

Toxinogenní vláknité mikroskopické houby a mykotoxiny v potravinách

Toxinogenní vláknité mikroskopické houby patří k významným biologickým agens, která mohou prostřednictvím kontaminovaných potravin ovlivnit zdraví člověka. To je dáno zejména vhodnými podmínkami, jež tyto houby mají pro svůj růst, rozšiřování a produkci mykotoxinů. Z potravin bylo popsáno na základě současných poznatků více než 70 druhů toxinogenních vláknitých mikroskopických hub (dále jen toxinogenní houby; viz tab. 1).

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity toxinogenních hub jedovaté pro člověka a další živé organismy, ale nikoli nezbytné pro růst a rozmnožování těchto hub, na rozdíl od jejich primárních metabolitů (např. aminokyselin, mastných kyselin nebo proteinů). Jako důvod, proč jsou mykotoxiny houbami produkovány, se uvádí, že představují obranný prostředek v konkurenčním „boji o substrát a o přežití“.

Jde o strukturně různorodé komplexní organické sloučeniny nebilkovinné povahy o nízké relativní molekulové hmotnosti (většinou 200–500). K nejvýznamnějším mykotoxinům, které se mohou vyskyto-

vat v potravinách, patří aflatoxiny (B_1 , G_1 , B_2 , G_2 , M_1), ochratoxin A, patulin, citrinin, kyselina cyklopiazonová, fumonisiny, trichoteceny (např. deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin), zearalenon, alternariové mykotoxiny (kyselina tenuazonová, alternariol, altenuen, altertoxiny ad.) a sterigmatocystin. Zatím známe přes 400 mykotoxinů a jejich metabolitů, i nadále jsou objevovány a chemicky charakterizovány „nové“ typy (např. konjugáty mykotoxinů se sacharidy). V odborné veřejnosti se aktuálně intenzivně diskutuje otázka výskytu několika mykotoxinů v potravinách zároveň a následně společné dietární expozice



1 Jablko s nárůstem štětičkovce rozšířeného (*Penicillium expansum*), producenta patulinu (s toxickými účinky na trávicí trakt a ledviny u laboratorních potkanů). Foto V. Ostrý

(co-occurrence/co-exposure). K růstu toxinogenních hub a produkci mykotoxinů v potravinových surovinách může docházet jak na poli ještě před sklizní a po sklizni, tak při uložení ve skladech a uchování potravin v domácnostech (obr. 1). Mykotoxiny se vytvářejí v myceliu hub, vzácněji ve sporách a většinou rychle pronikají do substrátu, včetně kontaminovaných potravin.

Produkcí mykotoxinů ovlivňují různé fyzikální, biologické a chemické faktory:

- vlhkost – potřebná je vyšší vodní aktivita (a_w) potravin, např. $a_w > 0,85$ pro produkci aflatoxinů a ochratoxinu A (vodní aktivita vyjadřuje obsah vody, která není v potravinovém substrátu chemicky vázána a je přístupná mikroorganismům);
- množství spor – vhodné inokulum životaschopných spor (nejčastěji konidií) pro přirozenou kontaminaci substrátu;
- teplota – např. optimální teplota pro produkci aflatoxinů a ochratoxinu A je blízká teplotě optimální pro růst toxinogenních hub (tedy 25–30 °C), u jiných mykotoxinů, např. zearalenonu produkovaného druhem *Fusarium graminearum*, se uvádí teplota pro optimální růst 15–25 °C a pro produkci deoxynivalenolu minimálně 15 °C;
- konkurenční mykobiota – při současné přítomnosti kropidláků rodu *Aspergillus* sekce *Nigri* a kropidláku žlutého (*A. flavus*) v potravinách může docházet k inhibici produkce aflatoxinů;
- substrát – obsah konzervačních látek (např. kyseliny sorbové a propionové) snižuje produkci mykotoxinů, stejně jako výskyt přírodních látek s inhibičním účinkem (např. eugenolu, thymolu a anetolu);
- mikrobiální interakce – přítomnost vybraných kvasinek může inhibovat růst toxinogenních hub a produkci mykotoxinů (např. po inokulaci sladového ječmene kulturou *Galactomyces candidus* dochází k inhibici růstu rodů *Fusarium*, *Penicillium* a *Aspergillus*, a tím k omezení výskytu mykotoxinů a přepěňování piva);
- přítomnost CO_2/O_2 – většina vláknitých hub potřebuje pro růst a produkci mykotoxinů kyslík, nedostatek kyslíku (méně než 0,5 %) brání tvorbě aflatoxinů a fumonisinu B_1 , produkce ochratoxinu A kropidlákem okrovým (*A. ochraceus*) není možná v prostředí s 30 % oxidu uhličitého (to má praktický význam pro skladování potravinových surovin);

