

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd**

**Toxinogenní plísně a mykotoxiny v životním
prostředí člověka**

Lucie Jeřábková

Bakalářská práce

2012

**University of Pardubice
Faculty of chemical technology
Department of Biological and Biochemical Sciences**

**Toxigenic fungi and mycotoxins in the
human environment**

Lucie Jeřábková

Bachelor work

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Jeřábková**
Osobní číslo: **C09278**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Toxinogenní plísně a mykotoxiny v životním prostředí člověka**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**


Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši. Charakterizujte toxinogenní plísně a mykotoxiny. Zaměřte se na plísně rodu *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* a *Trichoderma*.
2. Popište způsobené intoxikace u lidí.
3. Zjistěte nejčastější výskyt mykotoxinů v životním prostředí člověka a v potravinách.
4. Vyhledejte různé možnosti stanovení mykotoxinů.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **ca 30 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Dana Hrubošová**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 14. 6. 2012

Lucie Jeřábková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Daně Hrubošové za odborné vedení, obrovskou trpělivost, cenné rady a mnoho pomoci, kterou mi věnovala během vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za duševní podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Souhrn

Cílem této práce je podat informace o tom, co jsou toxinogenní plísně a mykotoxiny. Další část zahrnuje charakteristiku již konkrétních rodů plísní (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* a *Alternaria*). Zde se podrobněji hovoří o jejich výskytu v potravinách, produkci mykotoxinů a nepříznivém vlivu těchto mykotoxinů na zdraví člověka. V poslední části jsou uvedeny metody stanovení toxinogenních plísní a mykotoxinů.

Klíčová slova:

- toxinogenní plísně
- mykotoxiny
- *Aspergillus*
- *Fusarium*
- *Penicillium*
- *Trichoderma*
- *Alternaria*
- metody stanovení

Summary

The aim of this work is to provide information about what toxigenic fungi and mycotoxins are. The other section includes the characteristic of specific fungi genera, (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Alternaria*). Further their occurrence in foods, production of mycotoxins and adverse effects of these mycotoxins on human health are discussed in detail. The last section introduces methods which determine toxigenic fungi and mycotoxins.

Keywords:

- toxigenic fungi
- mycotoxins
- *Aspergillus*
- *Fusarium*
- *Penicillium*
- *Trichoderma*
- *Alternaria*
- methods of determination

Seznam použitých zkratek

AAT	Alternaria alternata toxí
ADMB	Aspergillus Differentiation Medium Base
AFPA	<i>Aspergillus flavus</i> and <i>parasiticus</i> agar
AME	alternariol monemetyl éter
AOH	alternariol
ATA	alimentární toxická aleukie
Aw	vodní aktivita
CYA	Czapkùv agar s kvasničným extraktem
DON	deoxynivalenol
DRYES	Dichlore Rose bengal Yeast Extract sucrose agar
ELISA	enzymová imunoanalýza
FHB	Fusarium head blight – fusariové hlavové plísňové onemocnění
FUS C	fusarin C
FUS X	fusarenon X
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICFM	Mezinárodní komise mykologie
MEA	agar se sladovým extraktem
MON	moniliformin
MPA	kyselina mykofenolová
NIV	nivalenol
OTA	ochratoxin A
PCA	bramboromrkvový agar
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDA	bramboroglukósový agar s chloramfenikolem
PGA	bramboroglukósový agar
SPR	povrchová plasmová rezonance
TDI	tolerovaný denní příjem
TeA	kyselina tenuazonová
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
WHO	Světová zdravotní organizace
ZEA	zearalenon

Obsah:

Souhrn	7
Summary	8
Seznam použitých zkratek	9
1. Úvod	13
2. Charakteristika toxinogenních plísní a mykotoxinů	14
2.1. Toxinogenní plísně	14
2. 2. Mykotoxiny.....	14
2. Rod ASPERGILLUS	16
2. 1. Aspergillus fumigatus	17
2. 2. Aspergillus niger.....	17
2. 3. Aspergillus flavus	18
2. 4. Aspergillus clavatus	19
2. 5. Aspergillus parasiticus	19
3. Rod PENICILLIUM	20
3. 1. Penicillium aurantiogriseum	21
3. 2. Penicillium expansum.....	21
3. 3. Penicillium chrysogenum	22
3. 4. Penicillium roquefortii	23
4. Rod FUSARIUM	23
4. 1. Fusarium poae.....	25
4. 2. Fusarium oxysporum	25
4. 3. Fusarium culmorum	26
4. 4. Fusarium graminearum	27
5. Rod TRICHODERMA	27
5. 1. Trichoderma viride	28
6. Rod ALTERNARIA	29
6. 1. Alternaria alternata	30
7. Kvalitativní metody stanovení vláknitých mikromycetů	31
7. 1. Přímé metody	31
7. 1. 1. Identifikace podle makromorfologickch znaků (makrohabitu)	31
7. 1. 2. Identifikace podle mikromorfologických znaků (mikrohabitu).....	31
7. 2. Nepřímé metody	32

7. 2. 1. Molekulárně biologické metody	32
7. 2. 1. 1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	32
7. 2. 1. 2. RT-PCR (PCR v reálném čase)	32
7. 2. 2. Chemické metody	33
7. 2. 2. 1. Elektroforéza izoenzymů	33
7. 2. 2. 2. Chemotaxonomie – stanovení sekundárních metabolitů (mykotoxinů)	33
7. 2. 3. Biochemické metody	33
8. Kvantitativní metody stanovení vláknitých.....	33
mikromycetů.....	33
8. 1. Metody přímé mikroskopie.....	33
8. 1. 1. Howardovo číslo	33
8. 1. 2. Využití specifických barviv	33
8. 1. 3. Fluorescenční techniky	34
8. 2. Kultivační techniky.....	34
8. 2. 1. Diluční plotnové metody	34
8. 2. 2. SimPlate	34
8. 2. 3. Petrifilm TM destičky	34
8. 3. Stanovení specifických skupin vláknitých mikromycetů	35
8. 3. 1. Stanovení toxigenních mikromycetů	35
8. 3. 1. 1. Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA).....	35
8. 3. 1. 2. Dichlore Rose bengal Yeast Extract sucrose agar (DRYES)	35
8. 4. Stanovení toxigenity vláknitých mikromycetů.....	35
8. 4. 1. Testace izolovaného kmene vláknitých mikromycetů na syntetické živné půdě.....	35
8. 4. 2. Přímá testace potravin.....	35
8. 4. 2. 1. ELISA (enzyme – linked imunosorbent assay)	36
8. 4. 2. 2. Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	36
8. 4. 2. 3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	36
8. 5. Chemické metody	37
8. 5. 1. Stanovení ergosterolu	37
8. 6. Imunologické metody	37
8. 6. 1. Latex – aglutinační testy	37
8. 7. Fyzikálně-chemické metody	37

8. 7. 1. Biosenzory	37
8. 7. 2. Povrchová plasmová rezonance (SPR)	38
9. Metody laboratorní diagnostiky mikromycetů	39
v lékařské mykologii	39
9. 1. Laboratorní metody	39
9. 1. 1. Odběr a zpracování materiálu	39
9. 1. 2. Kultivace	39
9. 1. 3. Mikroskopie	39
9. 1. 4. Histologické vyšetření	40
9. 2. Sérologické a imunologické vyšetření	40
10. Závěr	41
Přílohy	42
Seznam použité literatury	44
Seznam použitých zdrojů pro přílohy	50

1. Úvod

Plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* a *Alternaria* jsou producenti široké škály mykotoxinů. Téměř všechny mykotoxiny poškozují z dlouhodobého hlediska játra, ledviny, krevní oběh a negativně působí na imunitní systém. Mykotoxiny mohou mít účinky karcinogenní, mutagenní, teratogenní, genotoxické, imunotoxické, hemoragické, neurotoxické, cytotoxické, neurotoxické a hepatotoxické.

Vzhledem k těmto negativním účinkům je dnes mykotoxinům věnována velká pozornost. Pro většinu mykotoxinů jsou již stanoveny limity pro jejich výskyt v potravinách. Proto je důležité předcházet výskytu mykotoxinů již při pěstování plodin, při jejich sklizni a při jejich skladování a následném zpracování.

2. Charakteristika toxinogenních plísní a mykotoxinů

2.1. Toxinogenní plísně

Plísně jsou mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganismy, které se řadí mezi houby (Fungi). Mají přísně aerobní povahu, a proto se nejčastěji rozmnožují na povrchu napadeného materiálu. Široké enzymové vybavení umožňuje napadat nejrůznější organický materiál. Další schopností je rozmnožování při nízké vodní aktivitě prostředí. K rozvíjení plísní stačí 15% obsahu vody. Mohou se uplatňovat tam, kde již většina bakterií není schopna metabolismu, a to díky schopnosti rozmnožovat se i za nízkého pH. Rostou i za velmi nízké teploty (až -10°C), ale naopak nepřežívají několikaminutové zahřívání na teplotu 70 až 75°C (Šilhánková, 2002).

Hlavním rezervoárem plísní je půda, ze které se dostávají do vzduchu, na organický materiál převážně rostlinného původu, na exkrementy zvířat a průmyslové předměty uložené ve vlhku. Napadají například povrchy džemů, chleba nebo navlhle suroviny – mouku, mák, sóju, arašídů, atd (Malíř a kol., 2003). Některé plísně mohou být pro člověka patogenní či fytopatogenní. Jiné vyvolávají alergické reakce.

Mezi nejvýznamnější toxinogenní plísně v souvislosti s potravinami patří rody *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*. Dalšími producenty mykotoxinů jsou rody *Trichoderma* a *Alternaria* (Pitt, 2000).

2.2. Mykotoxiny

Jde o sekundární metabolity, jejichž produkce závisí na mnoha faktorech včetně genetiky. Mykotoxiny se vyznačují značnou proměnlivostí svých metabolických pochodů i při zcela obdobných růstových podmínkách. Za určitých podmínek kmen daného druhu plísně produkuje mykotoxiny a za jiných podmínek (dosud přesně nedefinovaných) k produkci nedochází (Sudakin a Fallah, 2008).

Faktory, které ovlivňují tvorbu mykotoxinů, můžeme rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Mezi fyzikální faktory patří teplota, relativní vlhkost substrátu, vodní aktivita a_w a přítomnost kyslíku (Hussein a Brasel, 2001). A_w se počítá z rovnováhy vody mezi substrátem a okolním vzduchem při dané teplotě. Pro většinu vláknitých mikromycet je minimální a_w 0,7. Plísně, které pro svůj růst potřebují nejvíce kyslíku, kontaminují povrch substrátu. Mikromycety, které vyžadují méně kyslíku, se vyskytují v hloubce substrátu. Některé vláknité mikromycety jsou schopné se

rozmnožovat v anaerobním prostředí. Mezi chemické faktory patří používání hnojiv či fungicidů. Biologické faktory zahrnují například přirozenou odolnost rostlin vůči napadení plísněmi. Mykotoxiny, o kterých budu mluvit, mají nízkou molekulovou hmotnost. Proto organismus, který je napaden, proti nim není schopný tvořit ochranné látky (protilátky) (Malíř a kol., 2003).

