

Mykologická analýza potravin

a.

Souhrn

V roce 2010 byl zahájen 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 (plísňí) v potravinách. Ve čtyřech odběrových termínech bylo odebráno 13 druhů komodit na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 156 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 3 vzorcích (tj. 8 %) uvedených typů potravin: těstoviny, pepř černý a hrách.

Potenciálně toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri* (potenciální producenti ochratoxinu A) byly stanoveny celkem v 7 vzorcích (29 %) následujících potravin: kmín a pepř černý.

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

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 (doc. MVDr. Vladimír Ostrý, CSc., Mgr. Jarmila Škarková, Pavlína Křemečková), 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 :

M_PK_01

Stanovení mikromycetů v potravinách a krmivech

M_SM_01

Stanovení kontaminace prostředí laboratoře mikromycety (plísněmi)

MM_01

Příprava a sanitace LPPV při odběru vzorků pro mikrobiologické a mykologické vyšetření

AF/AP_TM_01

Stanovení a identifikace toxinogenních mikromycetů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* v potravinách

Technické normy :

ČSN ISO 21517 *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontalní 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 plísní tvořících kolonie*

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

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

e.

Výsledky laboratorní analýzy

V roce 2008 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 13 druhů komodit¹ na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 156 vzorků potravin. V prvním odběrovém termínu byly mykologicky vyšetřeny následující komodity: salám trvanlivý tepelně opracovaný (2 druhy), salám trvanlivý fermentovaný (2 druhy), těstoviny, rýže (celkem 72 vzorků). Ve druhém odběrovém termínu byl mykologicky vyšetřen sýr tvrdý Eidam (celkem 12 vzorků). Ve třetím odběrovém termínu byly mykologicky vyšetřeny: paprika sladká, kmín, pepř černý (celkem 36 vzorků). Ve čtvrtém odběrovém termínu byly mykologicky vyšetřeny: čočka, hrách, ořechy vlašské (celkem 36 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).

Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub

Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g) v potravinách v roce 2010 je uvedeno v tabulce č. 1.

¹ 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).

Tabulka č. 1:

**Stanovení celkového počtu vláknitých vláknitých mikroskopických hub (KTJ/g)
v potravinách v roce 2010**

Potravina	Počet vzorků n	Aritmetický průměr* (KTJ/g)	Medián* (KTJ/g)	Rozsah (min/max) (KTJ/g)
Čočka	12	49	5	<10 - 370
Hrách	12	120	5	<10 - 1000
Kmín	12	1771	620	<10 - 6400
Ořechy vlašské	12	4230	87	<10 - 49000
Paprika sladká	12	406	5	<10 - 4800
Pepř černý	12	4111	14	<10 - 25000
Rýže	12	639	39	<10 - 4400
Salám trvanlivý fermentovaný 1	12	10	5	<10 - 64
Salám trvanlivý fermentovaný 2	12	6	5	<10 - 18
Salám trvanlivý tepelně opracovaný 1	12	24	5	<10 - 190
Salám trvanlivý tepelně opracovaný 2	12	59	5	<10 - 590
Sýr tvrdý Eidam	12	133	30	<10 - 730
Těstoviny	12	10	5	<10 - 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

Aspergillus flavus

Byla prokázána přítomnost potenciálně toxinogenních vláknitých mikroskopických hub *Aspergillus flavus*, producentů aflatoxinů, celkem ve 3 vzorcích (tj. 8 %) uvedených typů potravin: těstoviny, pepř černý a hrách (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 2010**

Potravina	Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem)	%
Hrách	1 / 12	8
Pepř černý	1 / 12	8
Těstoviny	1 / 12	8
Celkem	3 / 36	8

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	Toxinogenita
1	<i>Aspergillus flavus</i> 166	hrách	10	0,030	N
2	<i>Aspergillus flavus</i> 108A	pepř černý	50	0,091	N
3	<i>Aspergillus flavus</i> 11	těstoviny	5	1,000	N

Aspergillus tamarii

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

Aspergillus* sekce *Nigri

Potenciálně toxinogenní vláknité mikroskopické houby *Aspergillus* sekce *Nigri*, producenti ochratoxinu A, byly stanoveny celkem v 8 vzorcích (22 %) následujících potravin: rýže, paprika sladká a pepř černý (viz tabulka č. 4).

Tabulka č. 4:

Frekvence výskytu potenciálně toxinogenních kmenů *Aspergillus* sekce *Nigri* v potravinách v roce 2010

Potravina	Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem)	%
Kmín	3 / 12	25
Pepř černý	4 / 12	33
Celkem	7 / 24	29

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 2010

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> 86	kmín	2300	0,489
2	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 92	kmín	30	0,330
3	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 119	kmín	100	0,154
4	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 93	pepř černý	20000	0,800
5	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 108B	pepř černý	400	0,727
6	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 111	pepř černý	5	1,000
7	<i>Aspergillus</i> sekce <i>Nigri</i> 120	pepř černý	50	0,071

Stanovení aflatoxinů v potravinách

Aflatoxiny nebyly ve sledovaných potravinách v tomto monitorovacím roce testovány.

Stanovení ochratoxinu A v potravinách

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

Penicillium crustosum

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

f.

Závěr

Z výsledků projektu ("MYKOMON") v roce 2010 vyplývá doporučení :

- i nadále zaměřit cílenou kontrolu dozorových organizací na sladkou papriku, černý pepř a kmín z hlediska výskytu potenciálně toxinogenních mikroskopických hub *Aspergillus flavus* a *Aspergillus* sekce *Nigri*.
- 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.