Tab. 1 Významní producenti mykotoxinů v potravinových surovinách a potravinách

Mykotoxin	Producent
Aflatoxin B_1 , B_2	<i>Aspergillus flavus</i>
Aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Altenuen	<i>Alternaria alternata</i>
Alternariol	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. capsici-anui</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. cucumerina</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. kikuchiana</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. tomato</i>
Alternariol monometyléter	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. capsici-anui</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. cucumerina</i> , <i>A. dauci</i> , <i>A. kikuchiana</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. porri</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. tomato</i>
Citrinin	<i>Monascus ruber</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. radicola</i> , <i>P. verrucosum</i>
Deoxynivalenol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Fumonisin	<i>F. anthophilum</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. verticillioides</i>
Kyselina cyklopiazonová	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Kyselina tenuazonová	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. capsici-anui</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. japonica</i> , <i>A. kikuchiana</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. mali</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. porri</i> , <i>A. radicina</i> , <i>A. solani</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. tomato</i>
Námelové alkaloidy	<i>Claviceps fusiformis</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. purpurea</i>
Nivalenol	<i>Fusarium crookwellense</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. venenatum</i>
Ochratoxin A	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. lacticoffeatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. sclerotioniger</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Patulin	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssoschlamys nivea</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Sterigmatocystin	<i>Aspergillus versicolor</i>
T-2 a HT-2 toxiny	<i>Fusarium langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i>
Zearalenon	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>

- doba inkubace – v experimentální studii s kropidlákem žlutým a kontaminací chleba jsme zjistili vyšší obsah aflatoxinů po 48 hod. inkubace oproti měření po 24 hod.;
- mechanické poškození potraviny – významné např. u jablek s následnou kontaminací štětičkovcem rozšířeným (*P. expansum*) a produkcí patulinu (obr. 1);
- poškození plodiny hmyzem (larvami motýlů a brouků) – důležitý faktor např. u kukuřice s následnou kontaminací druhem *Fusarium verticillioides* a produkcí fumonisinu B₁.

Asi 20 mykotoxinů má na základě současných poznatků významný vliv v potravinách a v pracovním a životním prostředí člověka, vykazují řadu toxických účinků, a závažné jsou jejich mutagenní a karcinogenní účinky. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny při Světové zdravotnické organizaci (IARC/WHO) se sídlem ve francouzském Lyonu se zabývá mimo jiné hodnocením karcinogenního rizika těchto látek a klasifikací karcinogenních mykotoxinů. Dosud byly kategorizovány jako prokázané karcinogeny pro člověka pouze aflatoxiny (skupina 1). Ochratoxin A, fumonisiny a fusarin C byly zařazeny mezi možné karcinogeny pro člověka (skupina 2B). Mykotoxiny dále vykazují účinky teratogenní, estrogenní, hemoragické (ovlivňující krvácení), dále toxické působení na nervovou soustavu, buňky, funkci ledvin a jater. Za závažné se považují imunopresivní účinky (snížení obranyschopnosti organismu) a riziko pozdního toxického působení (zejména karcinogenní riziko a vývojová toxicita) po příjmu nízkých jednorázových nebo opakovaných koncentrací mykotoxinů v potravinách. Základní toxikologický výzkum „nově objevených“ a „starých“ mykotoxinů nebyl zatím ukončen a nadále probíhá. Obdobně tomu je i u hodnocení zdravotního rizika mykotoxinů v potravinách.