Nejvýznamnějším zdrojem pro nákazu člověka jsou potraviny. Mohou způsobit mnoho onemocnění, která dělíme do 4 skupin, podle druhu toxicity – na akutní, chronické, mutagenní a teratogenní. Nejčastější onemocnění je zhoršení funkce jater a ledvin. Zasahují do syntézy bílkovin, působí na replikaci DNA, jsou neurotoxiny. V důsledku potlačení imunity vlivem mykotoxinů může dojít ke vzniku alergických reakcí (Sudakin a Fallah, 2008). Výrazná imunosuprese zvyšuje karcinogenní riziko. Vyskytuje se u aflatoxinů, většiny trichothecenových mykotoxinů a ochratoxinu A (OTA). K mykotoxinům s hepatotoxickými účinky patří zejména aflatoxiny, trichotheceny (T-2 toxin, deoxynivalenol (DON), OTA nebo kyselina cyklopiazonová. Nefrotické účinky vyvolává OTA, citrinin a kyselina cyklopiazonová (Hrubý a Turek, 1996).

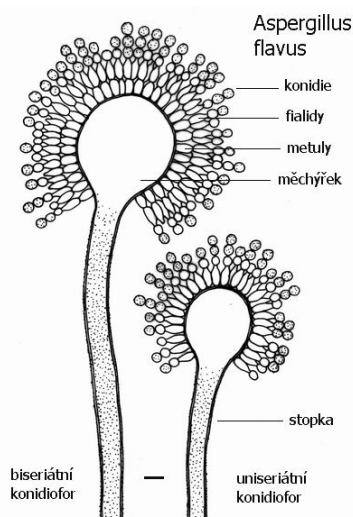
Mechanismy působení mykotoxinů jsou různé. Důležitá je přítomnost enzymatického aparátu, který způsobuje změnu některých složek poživatin. Může docházet ke zhoršení jejich sensorických vlastností, nebo ke snížení biologické hodnoty nebo k tvorbě zdraví škodlivých látek. Jejich vliv na zdravotní stav se projevuje až při dlouhodobém požívání. Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří aflatoxiny, OTA, fumonisiny. Všechno jsou to silné karcinogeny (Sudakin a Fallah, 2008).

2. Rod ASPERGILLUS

Jde o mikromycety, kterým dal rodové jméno *Aspergillus* v roce 1729 botanik Pier Antonio Micheli. Česky je tento rod označován jako kropidlák, protože průřez rozmnožovacím orgánem připomíná tvar kropítka. Rod *Aspergillus* (obr. č.1) se řadí do říše Fungi (houby), oddělení Askomyceta, řádu Eurotiales a čeledi Trichocomaceae (Malíř a kol., 2003). Teplotní optimum pro jejich růst je okolo 35°C, mohou ale růst v rozmezí od 8-12°C do 47-53°C (Klaban, 2005). Kolonie jsou zbarvené dle použitého kultivačního média od bílé, přes žlutou, oranžovou, zelenou až po modrozelenou, šedozelenou či černou (Kubátová, 2011).

Mezi nejčastější mykotoxiny, které rod *Aspergillus* produkuje, patří patulin, cytochalasin E, aflatoxin B₁ a B₂, cyklopiazonová kyselina, gliotoxin, OTA nebo citrinin. Nalézt ho můžeme v těchto potravinách – obiloviny (ječmen, pšenice), rýže, kukuřice, ovoce (ananas, granátová jablka, meloun, jahody, citrusové plody, mango či grepy), koření (kopr, pepř, koriandr) nebo ořechy (lískové, vlašské, pekanové či pistácie) (Malíř a kol., 2003).

V současné době (do roku 2001) obsahuje rod *Aspergillus* více než 221 druhů. Do této doby bylo popsáno mnoho nových druhů, které byly několikrát revidovány. Z toho asi 18 druhů bylo popsáno jako patogenních pro člověka. Za více jak 95% infekcí zodpovídají pouze tři druhy – *Aspergillus fumigatis*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus niger* (Malíř a kol., 2003).



Obr. č.1: *Aspergillus flavus*

[www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm]

2. 1. *Aspergillus fumigatus*

Tento druh plísně se řadí mezi termofilní a termotolerantní. Roste i při teplotě 50°C. Na Sabouraudově agaru roste v podobě nízkých, sametových, zelenomodrých kolonií, které jsou uprostřed mírně vyvýšené. Okraj kolonií je bezbarvý a typicky dlouze vláknitý. Spodní strana kolonií je světle žlutá. Produkuje mykotoxiny fumitremorgeny, verukulogen a gliotoxin. Můžeme ho nalézt v potravinách jako jsou například pšenice, rýže, kakaové a sojové boby, ořechy (lískové, vlašské, arašídny), zpracované sýry, atd (Malíř a kol., 2003). Pro mandle, lískové ořechy a pistácie určené pro další zpracování stanovil Codex Alimentarius limit celkových aflatoxinů na 15 µg/kg tělesné hmotnosti. Pro mandle, lískové ořechy a pistácie určené k přímé spotřebě byl limit stanoven na 10 µg/kg tělesné hmotnosti (Commission regulation, 2006).

Jde o saprofytickou, všudypřítomnou houbu se vzdušnými konidii, které mají dostatečně malý průměr (2 – 3µm), a proto se mohou dostat až do plicních sklípků. Environmentální průzkumy ukazují, že každý člověk vdechne denně až několik set *Aspergillus fumigatus*. U imunokompetentních osob má vdechování conidií většinou negativní význam. Konidie jsou eliminovány pomocí mechanismů imunitního systému. Vzhledem k tomu, že roste počet osob a oslabenou imunitou, stává se *Aspergillus fumigatus* jedním z nejčastějších patogenů, které způsobují závažné až fatální infekce (Latge, 1999).

Místem infekce mohou být kůže, ledviny, kosti, oči. Nejčastějším portálem vstupu a místa infekce jsou však dýchací cesty. Vznikají tři formy aspergilózy. Nejvýznamnějším typem je alergická bronchopulmonální aspergilóza. Vyskytuje se u pacientů s astmatem a cystickou fibrózou. Diagnostika je poměrně obtížná. Kritéria pro určení jsou astma, vyšetření periferní krve, která obsahuje eosinofily, reakce na kůži, zvýšené hladiny celkového imunoglobulinu E v séru a v neposlední řadě vyšetření vykašlávaného sputa. Diagnostika je ztížena tím, že tato kritéria se málokdy vyskytují všechna naráz (Latge, 1999).

2. 2. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger je hojně rozšířen v přírodě. Na Sabouraudově agaru roste velmi rychle. Nejprve se tvoří bílé mycelium, které postupně hnědne až černá. Spodní strana kolonií je bezbarvá nebo světle žlutá. Produkuje OTA hlavně v tropických a subtropických oblastech (Baker, 2006). Hlavním zdrojem *Aspergillus niger* jsou

obiloviny, výrobky z obilovin, vepřové maso, vnitřnosti (játra, ledviny), káva, pivo, luštěniny a sušené ovoce (fíky a rozinky) (Malíř a kol., 2003).

Hlavní toxické účinky OTA jsou nefrotoxicita, imunotoxicita, mutagenita, karcinogenita a neurotoxicita. OTA způsobuje inhibici syntézy proteinů, narušuje mitochondriální funkce a metabolismus sacharidů a vápníku. Byl zjištěn v lidské krvi v mnoha zemích. Jeho vazba na plazmatické bílkoviny způsobuje jeho toxicitu. V organismu se chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním. Hlavním místem jeho retence jsou játra, plíce, varlata nebo střevo. OTA také způsobuje onemocnění týkající se ledvin. To se projevuje zhoršením funkce ledvin, tubulární degenerací, intersticiální fibrózou, snížením počtu buněk, zánětem až nekrózou a apoptózou (Malíř a kol., 2001). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil pro OTA tolerovaný týdenní příjem 120 ng/kg tělesné hmotnosti (Commission regulation, 2006).

Kromě toho, že *Aspergillus niger* produkuje mykotoxiny, má i značný biotechnologický význam. Používá se při výrobě kyseliny citronové, glukonové nebo šřavelové. Také slouží k přípravě amylolytických, proteolytických a lipolytických enzymů (Baker, 2006).

2. 3. *Aspergillus flavus*

Kolonie na Sabouraudově sladínovém agaru jsou žlutozelené, poměrně rychle rostoucí a v době zralosti vlnaté (viz. příloha – obr. č.1). Spodní strana kolonií je zbarvena žlutě až hnědě. Produkuje aflatoxin B1, B2 a cyklopiazonovou kyselinu. Vyskytují se po celém světě v potravinách. Např. sušené ovoce (švestky, meruňky a fíky), kukuřice (viz. příloha – obr. č.2), rýže, chléb, těstoviny, obiloviny, ořechy (arašídý, pistácie) (Malíř a kol., 2003). Mohou kontaminovat plodiny před sklizní nebo při skladování, a tím ohrožovat člověka (Pasqualotto, 2009). Maximální limit pro aflatoxin B1 je 2 µg/kg tělesné hmotnosti, s výjimkou kukuřice, pro kterou je stanoven limit na 5 µg/kg tělesné hmotnosti (Commission regulation, 2006).

Aflatoxiny mají pro člověka hepatotoxické a karcinogenní účinky na játra. *Aspergillus flavus* způsobuje onemocnění nazývané aspergilóza. Nejčastěji se přenáší vzduchem v tropických zemích. Je častou příčinou plísňové kožní infekce a zánětu vedlejších nosních dutin. Je druhou nejčastější příčinou invazivní plicní aspergilózy. Mezi další onemocnění patří zánětlivé onemocnění oční rohovky, podkožní tkáně a ústní sliznice (Janati et al., 2011).

2. 4. *Aspergillus clavatus*

Tato plíseň se vyskytuje v půdě a na rozkládajícím se rostlinném materiálu. Na přirozeném substrátu i na umělých pevných půdách se vyznačuje vyšším vzrůstem kolonií. Často kontaminuje potraviny, ječmen během skladování, obiloviny, mouka, chléb, rýže, kukuřice, pekanové ořechy, paprika, pepř, sušené maso nebo sušené solené ryby. Produkuje mykotoxiny patulin, tryptoquivalony a cytochalasin E (Klaban, 2005).

