

## 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 Aflasafe<sup>TM</sup>. 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*. Čírok 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 číroku 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, Tanzani 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 zavíječky kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) a brouka 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 B<sub>2</sub> a B<sub>4</sub> 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 saprofitních 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 sbírků 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



a celkově prodlužuje interval mezi přechováním až na několik let.

### Uchovávání ve sterilní vodě

Tento jednoduchý, ale účinný způsob je vhodný pro sporující kmeny. Spory či výřezy kolonií se umístí ve vialkách (skleněných lahvičkách s víčkem) nebo zkumavkách v malém množství sterilní destilované vody při pokojové teplotě. Délka přežití se liší druh od druhu, ale může dosáhnout 10 i více let.

### Vysoušení kultur na nosičích

Sušení je levná a snadná metoda vhodná především pro kmeny sporující nebo vytvářející klidová stadia. Kultury se obvykle suší na nosičích, na nichž se buď houba nechá vyrůst, nebo se s nimi smíchá až suspenze z kultury. Používá se silikagel, skleněné kuličky nebo půda. Sypká konzistence sušené kultury je výhodou při inokulaci větších ploch, např. během terénních experimentů. V chladničce v uzavřených lahvičkách může životaschopnost dosahovat 10 i více let.

### Alginátové pelety

Tento modifikovaný postup sušení kultur je vhodný rovněž pro nesporující kmeny. Suspenze spor se promíchá v roztoku alginátu sodného s práškem z otrub. Směs se pak kape do 10% roztoku chloridu vápenatého, přičemž dochází k tunutí alginátu v podobě kuliček (stejná reakce se využívá v molekulární kuchyni např. při výrobě okurkového kaviáru). Kuličky (pelety) se vysuší (obr. 2) a uloží v lednici. Podle našich zkušeností takto uchovávané mikromycety zůstanou životaschopné minimálně 7 let.

### Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem představuje tradiční metodu s širokým uplatněním mimo jiné v potravinářství, farmaceutickém a biotechnologickém průmyslu. Při nízkých teplotách a za nízkého tlaku dochází k efektivní sublimaci vody, tedy přechodu z pevné fáze přímo do plynné bez přechodu do kapalné. Tímto způsobem se nepoškodí buňky a pletiva si zachovávají svůj původní tvar.

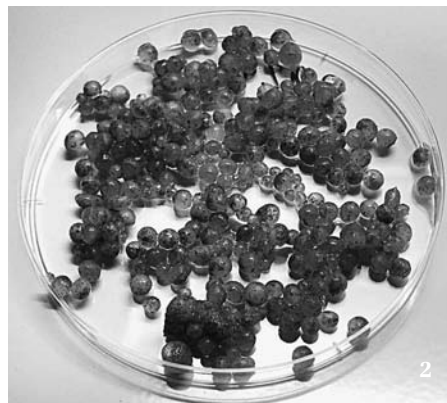
V mykologii se využívá již téměř 100 let a její obliba neklesla ani při rozvoji kryoprezervace (viz dále). Lyofilizace je vhodná pouze pro sporující kmeny, z nichž

1 Kultury na šikmém agaru. Vpravo *Flammulina velutipes* jako příklad stopkovýtusné houby (Basidiomycota) schopné tvořit plodnice i v kultuře

2 Alginátové pelety před vysušením. Tento způsob uchovávání mikromycetů je vhodný i pro nesporující kmeny.

3 Suspenze spor vysušené mrazem – lyofilizáty – zatavené ve zkumavkách. Blíže v textu. Snímky A. Kubátové

se připraví suspenze spor smíchaná se sušeným mlékem nebo jiným ochranným médiem (např. koňským sérem). Naplní se do zkumavek, ve kterých je po zmrazení a vysušení zatavena ve vakuu. Vyrobené ampulky (obr. 3) jsou skladné a lze je např. bez problémů posílat i poštou. Při vhodném uchovávání dosahuje životaschop-



nost kmenů běžně 20 a více let. Důkazem z naší sbírky může být životaschopný lyofilizát kroupidláku žlutého (*Aspergillus flavus*) starý 28 let.

### Kryoprezervace

Tento pojem má asi většina z nás spojený s mražením embryí a vajíček, případně spermií, pro umělé oplodnění. Nicméně kryoprezervace – tedy uchovávání při velmi nízké teplotě (nejčastěji v kapalném dusíku) – má použití i mimo medicínu. Jde o univerzální metodu zachování genových zdrojů živočichů a rostlin, např. mražením vzrostných vrcholů rostlin můžeme zachovat genofond zemědělských plodin nebo zachránit populace vymírajících druhů. V mykologii je kryoprezervace spolu s lyofilizací považována za nejlepší způsob dlouhodobého uchovávání kultur, neboť změny vlastností jsou při ní omezeny na minimum. Mrazit můžeme výřezy kolonií, suspenze spor, tekuté kultury či kolonie na perlitu. Inokulum se promíchá v kryozkumavkách s kryoprotektivní látkou (nejčastěji 10% roztokem glycerolu) a po zmrazení se přemístí do kapalného dusíku (-196 °C) nebo hlubokomrazicího boxu (-80 až -140 °C). Velkou předností je univerzálnost – s malými obměnami v procesu přípravy a mražení lze metodu použít pro většinu kmenů.

### Kontrolované mražení

Kritickým bodem při lyofilizaci a kryoprezervaci hub je mražení vzorků, kdy může docházet k poškození buněk ledovými krystaly. Toto riziko omezíme přidáním kryoprotektivních látek, které snižují dostupnost vody v buňkách a brání vzniku ledu uvnitř buněk. Podle způsobu ochrany je lze rozdělit na intracelulární (glycerol, dimetylsulfoxid), které vstupují do buňky a přímo brání vzniku ledových krystalů, a extracelulární, jež dovnitř nevstupují a chrání buňku vyrovnáváním osmotických tlaků (laktóza, glukóza, mannitol ad.). Tradičně je rozšířené používání sušeného mléka jako kryoprotektivní látky při lyofilizaci nebo glycerolu a dimetylsulfidu při kryoprezervaci. Nicméně výzkum těchto látek je na vzestupu a přináší stále nové a účinnější typy.

Přežití buněk ovlivňuje také způsob mražení. Všeobecně platí, že při rychlém zmrazení se vytvoří množství malých krystalů, zatímco při pomalém vzniká menší počet velkých krystalů. Kryoprezervace často zahrnuje vitifikaci neboli skokové zmrazení v kapalném dusíku či hlubokomrazicích boxech, při kterém voda nevytváří krystaly, ale amorfní led (Živa 2014, 5: 209–210). Další možností představuje řízené mražení, při němž se teplota pomalu snižuje rychlostí 1 °C za minutu, čímž docílíme tvorby ledu mimo buňky. Pro citlivé druhy je vhodné využít řízených mrazicích boxů a optimalizovat mrazicí proces „na míru“.

Metody dlouhodobého uchovávání lze doporučit při skladování kmenů déle než dva roky, přičemž je třeba dbát na výběr vhodné metody pro daný organismus na základě literatury a možností laboratoře.

Seznam použité literatury najdete na webové stránce Živy.