Na základě recentních výsledků je v ČR riziko akutní otravy mykotoxiny obvykle považováno za minimální. Jejich přítomnost v potravinách se kontroluje a omezuje ve většině států světa. V Evropské unii jsou mykotoxiny v potravinách limitovány nařízením Komise (ES) č. 1881/2006 v platném znění, jde o aflatoxiny (aflatoxin B₁, suma aflatoxinů B₁, B₂, G₁ a G₂, aflatoxin M₁), deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A, fumonisiny, T-2 toxin a HT-2 toxin, citrinin a námellová sklerocia (v procesu schvalování jsou vybrané námellové alkaloidy). Z praktických příkladů je např. zajímavé, že vedle výskytu aflato-



2

2 Kontaminace potravin houbami se nevyhýbá ani nápojům. Slazený černý čaj s koloniemi několika druhů mikromycetů, mezi nimi i kropidláku žlutého (*Aspergillus flavus*), producenta aflatoxinů B₁ a B₂

3 Zrna kukuřice (zakoupená v Panamě) kolonizovaná pravděpodobně také druhem *A. flavus*. Snímky O. Koukola, pokud není uvedeno jinak

4 Dlouhodobé průměry ročních teplot vzduchu v České republice, včetně trendu vývoje v letech 1961–2099. Mapa dostupná na portálu Českého hydrometeorologického ústavu (<http://portal.chmi.cz>)

xinů v arašídách, který je již dobře popsán a zmapován, byly zachyceny vysoké koncentrace ochratoxinu A ve výtazku z kořene kozince blanitého (*Astragalus propinquus*, syn. *A. membranaceus*), který se využívá jako léčivá bylina.

Záchyt mykotoxinů v potravinách je často hlášen v Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF). Tento systém slouží pro ohlašování rizikových potravin a krmiv za účelem zamezení jejich uvádění do oběhu nebo kvůli jejich stažení ze společného evropského trhu. Základním kritériem pro oznámení zasilané prostřednictvím RASFF je poznatek, že výrobek (potravina) představuje přímé nebo nepřímé riziko pro zdraví a bezpečnost spotřebitele. V případě výskytu mykotoxinů jde především o překročení hygienických limitů stanovených ve výše uvedeném nařízení. Před mykology, mykotoxikology, pracovníky v ochraně veřejného zdraví, dozorových organizací a výzkumníky vyvstává v posledních letech řada výzev a témat k řešení ve spojitosti s toxikogenními houbami a mykotoxiny v potravinách. Pro potřeby tohoto článku jsme vybrali následující dvě výzvy/témata.

Změna klimatu a globální oteplování

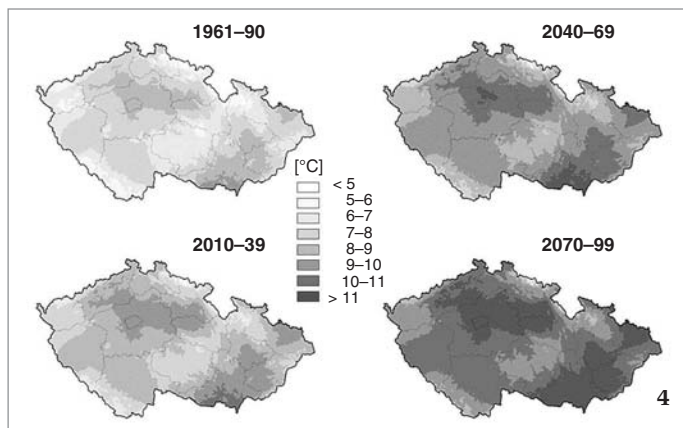
Podle Mezivládního panelu pro změny klimatu (Intergovernmental Panel on Climate Change) dochází v Evropě ke změně klimatu, která se projevuje četnějším výskytem a častějším střídáním extrémních projevů počasí (teplý, mráz, sucho, povodně, vichřice), změnou vodní bilance v krajině a v posledních třech desetiletích nárůstem průměrné teploty o 0,45 °C. Český hydrometeorologický ústav uvádí dlouhodobé průměry ročních teplot vzduchu v ČR včetně trendu vývoje do r. 2099 (obr. 4). Z nich vyplývá, že k nejteplejším a nejnižším oblastem v ČR budou patřit střední Čechy a jižní Morava.