Patulin vzkazuje imunosupresivní účinky a po opakovaném požití může poškozovat játra a slezinu. Cytochalasin E při kontaktu s očima způsobuje slzení nebo zarudnutí spojivek. Při vdechnutí kontaminovaných částic dochází k rozvoji rozedmy plic a chronického zánětu průdušek. Dlouhodobé vystavení vyšším koncentracím může způsobit změny plicních funkcí (Malíř a kol., 2003).

Evropské země stanovily přípustný obsah patulinu v potravinách na 50 µg/L. Odborná komise WHO stanovila maximální denní dávky patulinu na 0,4 µg/kg tělesné hmotnosti (Commission regulation, 2006).

2. 5. *Aspergillus parasiticus*

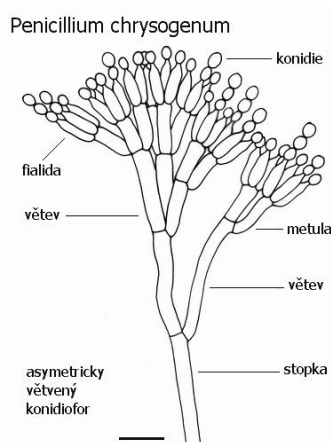
Produkuje mykotoxiny ze skupiny aflatoxinů. Konkrétně aflatoxin B1, B2, G1 a G2. Pro člověka jsou tyto mykotoxiny karcinogenní a hepatotoxické. Vyskytují se v potravinách po celém světě, konkrétně to jsou arašídy, pistácie, ořechy, obiloviny, kukuřice, rýže a fíky. K expozici aflatoxinů dochází vdechováním prachu, který vzniká při manipulaci a zpracování napadených rostlin a krmiv. Nejvíce ohroženi jsou zemědělní pracovníci (Malíř a kol., 2003).

Mezi nejčastější projevy při kontaminace, například aflatoxinem G1, patří poškození jater (jaterní cirhóza, jaterní nekróza či zvětšení jater), horečka, otoky končetin nebo zvracení (Klaban, 2005).

3. Rod *PENICILLIUM*

Rod *Penicillium* (obr. č.2) se řadí do říše Fungi (houby), oddělení Ascomycota, řádu Eurotiales a čeledi Trichocomaceae (Malíř a kol., 2003). Název pochází z latinského slova *penicillus*, což znamená štětec nebo kartáč. Český název je potom štětičkovec nebo plíseň štětičková (Klaban, 2005). Tento rod obsahuje asi 150 druhů. Tyto druhy tvoří kolonie s velkým množstvím žlutozelených až modrozelených konidií. Vyskytují se na různých potravinách i jiném materiálu patrné jako zelené, sametové až moučné povlaky. Okraje těchto kolonií, na nichž nejsou spory, jsou bílé (viz. příloha - obr. č.3) (Šilhánková, 2002). Pro diagnostiku těchto plísní používáme diagnostické půdy, jako jsou Czapek agar s kvasničným extraktem (CYA) nebo MEA – agar se sladovým extraktem. Teplotní optimum pro růst těchto plísní je okolo 23°C, minimum jsou 4°C a maximum je 37°C (Kubátová, 2011).

Mykotoxiny, které rod *Penicillium* produkuje, můžeme nalézt v těchto potravinách – obiloviny, kukuřice, rýže, ovoce (jablka, hrušky, jahody), zelenina (brambory, rajčata), arašídy, pistáciové ořechy, masné výrobky či sýry. Konkrétně se jedná hlavně o mykotoxiny patulin, citrinin, kyselina penicilová, kyselina cyklopiazonová, roquefortin C nebo kyselina mykofenolová (MPA). Mezi nejčastější onemocnění způsobená těmito plísněmi a mykotoxiny, které produkují, se řadí různé infekce – endokarditida, perikarditida, močové infekce nebo keratitida. Jiné druhy mohou způsobovat potom alergické reakce. K nejvýznamnějším druhům patří *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium aurantiogriseum* nebo *Penicillium roqueforti* (Malíř a kol., 2003).



Obr. č.2: *Penicillium chrysogenum*

[www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm]

3. 1. *Penicillium aurantiogriseum*

Kolonie této plísně jsou modrozeleně zbarvené a povrch je typicky zrnitý. U mnoha kolonií můžeme pozorovat paprscité rýhování, u starších kultur se objevuje soustředná vrstevnatost. Jejich spodní strana je nejdříve bezbarvá, později získává žluté až žlutohnědé zbarvení. Produkuje kyselinu penicilovou, roquefortin C, xanthomegin, viomelluxin a verukozidin. V přírodě se vyskytuje zvláště v půdách a na rozkládajících se rostlinných zbytcích (Klaban, 2005).

Kyselina penicilová způsobuje onemocnění kukuřice. Projevuje se modrozeleným zbarvením klíčků kukuřice a běžně se tento stav označuje jako modré oko. Napadá hlavně kukuřici uloženou v zásobnících a skladovanou v zimě při teplotách 1-10°C. Stanovení množství obsahu kyseliny spočívá v určení její koncentrace pomocí metod tenkovrstvé chromatografie, kdy máme neznámý vzorek a známé množství standardu na silikagelu ukotvené na desce, kterou následně vložíme do výpar amoniaku (Ciegler a Kurtzman, 1970).

3. 2. *Penicillium expansum*

Kolonie této plísně jsou buď zrnité nebo se zřetelně vytvořenými drobnými svazky konidioforů. Vyznačuje se soustřednou vrstevnatostí, zvláště v okrajové zóně také paprscitým rýhováním. Pokud se tvoří exsudát, tak je bezbarvý. Spodní strana kolonií je také bezbarvá, u starších kolonií je někdy i žlutohnědá. *Penicillium expansum* produkuje mykotoxiny patulin a citrinin. Nachází se hojně v přírodě, v půdě nebo na organických zbytcích. Vyznačuje se produkcí celulólytických enzymů, které podporují destruktivní činnost této plísně (Klaban, 2005).

Běžně *Penicillium expansum* roste a následně produkuje patulin na plodech s poškozenou povrchovou tkání. Zvýšenou koncentraci patulinu můžeme nalézt hlavně v jablečných moštích připravených z předem netříděných jablek. Příležitostně byl také zjištěn v ovoci s přirozenou hnědou hnilobou – banány, grepy, broskve, meruňky, ananas, ale i maliny. Výskyt patulinu v potravinách je tedy spíše indikátorem špatných výrobních postupů než hrozbou pro zdraví člověka. Ovšem eventuální chronická intoxikace není vyloučena. Patulin má jak toxické, tak teratogenní a mutagenní účinky. Hlavním projevem toxických účinků patulinu jsou nevolnost, zvracení, gastrointestinální poruchy, krvácení nebo ulcerace (Pires et al., 2009).

Hlavními metodami stanovení patulinu jsou chromatografické metody, konkrétně chromatografie na tenké vrstvě (TLC), plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). TLC je velice jednoduchá a vyžaduje nízké náklady. HPLC umožňuje snadnou identifikaci a kvantifikaci patulinu pomocí jeho charakteristický absorpčních spekter. V roce 2000 byla zveřejněna metoda kapilární elektroforézy, což je rychlá a vysoce citlivá metoda analýza pro stanovení koncentrace patulinu v jablečných moštích a šťávách (Pires et al., 2009).

3. 3. *Penicillium chrysogenum*

Kolonie *Penicillium chrysogenum* mají sametový povrch zbarvený žlutozeleně nebo šedo zeleně a vyznačují se paprscitým rýhováním pronikajícím i na jejich spodní stranu. Často vzniká žlutý až žlutohnědý exsudát v podobě kapek. Spodní strana kolonií je zbarvena žlutě či žlutohnědě. V mnoha případech lze pozorovat charakteristickou difúzi žlutého pigmentu do okolní půdy (Klaban, 2005). Teplotní optimum pro růst této plísně je okolo 23 °C. *Penicillium chrysogenum* se hojně vyskytuje po celém světě. Je jedním z nejběžnějších druhů rodu *Penicillium* kontaminujících potraviny rostlinného i živočišného původu (Kubátová, 2011). Přirozeně se vyskytuje ve vlhkých půdách s dostatečným množstvím uhlíku a dusíku.

Příležitostně byl tento druh zaznamenán jako alergen, původce astmatu či různých mykóz u člověka. Často jde o plicní infekce u lidí s oslabenou imunitou. U jedinců s normálně fungujícím imunitním systémem není *Penicillium chrysogenum* obvykle příčinou infekce (D'Antonio et al., 1970). Často se vyskytuje jako plíseň na zdech. Mimo toto všechno je ovšem *Penicillium chrysogenum* producentem antibiotika penicilin (Kubátová, 2011). Dříve bylo *Penicillium chrysogenum* omezeno na léčbu spály, zápalu plic, kapavky nebo závažných stafylokokových infekcí. V dnešní době se již používá proti širokému spektru bakterií (D'Antonio et al., 1970). Penicilin patří mezi beta – laktamová antibiotika. Principem působení je schopnost proniknout přes buněčnou stěnu patogenu a navázat se na cílový enzym (penicilin vázající proteiny – penicilin binding proteins – PBP). Tím dojde k porušení syntézy peptidoglykanu, buňka ztratí svou stabilitu a zanikne (Táborská, 2007-2012).

3. 4. Penicillium roquefortii

Na agaru tvoří typicky sametové, nízké, hladké kolonie s bílým okrajem. Tyto kolonie mají modrozelenou až hráškově zelenou barvu, spodní strana je stejně zbarvená (viz. příloha – obr. č.3). *Penicillium roquefortii* je nezbytným mikroorganismem při výrobě a zrání sýrů rokfórového typu, neboť vytváří lipolytické a proteolytické enzymy (viz. příloha – obr. č.4). Tato plíseň je málo náročná na kyslík, roste i v atmosféře obsahující pouze 5% O₂. Snáší vysokou koncentraci solí a velmi kyselé prostředí (Klaban, 2005). Produkuje mykotoxiny roquefortin C, MPA, patulin nebo kyselinu penicilovou. Potraviny, ve kterých se může vyskytovat, jsou následující – obiloviny (ječmen), zelenina, ořechy (arašídy, pekanové, lískové, vlašské, mandle), maso (sušené, nakládané v soli) či chlazené těsto (Malíř a kol., 2003).

MPA se používá jako imunosupresivní lék k prevenci před odmítnutím transplantovaných orgánů. Tato kyselina inhibuje enzym, který je nezbytný pro růst T a B buněk. Mezi nežádoucí účinky ovšem patří gastrointestinální, hematologické a infekční obtíže (Atcheson et al., 2005).

