Čaj černý	3 / 12	25
Čaj ovocný	1 / 12	8
Kaše obilná dětská	1 / 12	8
Mouka hladká	4 / 12	33
Mouka hrubá	2 / 12	17
Mouka polohrubá	1 / 12	8
Rýže	1 / 12	8
Těstoviny	2 / 12	17
Vločky ovesné	2 / 12	17

Celkem	17 / 108	16
---------------	----------	----

Tabulka č. 3 :

Index kontaminace (I_k) *Aspergillus flavus* v roce 2009

Počet izolátů	Označení izolátu	Izolován ze vzorku	Počet <i>A. flavus</i> (KTJ/g)	I_k	Toxinogenita
1	<i>Aspergillus flavus</i> 116A	čaj černý	20	0,095	n
2	<i>Aspergillus flavus</i> 172A	čaj černý	20	0,059	n
3	<i>Aspergillus flavus</i> 124A	čaj černý	56	0,400	n
4	<i>Aspergillus flavus</i> 165A	čaj ovocný	100	0,032	n
5	<i>Aspergillus flavus</i> 115	kaše obilná dětská	10	0,278	n
6	<i>Aspergillus flavus</i> 119A,B	mouka hladká	12	0,041	n
7	<i>Aspergillus flavus</i> 143A,B	mouka hladká	35	0,097	n
8	<i>Aspergillus flavus</i> 151	mouka hladká	80	0,195	n
9	<i>Aspergillus flavus</i> 159	mouka hladká	82	0,195	n
10	<i>Aspergillus flavus</i> 160	mouka hrubá	10	0,122	n
11	<i>Aspergillus flavus</i> 184	mouka hrubá	10	0,067	n
12	<i>Aspergillus flavus</i> 158	mouka polohrubá	10	0,182	n
13	<i>Aspergillus flavus</i> 42	ryže	5	1,000	n
14	<i>Aspergillus flavus</i> 20	těstoviny	30	0,136	n
15	<i>Aspergillus flavus</i> 27B	těstoviny	23	0,500	n
16	<i>Aspergillus flavus</i> 121	vločky ovesné	11	0,478	n
17	<i>Aspergillus flavus</i> 153	vločky ovesné	10	0,714	n

e. 3***Aspergillus tamarii***

Přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus tamarii* producentů aflatoxinů nebyla ve vzorcích 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 36 vzorcích (60 %) následujících potravin: rozinky, čaj černý, čaj ovocný, kaše obilná dětská a vločky ovesné (viz tabulka č. 4). Nejčastěji se toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri* vyskytují v komoditách, u nichž jsou rovněž zjišťovány nejvyšší hodnoty celkových počtů plísní (rozinky, čaj černý,

čaj ovocný). U těchto komodit se často jedná o monokulturu *Aspergillus* sekce *Nigri* ($I_k = 1,00$), a tedy i vysoké počty KTJ této toxinogenní vláknité mikroskopické houby obsažené v jednom gramu potravin. Je pak značná pravděpodobnost, že za vhodných podmínek může dojít v potravině k produkci ochratoxinu A.

Tabulka č. 4:

Frekvence výskytu potenciálně toxinogenních kmenů *Aspergillus* sekce *Nigri* v potravinách v roce 2009

Potravina	Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem)	%
Čaj černý	12 / 12	100
Čaj ovocný	12 / 12	100
Kaše obilná dětská	1 / 12	8
Rozinky	10 / 12	83
Vločky ovesné	1 / 12	8
Celkem	36 / 60	60

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 2009

Počet izolátů	Označení izolátu	Izolován ze vzorku	Počet A. sekce <i>Nigri</i> (KTJ/g)	I_k
1	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 5	rozinky	45	1,00
2	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 12	rozinky	2000	1,00
3	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 19	rozinky	13000	1,00
4	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 33	rozinky	160	1,00
5	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 40	rozinky	360	1,00
6	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 47	rozinky	410	1,00
7	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 54	rozinky	47000	1,00
8	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 61	rozinky	21	0,78
9	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 68	rozinky	2300	1,00
10	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 82	rozinky	41	1,00
11	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 116B	čaj černý	160	0,76
12	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 117	čaj ovocný	50	0,33
13	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 124B	čaj černý	84	0,60
14	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 125	čaj ovocný	670	0,67
15	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 132A,B	čaj černý	1600	1,00

16	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 133	čaj ovocný	2100	1,00
17	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 140A,B	čaj černý	110	1,00
18	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 141	čaj ovocný	920	0,16
19	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 148	čaj černý	120	0,80
20	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 149	čaj ovocný	700	0,32
21	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 156A,B	čaj černý	550	1,00
22	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 157A,B	čaj ovocný	180	0,90
23	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 164A,B	čaj černý	2100	1,00
24	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 165B,C	čaj ovocný	2900	0,94
25	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 171	kaše obilná dětská	5	1,00
26	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 172B,C	čaj černý	300	0,88
27	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 173	čaj ovocný	950	0,05
28	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 177	vločky ovesné	30	0,33
29	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 180	čaj černý	170	0,89
30	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 181	čaj ovocný	12000	1,00
31	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 188A,B	čaj černý	430	0,90
32	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 189A,B	čaj ovocný	1200	0,33
33	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 196A,B	čaj černý	480	0,94
34	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 197	čaj ovocný	700	0,64
35	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 204	čaj černý	330	0,94
36	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 205	čaj ovocný	2500	1,00

e. 5

Stanovení aflatoxinů v potravinách

Aflatoxiny nebyly ve vzorcích vyšetřovaných v tomto monitorovacím období zjištěny.

e. 6

Stanovení ochratoxinu A v potravinách

Na základě výskytu toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus* sekce *Nigri* bylo provedeno analytické vyšetření 12 vzorků rozinek na obsah ochratoxinu A metodou HPTLC. Ochratoxin A byl zjištěn ve 4 vzorcích (33 %) rozinek (aritmetický průměr 10,7 µg/kg, maximální hodnota 114 µg/kg). U ostatních vzorků rozinek byl ochratoxin A pod mezí stanovitelnosti použité analytické metody.

f.

Závěr

Z výsledků projektu ("MYKOMON") v roce 2009 vyplývá doporučení :

- i nadále zaměřit cílenou kontrolu dozorových organizací na sladkou papriku a černý pepř z hlediska výskytu ochratoxinu A a na sladkou papriku z hlediska možného výskytu aflatoxinů,
- provést identifikaci izolátů *Aspergillus* sekce *Nigri* s využitím molekulárně-biologických metod a ověřit nové přístupy v testování toxinogenity uvedených izolátů z hlediska produkce ochratoxinu A.