Odborníci konstatují, že v důsledku změny klimatu v Evropě dochází k šíření významných toxikogenních hub, a to především zástupců řádu plesnivkotvaré (Eurotiales, vřecovýtusné houby), jako jsou kropidlák žlutý (producent aflatoxinů B₁ a B₂), kropidlák *A. carbonarius* (ochratoxin A), a zástupců řádu masenkotvaré (Hypocreales) jako *Fusarium verticillioides* (fumonisiny).

Diskutuje se také, do jaké míry dojde v důsledku změny klimatu ke změně v ekologii „tuzemských“ toxikogenních hub (např. producentů fuzariových a alternariových mykotoxinů) a změně jejich druhového zastoupení (např. rodu *Fusarium*, černí střídávka – *Alternaria alternata* a štětičkovec rozšířený) při osídlení kulturních plodin, které by mělo vést ke zvýšení produkce mykotoxinů. Toto tvrzení je již možné doložit následující kazuistikou. V Maďarsku, Srbsku a Itálii byl v kukuřici ze sklizně 2012 a 2013 zjištěn, oproti předcházejícím letům, vyšší výskyt kropidláku žlutého a následná kontaminace aflatoxinem B₁. To se projevilo po zkrmení kukuřice dojnými zvířaty zvýšeným výskytem aflatoxinu M₁ v kravském mléce. Druhý případ se týkal celé Evropy včetně České republiky a potravinářské kukuřice ze sklizně 2014. Tehdy byl proveden záchyt relativně vysokých koncentrací fuzariových mykotoxinů (deoxynivalenonu, zearalenonu a fumonisinů), který převyšoval jejich povolené limity. Asociace Euromai-ziers, sdružující pracovníky kukuřice, se obrátila na Výbor pro zemědělské kontaminanty při DG SANTE (generální ředitelství pro zdraví a bezpečnost potravin) Evropské komise s žádostí o zmírnění hygienických limitů pro uvedené mykotoxiny v potravinářské kukuřici ze sklizně 2014. Žádosti však komise nevyhověla.



3



4

Omezení výskytu mykotoxinů v potravinách v rozvojových zemích

● Aflatoxiny

K tomuto tématu nás přivedla dvouměsíční stáž (TDS Fellowship Program) pracovníků Centrální laboratoře pro bezpečnost potravin z Beninu v západní Africe, která proběhla v laboratořích Státního zdravotního ústavu, Centra pro zdraví, výživu a potraviny v Brně, v rámci pomoci rozvojovým zemím Afriky. Zúčastnění projevili mimo jiné velký zájem o problematiku toxinogenních hub a mykotoxinů v potravinách.

Proč právě rozvojové země? Vysoká teplota, vysoká relativní vlhkost a výskyt toxinogenních hub v půdě představují vhodné podmínky pro osídlení kulturních plodin těmito houbami a zvýšenou produkci mykotoxinů, především aflatoxinů. Po dietární expozici vysokým koncentracím aflatoxinů dochází k akutní aflatoxikóze. Často se vyskytovala v 80. letech 20. stol. v Etiopii a dalších zemích Afriky a Asie. Úmrtí 125 lidí v oblasti Makueni v Keni v r. 2004 po konzumaci pokrmů z kukuřice silně kontaminované aflatoxiny svědčí, že nejde o historickou záležitost.