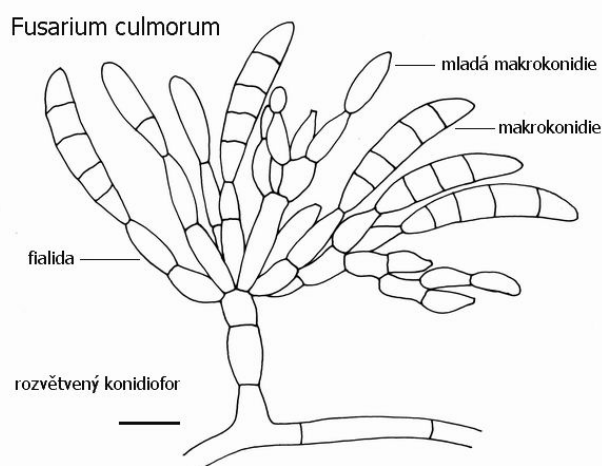
4. Rod FUSARIUM

Rod *Fusarium* (obr. č.3) patří do říše Fungi (houby), oddělení Ascomycota, řádu Hypocreales a čeledi Hypocreaceae. Plísňe patřící do tohoto rodu jsou v přírodě značně rozšířené, zejména v půdě, ale také ve vodě a v ovzduší. Mají bohaté, plstnaté nebo vatovité mycelium. Potraviny, na kterých můžeme plíseň tohoto rodu najít, jsou nejčastěji obiloviny (pšenice, žito, ječmen, oves), ovoce (ananas, banán, meloun, jablka, hrušky) a zelenina (brambory, kukuřice, paprika, okurka) (Malíř a kol., 2003). Pro kultivaci je nejvhodnější bramboroglukosový agar (PGA), CYA nebo Sabouraudův agar. Na těchto agarech můžeme pozorovat kolonie zbarvené od bílé, přes žlutou, žlutooranžovou, červenooranžovou, červenofialovou až po šedorůžovou. Teplotní rozmezí pro kultivaci je od 0°C až po 31°C, optimum je však okolo 25°C (Klaban, 2005).

Vyznačují se charakteristickou tvorbou dvou typů konidií – mikrokonidií a makrokonidií. Mikrokonidie jsou jednobuněčné, elipsoidní nebo oválné. Makrokonidie jsou mnohobuněčné a mají charakteristický rohlíčkovitý nebo srpovitý tvar. Některé druhy se vyznačují tvorbou chlamydospor, které se vyvíjejí uprostřed nebo na konci

myceliálních vláken. Někdy můžeme pozorovat přítomnost tuhých kulovitých útvarů zvaných sklerocia. Všechny tyto aspekty - makroskopické vlastnosti vyrostlých kolonií, tvorba dvou druhů konidií a jejich morfologie, výskyt chlamydospor a sklerocií představuje determinální znaky pro zařazení vyšetřovaných plísní do jednotlivých druhů.

Dříve byli zástupci tohoto rodu považováni za nepatogenní pro člověka, v současné době jsou popsány případy mykotických onemocnění osob se sníženou imunitou nebo s oslabeným organismem (Klaban, 2005). Druhy rodu *Fusarium* produkují značně nebezpečné mykotoxiny, které se souhrnně nazývají trichotheceny, např. deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenon (ZEA), T-2 toxin, moniliformin (MON), fusarin C (FUS C), fusarenon X (FUS X), chlamydosporol, sambucinol nebo butenolid (Malř a kol., 2003). Z nich nejtoxičtější je T-2 toxin. Další skupinu mykotoxinů tvoří fumonisiny, kam patří fumonisin A1, A2, B1, B2, B3, B4, C1. Nejvýznamnější z nich je B1. Fumonisin lze pokládat za možné karcinogeny pro člověka a jsou charakterizovány jako promotory karcinogenního procesu. Z biochemického či fyziologického hlediska mohou inhibovat biosyntézu sfingolipidů, které se vyskytují ve větším množství v nervové tkáni a jsou nutné pro stavbu a správnou činnost všech buněk v lidském organismu (Klaban, 2005).



Obr. č.3: *Fusarium culmorum*
[www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm]

4. 1. *Fusarium Poae*

Fusarium poae se vyskytuje v obilovinách (pšenice, ječmen, oves), v kukuřici v chladnějších oblastech či v sojových bobech. *Fusarium poae* produkuje mykotoxiny obecně nazývané trichotheceny - T-2 toxin, DON, FUS C, NIV, HT-2 toxin, fusarenon X (FUS X) a další. Z těchto mykotoxinů je nejvýznamnější T-2 toxin (Malíř a kol., 2003). T-2 toxin, NIV a DON jsou v poslední době sledovány kvůli značné toxicitě a stále výraznějšímu výskytu v různých poživatinách (Hrubý a Turek, 1996). V roce 2001 stanovil Vědecký výbor pro potraviny tolerovaný denní příjem (TDI) T-2 toxinu na 0,06 µg/kg tělesné hmotnosti. Proto je důležité zajistit takové podmínky, aby se předešlo napadení materiálu, kde se může vyskytovat. Například snížení vlhkosti substrátů, vyřídění narušených, poškozených nebo jinak zbarvených zrn (Commission regulation, 2006).

T-2 toxin se může do organismu dostat požitím, vdechnutím nebo může být vstřebán kůží či sliznicí. Toxin je velmi rezistentní vůči teplotě. Je stabilní i vůči slunečnímu a UV záření. T-2 toxin způsobuje onemocnění nazývané alimentární toxická aleukie (ATA). V bývalém Sovětském svazu onemocnělo touto nemocí tisíce lidí po požití výrobků z obilovin, jejichž zrna byla kontaminována. Krátce po požití lidé pozorovali pálení a otoky v ústech, zvraceli, měli horečku a bolesti břicha. Po 3-9 dnech se jejich stav vrátil k normálu. U nejvíce postižených jedinců došlo k úplné destrukci krvetvorného systému. Mimo jiné bylo potvrzeno, že byl tento toxin použit jako biologická zbraň během občanské války v Laosu v aerosolové formě ("žlutý déšť").

Další účinky T-2 toxinu jsou hepatotoxické, působí kardiotoxicky (vyvolává buněčné léze v myokardu, intersticiální edém a lokální fibrózy), způsobuje nekrózu kůže, hemoragie a především výraznou imunosupresi, ale nemá účinky karcinogenní (Hrubý a Turek, 1996).

4. 2. *Fusarium oxysporum*

Barva kolonií *Fusarium oxysporum* je na Sabouraudově agaru zpočátku bílá, později se zbarvuje od oranžové přes fialovou až po modrou. Optimální teplota pro růst je 28°C, může se však vyskytovat v teplotním rozmezí 14-30°C. *Fusarium oxysporum* je velmi stabilní a adaptabilní pro různé podmínky prostředí. Z již kontaminované půdy ho nelze odstranit jinak než kompletní sterilizací. Produkuje mykotoxiny MON, FUS X, FUS C, T-2 toxin, sambutoxin nebo NIV. *Fusarium oxysporum* můžeme nalézt v těchto

potravínách – obiloviny (ječmen), zelenina (rajčata, kukuřice, okurek, brambory), ovoce (banány, citrusové plody, jablka, meloun) (Maliř a kol., 2003).

Mezi nejčastější onemocnění, která tento druh způsobuje, patří mykotická keratitida, onychomykóza a hyalohypomykóza. Mykotická keratitida – jde o hnisavou infekci oční rohovky, která může postihovat i oční bulvu a způsobovat abscesy. Například v Asii je to hlavní onemocnění způsobující slepotu. Laboratorní diagnostika se provádí pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) a konfokální mikroskopie (Srinivasan, 2004). Onychomykóza (viz. příloha – obr. č.7) – jedná se o mykotickou infekci nehtového aparátu. Není bezprostředně život ohrožující, ale u osob s oslabenou imunitou může způsobit vážné komplikace (Kulíková, 2008). Patologické změny postupují od volného konce nehtu směrem k jeho kořeni (Klaban, 2005). Infekce se drží na povrchu ploténky nebo proniká dovnitř. Potom dochází k barevným změnám nehtu, nehty se na konci třepí a ulamují. U neléčené formy dochází k totální destrukci nehtové ploténky. K identifikaci se využívá mikroskopické vyšetření, histologické vyšetření nebo PCR. Hyalohypomykóza je plísňová infekce kůže, která se projevuje vyrážkou. Může ale pronikat až do dermis a způsobovat vnitřní krvácení (Srinivasan, 2004).

4. 3. *Fusarium culmorum*

Pro kultivaci *Fusarium culmorum* se používá PGA, kde pozorujeme růžové až vínové kolonie (viz. příloha – obr. č.5). Optimum pro růst je 25°C, roste však i v teplotním rozmezí 0-31°C. Můžeme ho nalézt v obilovinách (viz. příloha – obr. č.6) a produktech z nich (mouka), nebo v ovoci (banány, jablka, hrušky). *Fusarium culmorum* produkuje mykotoxiny DON, NIV, ZEA, FUS C, FUS X nebo MON (Klaban, 2005).

DON je tepelně stabilní, proto je těžké ho odstranit. Vyskytuje se však pouze na povrchu zrn obilí, proto se jeho většina odstraní mletím. Mimo jiné je dobře rozpustný ve vodě, proto další značná část je většinou odstraněna mytím. Z trichothecenových mykotoxinů vykazuje nejnižší akutní toxicitu. Často se vyskytuje společně s NIV a T-2 toxinem. Při požití způsobuje bolesti břicha a hlavy, závratě, nevolnost, zvracení, průjem a krev ve stolici. Vědecký výbor pro potraviny stanovil jeho TDI ve výši 1 µg/kg tělesné hmotnosti (European commission, 1999).

ZEA sice nemá steroidní strukturu, ale má účinky steroidního hormonu estrogenu. U lidí může způsobovat hyperestrogenismus. Ten byl však prokázán pouze v rodinách s nadměrnou konzumací drůbeže, která požívala krmivo infikované ZEA.

Také je znám případ výskytu hyperestrogenismu u výzkumných pracovníků, které prováděly izolaci ZEA v hygienicky nevyhovujících podmínkách (Plasencia a Mirocha, 1991). Vědecký Panel pro kontaminující látky v potravinovém řetězci EFSA stanovil TDI pro ZEA ve výši 0,25 µg/kg tělesné hmotnosti (Commission regulation, 2006).

4. 4. Fusarium graminearum

Vzhled kultury a její zbarvení velmi závisí na druhu kultivačního média. Na PGA nebo na Sabouraudově agaru tvoří šedorůžové kolonie (Klaban, 2005). Mezi nejčastěji produkované mykotoxiny patří DON, ZEA, NIV, FUS C, FUS X nebo T-2 toxin. *Fusarium graminearum* nejčastěji parazituje na stéblech obilovin (pšenice, ječmen) a trav a způsobuje jejich hnilobu. Také se může vyskytovat na sušeném masu, sójových bobech, ovoci (banány) či cukrové řepě (Malíř a kol., 2003, Klaban, 2005).

S parazitováním na stéblech rostlin souvisí nejčastější destruktivní onemocnění rostlin, a to *Fusarium head blight* (FHB). Český *Fusarium* hlavové plísňové onemocnění, nebo-li strup. Nejčastěji postihuje pšenici a ječmen. S tímto onemocněním poté souvisí tvorba mykotoxinů, které po požití těchto napadených rostlin mohou způsobit zdravotní potíže u člověka. Nejčastěji se jedná o DON, jehož účinky byly popsány již výše (Mattila et al., 2009). Proto toto onemocnění patří mezi významnou hrozbu pro globální bezpečnost potravin a je předmětem sledování. Organizace Food and Drug stanovila limit 1 ppm pro DON ve všech hotových výrobcích z pšenice, které mohou být konzumovány lidmi (Loughman et al., 2004).

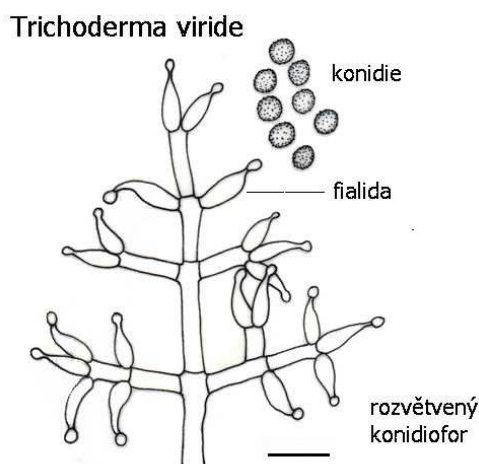
5. Rod TRICHODERMA

Rod *Trichoderma* (obr. č.4) patří do říše Fungi (houby), oddělení Ascomycota, řádu Hypocreales a čeledi Hypocreaceae. Zástupci tohoto rodu jsou volně žijící houby přítomny ve všech půdách. Často se vyskytují na kořenech rostlin jako symbionti (Malíř a kol., 2003). Pro kultivaci se nejčastěji používá bramboromrkvový agar (PCA) nebo MEA. Na těchto půdách sledujeme kolonie zbarvené od bílé, přes světle růžovou a červenou až po tmavě zelenou (viz. příloha – obr. č.8). Teplotní optimum pro růst je 23-

27 °C. Zástupci rodu *Trichoderma* se však mohou vyskytovat i v teplotním rozmezí 0-35 °C. Kontaminuje obilí, rýži nebo kukuřici (Kubátová, 2011).

Rod *Trichoderma* produkuje mykotoxiny ze skupiny trichothecenů, o kterých jsem již mluvila u rodu *Fusarium*. Mezi další mykotoxiny patří cyklické peptidy, které narušují permeabilitu fosfolipidové vrstvy biologických membrán a způsobují lýzu membrán. Patří sem alamethiciny, trichlorzianiny a suzukacilin. Třetí skupiny mykotoxinů tvoří isokyanidy. Většina z nich je velmi nestabilním výjimku tvoří pouze trichoviridin (Harman et al., 2004).

Pokud pomineme produkci mykotoxinů, má *Trichoderma* široké uplatnění v mnoha směrech. Produkuje celou řadu extracelulárních enzymů, které se používají například pro komerční výrobu celulosy. Další schopností je tvorba lytických faktorů, které brání pomnožení bakterií nebo jiných hub na kořenech rostlin, které *Trichoderma* osídluje. Chrání tak kořenový systém dané rostliny (Harman et al., 2004).



Obr. č.4: *Trichoderma viride*
[www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm]

5. 1. *Trichoderma viride*

Trichoderma viride tvoří na Sabouraudově nebo sladinkovém agaru vločkovité porosty s typicky kokosovou vůní a v době zralosti je mycelium nesouvisle zbarvené dozelena, což je způsobeno přítomností spor (viz. příloha – obr. č.8). Pod mikroskopem pozorujeme typické křížkovité útvary způsobené růstem fialid. *Trichoderma viride* produkuje enzymy celulosu a chitinasu, které degradují celulosu a chitin. Proto můžeme

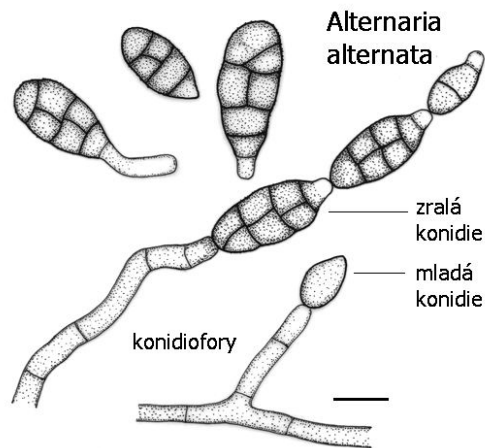
Trichoderma viride nalézt na dřevě, které obsahuje celulosu, a na buněčných stěnách hub, které obsahují chitin. Tento druh napadá skladované obiloviny, ovoce a zeleninu, hojně je rozšířen v půdě (viz. příloha – obr. č.9) (Klaban, 2005). *Trichoderma viride* produkuje fungistatická antibiotika gliotoxin a viridin (mykotoxiny) (Malíř a kol., 2003). V důsledku produkce gliotoxinu byl původní název tohoto druhu *Gliocladium virens* (Howell, 2003). Fungicidní aktivita se využívá k biologické ochraně rostlin proti patogenním plísním – konkrétně jde o *Rhizoctonia*, *Pythium* a *Armillaria* (Mishra, 2011). Enzymy celulosa a chitinasa způsobují štěpení polysacharidů, které jsou zodpovědné za tuhost buněčné stěny, čímž dochází k porušení této stěny a patogen je zničen (Howell, 2003).

6. Rod ALTERNARIA

Rod *Alternaria* (obr. č.5) patří do říše Fungi (houby), oddělení Ascomycota, řádu Pleosporales a čeledi Pleosporaceae. Na kultivačních médiích se tento rod vyznačuje rychlým růstem. Zpočátku tvoří bílé kolonie. Později jsou šedé až olivově hnědé (viz. příloha – obr. č.10). Vzhled kolonií přechází od zrnatého až po vlnatý (Malíř a kol., 2003). Charakteristické vícebuněčné spory mají podélné a příčné přepážky. Proto se jim říká spory zdřovité neboli muriformní (z lat. muris = zeď) (Klaban, 2005). Teplotní optimum pro růst je 25-28 °C, vyskytovat se však může v teplotním rozmezí od -5 °C až po 36 °C (Kubátová, 2011). Rod *Alternaria* patří mezi kosmopolitně rozšířené mikromycety. Vyskytují se především v půdních ekosystémech (kde se podílejí na rozkladu organického substrátu) (Malíř a kol., 2003). Dále na rostlinách nebo jako vzdušná kontaminace v mlékárnách a na stěnách pivovarských místností. Ve skladištích zeleniny způsobuje *Alternaria* skvrnitost košťálovin a černou hnilobu mrkve. Tmavá barva spor i mycelia chrání tuto plíseň před účinky slunečního světla, proto se často vyskytuje ve vzduchu (Šilhánková, 2002). Některé druhy jsou saprofyty (Malíř a kol., 2003).

Tento rod produkuje velmi toxický metabolit *Alternaria alternata* toxin (AAT) podobný fumonisinu a kyselinu tenuazonovou (TeA). Mezi méně významné mykotoxiny patří alternariol (AOH). Tyto mykotoxiny vykazují mutagenní aktivitu (Kubátová, 2011). Spory tohoto rodu se mohou vyskytovat ve vysokých koncentracích v ovzduší a dochází k jejich vdechování. Proto je rod *Alternaria* velmi častým

původcem alergií, senné rýmy a astmatu. Způsobuje oportunní infekce u jedinců s oslabenou imunitou (např. po transplataci kostní dřeně). Dále byly hlášeny případy onychomykózy, kožních infekcí nebo keratitidy. *Alternaria* kolonizuje vedlejší nosní dutiny, což může vést k rozvoji chronického zánětu těchto dutin. Mimo jiné je původcem zánětu středního ucha, zejména u zemědělských pracovníků pohybujících se v terénu (Klaban, 2005).



Obr. č.5: *Alternaria alternata*
 [www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm]

6. 1. *Alternaria alternata*

Pro kultivaci tohoto druhu se nejčastěji používají kultivační média MEA, PCA nebo bramboro-glukózový agar s chloramfenikolem (PDA). Na PCA roste v podobě sametových či vlnatých tmavých až černých kolonií. Teplotní optimum je 25-28 °C (Kubátová, 2011). *Alternaria alternata* může napadat tyto potraviny – obiloviny (pšenice, ječmen), zeleninu (rajčata, květák, okurka, brambory), ovoce (jablka, banány, meloun), ořechy (pekanové, lískové, arašídy) nebo maso (chlazené, mražené, sušené) (viz. příloha – obr. č.11). Mezi produkované mykotoxiny patří AAT, AOH, alternariol monometyl éter (AME) nebo TeA (Malíř a kol., 2003). Výskyt alternariových mykotoxinů v potravinách je velmi nízký a možnost expozice člověka je omezená. Proto dosud nebyly stanoveny žádné zákonné nebo obecné zásady stanoveného limitu pro tyto mykotoxiny (Lawley, 2011)

7. Kvalitativní metody stanovení vláknitých mikromycetů

Kolonie jsou na diagnostických živných půdách hodnoceny podle svých makromorfologických znaků, v připraveném mikroskopickém preparátu jsou hodnoceny podle mikromorfologických znaků. V posledních letech dochází k rozvoji identifikace pomocí metod molekulární biologie, chemických a biochemických metod (Malíř a kol., 2003). Přehled uveden v tabulce č. 1.

Přímé metody	Nepřímé metody
<u>Kultivační a makroskopické techniky</u> a) plotnové metody b) příprava mikroskopických preparátů pro světelný i elektronový mikroskop	<u>Chemické metody</u> a) elektroforéza enzymů b) stanovení sekundárních metabolitů (mykotoxinů)
	<u>Biochemické metody</u> FF MicroPlate (BIOLOG) Identifikační test pro vláknité mikromycety
	<u>Molekulárně biologické metody</u> a) PCR b) RT – PCR

Tabulka č.1: Kvalitativní stanovení vláknitých mikromycetů v potravinách (Malíř a kol. 2003).