Je z této situace východisko? Jedním může být aplikace přípravku AflasafeTM. Aflasafe byl vyvinut skupinou vědců z rozvinutých zemí za vydatné finanční podpory Nadace Billa a Melindy Gatesových a poprvé byl použit k ochraně kukuřice v Nigérii. Jde o semena obiloviny širokou naočkovaná konidiami netoxinogenního L-kmene *A. flavus*. Čirok slouží jako nosič a substrát pro konidie *A. flavus*. Aflasafe se aplikuje rozsevem do půdy 2–3 týdny před kvetením kukuřice v množství 10 až 20 kg/ha porostu. V půdě konidie vyklíčí na semenech čiroku a následně dochází ke

kompetitivním vztahům mezi toxinogenními a netoxinogenními kmeny *A. flavus*, které se projeví snížením kontaminace palic kukuřice aflatoxiny o více než 80 %. Aflasafe byl použit nebo se plánuje k použití i v dalších zemích Afriky (např. Ghana, Keni, Malawi, Mozambiku, Senegal, Tanzanie a Ugandě) a zdá se, že může mít pozitivní dopady jak v ochraně veřejného zdraví, tak i v ekonomické oblasti.

● Fumonisin

Po konzumaci kukuřičných tortill a dalších kukuřičných pokrmů s fumonisinem v koncentraci vyšší než 6 000 µg/kg se projevuje u plodu těhotných žen v prvním trimestru těhotenství teratogenní efekt spina bifida cystica, kdy při vývoji neurální trubice plodu nedochází k jejímu uzavření. Spina bifida cystica patří do skupiny defektů způsobených zejména nedostatkem kyseliny listové (folátů) ve stravě těhotných. Podíl fumonisinů na vzniku tohoto postižení byl toxikology velmi dobře popsán a vysvětlen. Fumonisin způsobuje rozvrat biosyntézy sfingolipidů v buněčné membráně a zabraňuje transportu folátů do buňky. Prevalence výskytu spina bifida cystica ve spojitosti s fumonisinem je nejvyšší v Guatemale (až 150 případů na 10 000 narozených kojenců), kde kukuřice představuje základní složku potravy (obr. 3) a slouží k přípravě pokrmů.

Odborníci doporučují pěstování transgeneticky modifikované kukuřice obsahující transgeny z bakterie *Bacillus thuringiensis*, jež se exprimují v podobě Bt toxinů (δ toxinů). Ty účinně působí proti vývojovým stádiím zavírače kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) a bročka bázlivce kukuřičného (*Diabrotica virgifera*; viz také Živa 2004, 2: 54–56

a 2012, 2: 55–56), čímž se minimalizuje poškození kukuřice jejich požerem, a tudíž i vstupní brána pro toxinogenní houby. Fumonisin v kukuřici lze omezit i po sklizni. Od dob mayské civilizace je znám technologický postup zvaný nixtamalizace. Zrno kukuřice se vaří v zásaditém roztoku vápna, následně se propere pitnou vodou a po usušení se pomele na kukuřičnou mouku. Vedle zvýšení stravitelnosti a výživové hodnoty dochází k výraznému snížení obsahu fumonisinů.