7. 1. Přímé metody

7. 1. 1. Identifikace podle makromorfologických znaků (makrohabitu)

Stanovení se provádí na diagnostických živných půdách (např. Czapek agar, Czapek Yeast extract agar – rod *Penicillium* a *Aspergillus*, bramboro-glukózový agar – rod *Fusarium*). Hodnotí se struktura kolonie, její velikost, zbarvení kolonie, paprscité rýhování, soustředná vrstevnatost kruhových zón, okrajový sterilní lem, výpotek na povrchu kolonie v podobě různě zbarvených krůpějí, zbarvení spodní strany kolonie a pigmentová proliferace do okolního agaru (Zahradnický a kol., 1987).

7. 1. 2. Identifikace podle mikromorfologických znaků (mikrohabitu)

Provádí se v mikroskopickém preparátu po obarvení laktofenolem. Na základě typických morfologických struktur mycelia, tvaru a velikosti nepohlavních rozmnožovacích orgánů, pohlavních a nepohlavních spór se identifikují vybrané rody s využitím odborné literatury a identifikačních klíčů (Zahradnický a kol., 1987).

7. 2. *Nepřímé metody*

7. 2. 1. *Molekulárně biologické metody*

Tyto metody detekují odlišnost v DNA mezi jednotlivými druhy mikromycetů. Existuje několik metod, které se mohou navzájem kombinovat. Dnes se nejčastěji využívá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) (Malíř a kol., 2003).

7. 2. 1. 1. *Polymerázová řetězová reakce (PCR)*

PCR je metoda, pomocí které lze z velmi malého množství biologického materiálu vyprodukovat bez přítomnosti živých buněk až miliardy identických kopií určitého fragmentu DNA. Metoda PCR má hlavní význam při identifikaci druhů rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Malíř a kol., 2003).

Větší části zkoumané DNA se nejprve pomocí enzymu restriční endonukleáza „rozstříhají“, na menší úseky. Vlákna těchto krátkých úseků se vlivem zvýšené teploty (92 – 95 °C) oddělí. Vzniknou dva jednoduché řetězce. Termálním porušením vodíkových můstků mezi jednotlivými bázemi DNA nastává denaturace. V dalším kroku se primery (krátké syntetické oligonukleotidy o 15 – 20 nukleotidech). Slouží jako startovací body pro syntézu DNA a navážou se na požadovaná koncová místa na oddělených řetězcích DNA. Následuje inkubace při 70 – 78 °C s teplotně stabilní DNA polymerázou (např. Taq polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*) a s deoxynukleotidfosfáty. Takto získáme dvě nové kopie DNA. Tento proces zahřívání se stále opakuje, dokud není dosaženo dostatečného množství požadovaných dvouřetězcových DNA (Ferrer et al., 2001).

7. 2. 1. 2. *RT-PCR (PCR v reálném čase)*

Sledujeme přírůstek množství DNA v reakční směsi v reálném čase. Toho se může dosáhnout dvěma způsoby. Buď se použije interkalační barvivo typu SYBRgreen nebo tzv. TaqMan sonda, což je oligonukleotid obsahující na jednom konci fluorescenční barvu a na druhém konci zhášeč, který pohlcuje fluorescenci. Při degradaci sondy DNA polymerasou se uvolní fluorescenční barvivo a zvýší se intenzita fluorescence. Zatímco první mechanismus je nespecifický a indikuje jakékoli zvýšení množství DNA (např. při nespecifické vazbě primerů), použití TaqMan sondy je díky použití tří oligonukleotidů specifičtější a při použití fluorescenčních barviv o rozdílných excitačních vlnových délkách umožňuje i sledování exprese více genů zároveň (TSUI et al., 2011).

7. 2. 2. Chemické metody

7. 2. 2. 1. Elektroforéza izoenzymů

Identifikace je založena na elektroforetickém stanovení vybraných enzymů – tzv. zymogramovou technikou – schopnost zkvašovat různé cukry (Wilkesman a Kurz, 2009).

7. 2. 2. 2. Chemotaxonomie – stanovení sekundárních metabolitů (mykotoxinů)

Stanovení toxinogenity se provádí kultivací na specifických živných půdách (např. YES médiu) s následným analytickým stanovením příslušných mykotoxinů (Malíř a kol., 2003).

7. 2. 3. Biochemické metody

Test FF MicroPlate BIOLOG slouží ke zjišťování schopnosti více než 500 druhů vláknitých mikromycetů využívat (utilizovat) různé zdroje uhlíku a asimilovat různé cukry a dusíkaté látky (tzv. auxanogramy) na mikrotitrační destičce (Fungi Identification, 2007)

8. Kvantitativní metody stanovení vláknitých mikromycetů

8. 1. Metody přímé mikroskopie

8. 1. 1. Howardovo číslo

Principem je vytvoření suspenze potraviny a nanesení definovaného množství na podložní sklo s mřížkou. Spóry a úlomky mycelia se počítají ve 25 políčkách pod mikroskopem. Howardovo číslo se určí jako počet pozitivních zorných polí dělených celkovým počtem prohlédnutých polí násobeno 100 (Klaban, 2005).

8. 1. 2. Využití specifických barviv

Tato specifická barviva mají afinitu ke stěnám hyf a spór mikromycetů, které zbarví specifickým způsobem. Zbarvené spóry a úlomky mycelia se vyhodnocují mikroskopicky. Dle použití činidla se hyfy a spóry mikroskopických hub barví modře nebo do červena (Malíř a kol., 2003).

8. 1. 3. Fluorescenční techniky

Tyto techniky využívají fluorescenčních činidel, například Blankophor nebo Rylux. Nebo využívají specifické protilátky značené fluorescenčními činidly. Tato metoda je založena na reakci antigenu mycelia mikromycetů (polysacharidu galaktomananu) a specifické značené protilátky. Pod mikroskopem je detekována a hodnocena fluorescence komplexu antigen – protilátka. Významné jsou cyklodextriny, které se používají k zesílení fluorescenční emise. Jedná se o cyklické oligosacharidy složené z podjednotek s obsahem amylosy a používají se například ke stanovení OTA, ZEN nebo aflatoxinů (Maragos et al., 2008).

8. 2. Kultivační techniky

8. 2. 1. Diluční plotnové metody

Tyto metody jsou v České republice ošetřeny technickými normami. Například ČSN ISO 7954 – Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísní. Interpretaci získaných výsledků mikrobiologického vyšetření plísní a kvasinek řeší vyhláška 294/97Sb. Stanovení speciálních skupin mikroskopických hub (xerofilních, toxinogenních, termorezistentních, stresovaných) není již technickou normou řešeno. Tyto otázky řeší vydaná doporučení odborníků Mezinárodní komise mykologie potravin (ICFM) (Malíř a kol., 2003).

8. 2. 2. SimPlate

Jde o technický prostředek, který obsahuje kulatou umělohmotnou desku s 84 jamkami, sací proužek buničité vaty a dehydrovanou živnou půdu. Používá se ke spolehlivému stanovení mikroskopických hub přítomných v potravinách již za 48 hodin. Test je založen na biochemických reakcích, kdy je testována přítomnost klíčových hydrolytických enzymů vláknitých mikromycetů. V případě pozitivní reakce dojde ke zbarvení tekuté živné půdy v jamce (Townsend a Naqui, 1998).

8. 2. 3. Petrifilm TM destičky

Destičky obsahují živné médium pro okamžité použití, určené ke spolehlivému stanovení plísní běžně přítomných v potravinách. Jde o alternativu živné půdy na Petriho miskách. Živné médium je vysušené obohacené o antibiotika a barevný fosfatázový indikátor ke zvýšení vizualizace růstu mikroskopických hub na destičce (Tavolaro et al., 2005).

8. 3. Stanovení specifických skupin vláknitých mikromycetů

8. 3. 1. Stanovení toxinogenních mikromycetů

Izoláty vláknitých mikromycetů se kultivují na specifických diagnostických médiích, kde rostou specifickým způsobem (Malíř a kol., 2003).

8. 3. 1. 1. *Aspergillus flavus and parasiticus* agar (AFPA)

Složení tohoto agaru je následující – peptidový extrakt zvířecí tkáně, kvasnicový extrakt, železitý citronan amonný, dichloran a agar. Konečné pH by mělo být kolem 6,3 při teplotě 25 °C. Připravené médium potom skladujeme při teplotě pod 8 °C a udržujeme v suchu. Dichloran napomáhá identifikaci hub a peptidový extrakt zvířecí tkáně společně s kvasnicovým extraktem zrychlují tempo růstu hub. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* vytváří po inkubaci 42-48 hodin při teplotě 30°C oranžovo-žlutou pigmentaci jak na spodní straně kolonie, tak jejím okolí. Zbarvení je způsobeno reakcí železitých iontů s aspergilovou kyselinou za vzniku barevného komplexu (Pitt et al., 2004).

8. 3. 1. 2. *Dichlore Rose bengal Yeast Extract sucrose* agar (DRYES)

Penicillium verrucosum na této půdě produkuje červeno-fialový pigment, který zabarvuje spodní stranu kolonie a živnou půdu (Malíř a kol., 2003).

8. 4. Stanovení toxinogenity vláknitých mikromycetů

8. 4. 1. Testace izolovaného kmene vláknitých mikromycetů na syntetické živné půdě

Např. 2% kvasničný extrakt + 2% sacharóza, Yeast Extract Sucrose Agar [YES]. Test se provádí na základě průkazu vyprodukovaných mykotoxinů na vhodném substrátu (Malíř a kol., 2003).

8. 4. 2. Přímá testace potraviny

Potravina, ze které byl potenciálně toxinogenní kmen vláknitých mikromycetů izolován, se nasype na Petriho misku, zvlhčením se upraví její aw a inkubuje se v biologickém termostatu při teplotě 26°C. Tím se vytvoří vhodné podmínky pro rozvoj a růst mikroskopických hub a k produkci sledovaných mykotoxinů. Po čtrnáctidenní kultivaci při 26°C je potravina s porostem mikroskopických hub zpracována a vyhodnocena pomocí chromatografických (HPLC, TLC) či imunochemických metod (ELISA) (Malíř a kol., 2003).

8. 4. 2. 1. *ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay)*

Jedná se o sendvičovou metodu enzymové imunoanalýzy, která je založena na schopnosti specifických protilátek rozeznávat trojrozměrné struktury mykotoxinů (Klaban, 2005). Dnes se již běžně používají komerčně dodávané soupravy pro ELISA test, které umožňují zkrátit inkubační dobu až na minuty a používat malé objemy vzorků (Zheng et al., 2006).

Do mikrotitračních jamek, kde jsou již navázané specifické protilátky proti mykotoxinům, se přidá vzorek společně s konjugátem, který je značený enzymem. Vzorek s konjugátem bojují o vazebná místa na protilátce. Poté následuje promytí, aby se odstranily nenavázané složky. V další fázi se do reakce přidává substrát, který reaguje s enzymem a dochází ke vzniku barevného (komplexu) produktu. Nakonec se spektrofotometricky proměří absorbance, která je nepřímo úměrná koncentraci mykotoxinu ve vzorku (Zheng et al., 2006).

8. 4. 2. 2. *Tenkovrstvá chromatografie (TLC)*

Tato metoda je založena na vzlínání směsi rozpouštědel tenké vrstvě sorbentu na povrchu vhodného nosiče. Rozpouštědlo projde přes vzorek a jeho jednotlivé složky jsou unášeny různou rychlostí po vrstvě sorbentu. Jakmile dojde čelo rozpouštědla na konec desky, pohyb se zastaví.

Při chromatografii se osvědčilo nanášet na desku vzorek, standard mykotoxinu a vzorek s přidaným standardem. Takto lze snadno objevit případy, kdy balastní látky různými mechanismy blokují detekci mykotoxinů. Analyzovanou látku poté sledujeme přímo (je-li barevná), pod UV světlem nebo ji vizualizujeme vhodným postřikem chemických látek (Scott et al., 1970).

8. 4. 2. 3. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

Zde se využívají drobné kolonky, skrze které je unášecí soustava protlačována pumpou. Moderní přístroje již umožňují kontinuálně měnit složení unášecí soustavy. Průchod sledovaných látek skrze kolonu je detekován na základě fyzikálních vlastností roztoku. Nejčastěji se jedná o absorpci viditelného, infračerveného nebo ultrafialového světla. V případě analýzy aflatoxinů se využívá tzv. packed flow cell. Jedná se o kyvetu z křemenného skla naplněnou silikagelem, která zesiluje fluorescenci aflatoxinů a tím vzrůstá citlivost detekce až o řád. Hlavní nevýhodou této metody jsou ztráty při čištění (Pascale, 2009).

8. 5. Chemické metody

Pomocí těchto metod se stanovují látky, které jsou součástí např. stěny hyfy nebo vznikají metabolickou činností mikromycetů.

8. 5. 1. Stanovení ergosterolu

Ergosterol je indikátorem růstu mikromycetů v potravinách. Je extrahován metanolem a po saponifikaci vzorku KOH a etanolem je reextrahován do petroléru. Po zahuštění na definovaný objem se provádí čištění vzorku separací na pevné fázi a stanovení ergosterolu je provedeno metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) (Davídek a kol., 1977).

8. 6. Imunologické metody

Tyto metody využívají latex - aglutinační testy (např. ECO-BIO Belgie, Holland Biotechnology) a ELISA metody (Biopharm SRN). Mikromycety rodu *Aspergillus* a *Penicillium* produkují imunologicky identické a aktivní extracelulární polysacharidy galaktomanany, které jsou rozpustné ve vodě. Jejich produkce je závislá na hmotnosti mycelia a je tedy v relaci se stavem kontaminace potravin. Tyto antigeny jsou termostabilní, což umožňuje hodnotit i potravinové suroviny, které byly tepelně opracovány nebo ošetřeny radiačně (Malíř a kol., 2003).

8. 6. 1. Latex – aglutinační testy

Jako nosiče se zde používají latexové částice, jejichž výhodou je inertnost (neschopnost reagovat). Na těchto částicích jsou navázané specifické protilátky, které reagují s příslušnou složkou, kterou chceme stanovit. Množství aglutinátu potom odpovídá množství stanovované látky (Zahradnický a kol., 1987).

8. 7. Fyzikálně-chemické metody

8. 7. 1. Biosenzory

Jedná se o analytický přístroj, který obsahuje citlivý prvek biologického původu. Tento prvek se nachází v těsném kontaktu nebo je součástí fyzikálně-chemického převodníku, který poskytuje signál vhodný k dalšímu zpracování. Biosenzor poskytuje elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika chemických

látek ve vzorku (Skládal, 2002). Existuje mnoho druhů biosenzorů – elektrochemické, potenciometrické, amperometrické nebo konduktometrické. Ke stanovení mykotoxinů jsou však nejvýhodnější biosenzory optické (Taitt a kol, 2008).

Základním principem optických biosenzorů je interakce světelného záření s chemickými látkami. Jako detektory se zde používají fotonásobiče nebo fotodiody, které jsou oproti fotonásobičům méně citlivé. Detekce je založena na fluorescenčně značených protilátkách (stanovujeme mykotoxiny ve vzorku) nebo na fluorescenčně značených aktivních mykotoxinech (stanovujeme ve vzorku protilátku proti mykotoxinům). Nevýhodou metody je citlivost na optické znečištění, naopak výhodou je možnost detekce několika mykotoxinů v jednom vzorku najednou (Taitt a kol., 2008).

8. 7. 2. Povrchová plasmová rezonance (SPR)

Tato technika využívá tenký kovový film mezi dvěma transparentními médii různého indexu lomu, např. skleněný hranol a roztok vzorku. Pozoruje se pokles intenzity odraženého světla v určitém úhlu, který je závislý na indexu lomu media na neosvětlené straně povrchu. Tento úhel vzniká ve chvíli, kdy se biomolekuly vážou na povrch a mění se index lomu povrchové vrstvy (Hodnik, Anderluh, 2009).

Příkladem je detekce aflatoxinů. Konjugát aflatoxinu je imobilizován na povrchu čipového snímače a protilátky s volným mykotoxinem mohou volně protékat po povrchu. Konjugovaný a volný toxin soutěží o vazbu na protilátku. V důsledku vazby protilátek na konjugát se mění index lomu. Tyto změny měříme pomocí SPR (Daly a kol., 2000).

K dalším fyzikálně – chemickým metodám patří například měření impedance (vodivosti), stanovení CO₂, stanovení volatilních (těkavých) látek nebo stanovení adenosin trifosfátu (ATP) (Malíř a kol., 2003).

9. Metody laboratorní diagnostiky mikromycetů v lékařské mykologii

Včasná a správná diagnostika je hlavní pro zvládnutí houbové infekce – čím je houbová infekce závažnější, tím je její diagnóza obtížnější a zdouhavější. Kožní a slizniční formy mykóz jsou snadno rozeznatelné lékařem na základě klinického obrazu, laboratorní nálezy u orgánových a systémových infekcí zřídka poskytnou jednoznačné a spolehlivé výsledky (Malíř a kol., 2003).

9. 1. Laboratorní metody

9. 1. 1. Odběr a zpracování materiálu

Odběr provádí vyškolená a poučená osoba, která používá metody a techniky odběru, správné nástroje a pomůcky, dodržuje aseptické a bezpečnostní podmínky s ohledem na specifika, která vyplývají z práce s potenciálně patogenními houbami. Materiál musí být odebírán z aktivního místa infekce a v dostatečném množství. Transport vzorku by měl být proveden do 2 hodin po odběru vzorku (Malíř a kol., 2003).

9. 1. 2. Kultivace

Základním kultivačním médiem je Sabouraudův glukózový agar (SGA), který existuje v několika modifikacích (rozdílný obsah glukózy, jiné pH) – pro zabránění bakteriální kontaminace se přidává chloramfenikol nebo gentamycin. Mezi další agary patří Czapkův-Doxův, bramborový a sladinkový. Většina vláknitých mikromycet roste při teplotě okolo 25°C a ke kultivaci je potřeba 24 – 72h (Zahradnický a kol., 1987).

9. 1. 3. Mikroskopie

Mikroskopické vyšetření urychluje diagnózu a umožňuje nasazení adekvátní terapie. Obvykle se toto vyšetření provádí pouze ve světelném poli pomocí suchých objektivů (10 x až 40 x). Barvení slouží ke zviditelnění houby tak, abychom mohli určit u jednotlivých struktur jejich tvar, velikost a uspořádání. Mezi tato barvení patří například Gramovo barvení, orientační barvení nebo fluorescenční barvení (Klaban, 2005).

9. 1. 4. Histologické vyšetření

Jedná se o nejspolehlivější laboratorní diagnostickou metodu, kterou lze použít pro průkaz houbové etiologie. Existuje mnoho technik známých z bakteriologie. Například stříbření podle Grocotta, které slouží pro barvení hub, které bývají typicky černě zbarvené (Malíř a kol., 2003).

9. 2. Sérologické a imunologické vyšetření

Tyto metody jsou založeny na stanovení protilátek u alergických projevů a aspergilomů. U oportunních infekcí jsou založeny na stanovení houbového antigenu. Mezi nejběžněji používané techniky patří imunodifúze, latexová aglutinace a různé varianty enzymové imunoanalýzy (ELISA) (Zahradnický a kol., 1987).

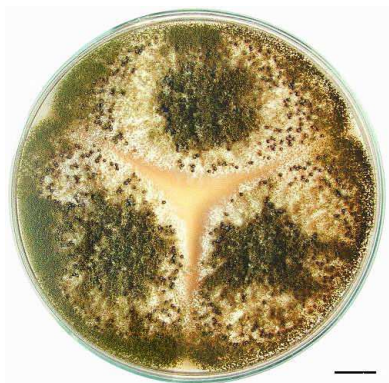
10. Závěr

V mé bakalářské práci se zabývám několika významnými rody toxinogenních plísní. Konkrétně se jedná o rod *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* a *Alternaria*. U každého rodu jsem se zaměřila na některé významné druhy. Podrobněji se zabývám jejich morfologií, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a výskytem v potravinách. Mykotoxiny, které produkují, se mohou vyskytovat nejen v potravinách, ale také v ovzduší, vodě či půdě. Mohou tak ohrozit různými způsoby zdraví člověka. Ať už požitím kontaminovaných potravin a vody či vdechnutím. Dalším rizikem je požití produktů připravených z kontaminovaných potravin.

Poslední část mé bakalářské práce je věnována stanovení mykotoxinů různými metodami. Od kultivace, přes mikroskopické vyšetření až po metody chemické, fyzikálně-chemické či imunologické. V dnešní době existuje spousta metod pro stanovení mykotoxinů a jsou již známé ty nejučinnější, které jsou schopné detekovat velmi malé koncentrace mykotoxinů.

Myslím si, že do budoucna se bude mykotoxinům věnovat ještě větší pozornost, neboť jsou stále objevovány nové mykotoxiny a jejich negativní účinky na zdraví člověka.

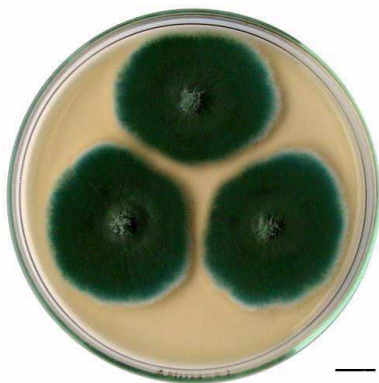
Přílohy



Obrázek č.1: *Aspergillus flavus* na CYA po 14 dnech při 25 °C [www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm].