Závěrem bychom zmínili, že profesní život mykologa přináší řadu aktuálních úkolů. Jde o vyhledávání nových expozičních zdrojů mykotoxinů (výskyt mykotoxinů nebo jejich producentů v potravinách). S tím souvisí rozvoj analytických metod imunochemických (např. ELISA) a chromatografických (např. LC-MS/MS) ke stanovení mykotoxinů. Neméně významná pozornost se věnuje výzkumu nových producentů mykotoxinů v potravinách (např. kropidlák černý – *A. niger* a produkce fumonisinů B₂ a B₄ v hroznech révy vinné a v rozinkách), metabióze (dříve se vyvíjející druh mikroorganismu vytváří vhodné podmínky pro druh pozdější) toxinogenních hub s bakteriálními patogeny v potravinách a tvorbě biofilmu v potravinách. S těmito úkoly pak souvisí rozvoj molekulárněbiologických metod k detekci a identifikaci toxinogenních hub.

Článek vznikl s podporou Ministerstva zdravotnictví ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330).

Použitou literaturu uvádíme na webové stránce Živy.

Ivana Borovičková

Metody dlouhodobého uchování mikroskopických hub

Získání čisté houbové kultury (izolátu) z prostředí je náročný proces a každý, kdo s izoláty pracuje, musí dříve či později řešit otázku jejich dlouhodobého uchování. Je potřeba zachovat nejen životaschopnost, ale také morfologické, fyziologické a genetické vlastnosti, protože jen tak se dají využít k dalšímu studiu. V historii výzkumu hub, kvasinek a bakterií bylo vyvinuto mnoho metod, které se v různé míře používají dodnes. Tento příspěvek věnujeme především uchování saprotrofních mikroskopických hub (mikromycetů). U parazitických mikromycetů často potřebujeme složitější metody, včetně např. pěstování nebo chovu jejich hostitele.

Základními metodami uchování houbových kmenů (jako kmen označujeme izolát uložený do sbírký a alespoň částečně charakterizovaný svými vlastnostmi) jsou růst v kultuře, sušení a mražení. Zatím-

co aktivní růst v kultuře bývá krátkodobý (nejvýše dva roky), sušení a mražení jsou základem dlouhodobého uchování – po desítky let. Jakou metodu použijeme, záleží především na vlastnostech konkrétního druhu houby (zejména jeho schopnosti sporulace nebo vytváření klidových stadií), dále na účelu a předpokládané době uchování a v neposlední řadě na přístrojové a finanční vybavenosti laboratoře. Z těchto důvodů se ve sbírkách kultur hub obvykle využívají minimálně dva způsoby zároveň.

Uchování na šikmém agaru

Jde o agarové médium nalité do zkumavky a ztuhlé na šikmé ploše, která je výhodná z hlediska větší plochy pro očkování (viz obr. 1). Kultury můžeme skladovat v chladničce při 5 °C po dobu několika měsíců až dvou let. Každý kmen se obvykle uchovává na dvou médiích, z nichž jed-

no je na živiny bohaté a druhé chudé. Při dalším očkování (přenesení malého množství houby – inokula – sterilní jehlou na nové médium) se houby přemísťují z chudého média na bohaté a naopak. Tím se limituje ztráta schopnosti izolátů sporulovat a produkovat sekundární metabolity. Pro dlouhodobé udržení se všeobecně doporučují spíše chudá média, zatímco pro obnovení růstu se naopak používají bohatší média zvolená tak, aby co nejvíce odpovídala přirozenému stanovišti houby. Vedle základních chemikálií pro přípravu médií tak v naší laboratoři objevíte i přírodní suroviny jako slepičí peří, zaječí trus, listy banánovníku nebo dětské vlasy. Přes veškerou péči však kmeny v kultuře postupně degradují – ztrácejí schopnost vytvářet spory a produkovat sekundární metabolity, může docházet ke změnám na molekulární úrovni a nemalým rizikem je kontaminace kultur a jejich vysychání. Pro zachování vlastností kmene je tudíž vhodnější použít metody dlouhodobého udržování v inaktivním stavu.

Uchování pod parafinovým olejem

Sterilním parafinovým olejem se buď napouštějí zátky zkumavek s kulturou na šikmém agaru, nebo se jím zalévají přímo samotné kultury. Vrstva oleje chrání kulturu před vysušením, kontaminací, oxidací