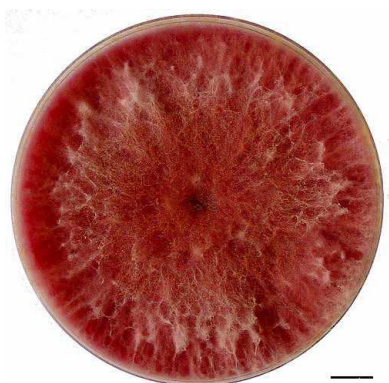
Obrázek č.2: *Aspergillus flavus* na kukuřici [www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/node/194].



Obrázek č.3: *Penicillium roqueforti* na CYA po 7 dnech při 25 °C [www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm].



Obrázek č.4: *Penicillium roqueforti* na sýru plísňového typu [www.eplantscience.com/index_files/fungus.php]



Obrázek č.5: *Fusarium culmorum* na PGA po 14 dnech při 25 °C [www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm]



Obrázek č.6: Pšenice napadená *Fusarium culmorum* [www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/].



Obrázek č.7: Onychomykóza způsobená *Fusarium oxysporum*

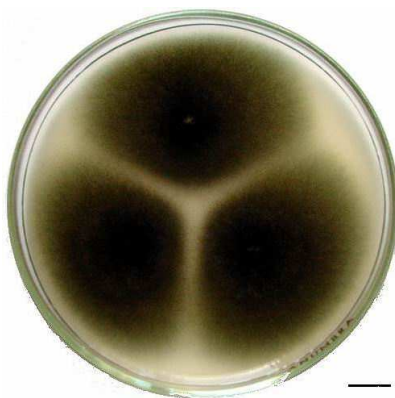
[www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/syndrom-diabeticke-nohy450804].



Obrázek č.8: *Trichoderma viride* na MEA po 14 dnech při 25 °C
[www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm].



Obrázek č.9: *Trichoderma viride* na kůře stromu
[<http://www.projectnoah.org/spotting/8840348>].



Obrázek č.10: *Alternaria alternata* na PCA po 7 dnech při 25 °C
[www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm].



Obrázek č.11: Černé léze na ovoci způsobené *Alternaria alternata*
[ucanr.org/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=3101].

Seznam použité literatury

ATCHESON, BA., TAYLOR, PJ., MUDGE, DW., JOHNSON, DW., HAWLEY, CM., CAMPBELL, SB., ISBEL, NM., PILLANS, PI., TETT, SE.: Mycophenolic acid pharmacokinetics and related outcomes early after renal transplant. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2005, vol. 59, no. 3, 271-280, ISSN 0306-5251.

BAKER, SE.: *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology*, 2006, vol. 44, 1-5.

CIEGLER, A., KURTZMAN, CP.: Penicillic Acid Production by Blue-Eye Fungi on Various Agricultural Commodities, 1970, no. 5, 1-4.

COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2006.

DALY, SJ., KEATING, GJ., DILLON, PP., MANNING, BM., O'KENNEDY, R., LEE, HA., MORGAN, MRA.: Development of Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for Aflatoxin B 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, no. 11, 5097-5104, ISSN 0021-8561.

D'ANTONIO, D., VIOLANTE, B., FARINA, C., SACCO, R., ANGELUCCI, D., MASCIULLI, M., IACONE, A., ROMANO, F.: Necrotizing Pneumonia Caused by *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, vol. 35, no. 12, 3335-3337.

DAVÍDEK J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. *Praha: Nakladatelství technické literatury*, 1977, 1-718.

ELEWSKI, BE.: Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, vol. 11, no. 3, 415-429.

EUROPEAN COMMISSION: Scientific Committee on Food, expressed on 2 December 1999

FERRER, C., COLOM, F., FRASÉS, S., MULET, E., ABAD, JL., ALIÓ, JL.: Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. *Journal of clinical microbiology*, 2001, vol. 39, no. 8, 2873-2879.

Fungi Identification Test Panel: FF MicroPlate™, 2007. Dostupné z <http://www.biolog.com/pdf/milit/00A%20010rB%20FF%20Sell%20Sheet%20Mar07.pdf>

HARMAN, GE., HOWELL, ChR., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M.: Trichoderma species — Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews: Mikrobiology*, 2004, vol. 2, 1-14.

HODNIK, V., ANDERLUH, G.: Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance. *Sensors*. 2009, roč. 9, č. 3, 1339-1354, ISSN 1424-8220.

HOWELL, CR.: Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center*, 2003, vol. 87, no. 1, 4-10.

HRUBÝ, S., TUREK, B.: Mikrobiologická problematika ve výživě. *Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví*, 1996, 1-145, ISBN 80 7013-232-9.

HUSSEIN, HS., BRASEL JM.: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001. vol. 167, no. 2, 101 – 134.

JANATI, SSF., BEHESHTI, HR., FAHIM, NK., FEIZY, J.: Aflatoxins and Ochratoxinin A in Bean from Iran. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 2011, vol. 87, no. 2, 194–197.

KLABAN, V.: Ilustrovaný mikrobiologický slovník. *Praha: Galén, 2005, 1-654, ISBN 80-7262-341-9.*

KUBÁTOVÁ, A.: Miniatlás mikroorganismů, [cit. 2011-11-29]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlás/mikr.htm>

LATGE, JP.: *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, vol. 12, no. 2, 310–350.

LAWLEY, R.: *Alternaria* Toxins. *Leatherhead Food International*, 2011, Dostupné z <http://www.micotoxinas.com.br/alertoxins.htm>

LOUGHMAN, R., THOMAS, G., WRIGHT, D.: *Fusarium* head blight of cereals and stalk rot of maize, millet and sorghum and their identification. *Farmnote / Western Australian Department of Agriculture*, 2004, no. 78, ISSN 0726-934x.

MALÍŘ, F., OSTRÝ V. a kol.: Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. *Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů*, 2003, ISBN 80-7013-395-3.

MALIR, F., ROUBAL, T., BRNDIAR, M., OSTERREICHER, J., SEVERA, J., KNIZEK, J., KACEROVSKY, J., TMEJOVA, M., BETBEDER, AM., BAUDRIMONT, I., CREPPY, EE.: Ochratoxin A in the Czech Republic. *Journal of Toxikology*, 2001, vol. 20, 261-274.

MARAGOS, CM., APPELL, M., LIPPOLIS, V., VISCONTI, A., CATUCCI, L., PASCALE, M.: Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 2008, vol. 25, no. 2, 164-171.

MATTILA, YT., GAQKAEVA, T., WARD, TJ., AOKI, T., KISTLER, HC., O'DONNELL K.: A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 2009, vol. 101, no. 6, 841-852, ISSN 0027-5514..

MISHRA, BK., MISHRA, RK., MISHRA, RC., TIWARI, AK., YADAV, RS., DIKSHIT, A.: Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. *Archives of Applied Science Research*, 2011, vol. 3, no. 2, 361-369. ISSN 0975-508x.

PASCALE, MN.: Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Institute of Sciences of Food Production*, 2009, no. 117, 15-25, ISSN 0352-4906.

PASQUALOTTO, AC.: Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology.*, 2009, vol. 47, 261 – 270.

PIRES, S., LOPES, J., NUNES, I., GASPAR, E.: Patulin Analysis: Sample Preparation Methodologies and Chromatographic Approaches, 2009, 75-90

PITT, JI.: Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin.*, 2000, vol. 56, no. 1, 184 – 192.

PITT, J., HOCKING, D., GLENN, DR.: 17121 *Aspergillus* Differentiation Agar, Base (AFPA , Base). *Fluka Analytical*, 2004, 1.

PLASENCIA, J., MIROCHA, CJ.: Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, no. 1, 146-150.

SCOTT, PM., LAWRENCE, JW., WALBEEK, W.: Detection of Mycotoxins by Thin-Layer Chromatography: Application to Screening of Fungal Extracts. *Applied Microbiology*, 1970, vol. 20, no. 5, 839-842.

SKLÁDAL, P.: Biosensory, *Masarykova Univerzita Přírodovědecká fakulta*, Brno, 2002, 1-149.

SRINIVASAN, M.: Fungal keratitis. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2004, vol. 15, 321-327.

SUDAKIN, D., FALLAH, P., Toxigenic fungi and mycotoxins in outdoor, recreational environments, 2008, vol. 46, no. 8, 738 – 744.

ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. *Praha: Academia*, 2002, 84, 31 – 313, ISBN 80-200-1024-6.

TÁBORSKÁ, J.: Beta-laktamová antibiotika. *Zdravotnické listy*, © 2007-2012, Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/betalaktamovaantibiotika-142697>

TAITT, ChR., SHRIVER-LAKE, LC., NGUNDI, MM., LIGLER, S.: Array Biosensor for Toxin Detection: Continued Advances. *Sensors*, 2008, vol. 8, no. 12, 8361-8377, ISSN 1424-8220.

TAVOLARO, P., FERRATI, AR., DESTRO, MT., LANDGRAF, M.: Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. *Brazilian journal of microbiology*, 2005, vol. 36, no. 3, 295-300, ISSN 1517-8382.

TOWNSEND, DE., NAQUI, A.: Comparison of SimPlate Total Plate Count test with plate count agar method for detection and quantitation of bacteria in food, 1998, vol. 81, no. 3, 563-569.

TSUI, CKM., WOODHALL, J., CHEN, W., LÉVESQUE, CA., LAU, A., SCHOEN, CD., BASCHIEN, CH., NAJAFZADEH, MJ., HOOG, GS.: Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*, 2011, vol. 2, no. 2, 177-189, ISSN 22106340.

WILKESMAN, J., KURZ, L.: Protease Analysis by Zymography: A Review on Techniques and Patents. *Bentham Science Publishers Ltd.*, 2009, vol. 3, no. 3, 175-184.

ZAHRADNICKÝ, J. a kol.: Mikrobiologie a epidemiologie. *Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství*, 1987, 1-623.

ZHENG, MZ., RICHARD, JL., BINDER, J.: A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. *Mycopathologia*, 2006, vol. 161, no. 5, 261-273, ISSN 0301-486x.

Seznam použitých zdrojů pro přílohy:

Alternaria diseases. *UC Cooperative Extension, Ventura County*, 2010 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <http://ucanr.org/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=3101>

Corn ear with aspergillus ear rot. *Integrated crop management*, 2005 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/node/194>

Fungus. *An Online Botanical Encyclopedia*, © 2009 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: http://www.eplantscience.com/index_files/fungus.php

KUBÁTOVÁ, A.: Miniatlás mikroorganismů, [cit. 2011-11-29]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>

Mycotoxins in the Cereal Chain, 2002 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/>

Project Noah, © 2012 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <http://www.projectnoah.org/spottings/8840348>

Zdravotnické noviny, © 2007-2012 [cit. 2012-05-14]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/syndrom-diabeticke-nohy450804>