

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica
číslo 1/2003

**Metodické doporučení mikrobiologickému zkoušení
potravin a pokrmů**

**Kultivační metoda průkazu
aflatoxinogenních mikromycetů (plísní)
Aspergillus flavus a Aspergillus parasiticus
v potravinách a pokrmech**

Praha, leden 2003

Předseda redakční rady: doc. MUDr. L. Komárek, CSc.
Členové: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika,
RNDr. F. Rettich, CSc., A. Svobodová,
Mgr. J. Veselá, MUDr. J. Volf, Ph.D.

Vydal Státní zdravotní ústav v Praze
ISSN 0862-5956

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA

Číslo 1/2003 – leden 2003

Metodické doporučení

k mikrobiologickému zkoušení potravin a pokrmů

Kultivační metoda průkazu aflatoxinogenních mikromycetů (plísň)

Aspergillus flavus a Aspergillus parasiticus

v potravinách a pokrmech

Autoři: Vladimír Ostrý, Jarmila Škarková, Centrum hygieny potravinových
řetězců - SZÚ Brno

Vytiskl: Ústav jaderných informací, Praha 5 – Zbraslav
Elišky Přemyslovny 1335

Rok vydání 2003, náklad 600 výtisků
Vychází nepravidelně 7-8x ročně

Vydal Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, IČO 75010330
Tel. redakce: 267082288, e-mail: ahemszu@szu.cz

OBSAH

| | |
|--|----|
| Úvod | 5 |
| Charakteristika toxinogenních vláknitých mikromycetů | 5 |
| Charakteristika aflatoxinogenních vláknitých mikromycetů | 5 |
| Taxonomie rodu <i>Aspergillus</i> | 5 |
| Přehled druhů rodu <i>Aspergillus</i> ze sekce <i>Flavi</i> | 6 |
| Mykologická charakteristika rodu <i>Aspergillus</i> | 8 |
| Výskyt v potravinách | 10 |
| Metody stanovení a identifikace | 11 |
| Předmět metodického doporučení a oblast použití | 12 |
| Normativní odkazy | 13 |
| Podstata zkoušky | 13 |
| Popis a historie diagnostické půdy | 13 |
| Příprava diagnostické půdy | 14 |
| <i>Aspergillus</i> Differentiation Medium Base (ADMB) | 14 |
| Složení ADMB diagnostické půdy | 14 |
| Pracovní postup | 14 |
| Fyzikální vlastnosti | 14 |
| Skladovatelnost (expirace) | 15 |
| Aplikace vzorku | 15 |
| Inkubace | 15 |
| Odečítání výsledků a interpretace | 15 |
| Zabezpečení jakosti | 15 |
| Specifický růst <i>Aspergillus flavus</i> na ADMB médiu | 16 |
| <i>Aspergillus flavus</i> a <i>Aspergillus parasiticus</i> agar (AFPA) | 16 |
| Složení AFPA diagnostické půdy | 16 |
| Pracovní postup | 17 |
| Fyzikální vlastnosti | 17 |
| Skladovatelnost (expirace) | 17 |
| Aplikace vzorku | 17 |
| Inkubace | 18 |
| Odečítání výsledků a interpretace | 18 |
| Zabezpečení jakosti | 18 |
| Specifický růst <i>Aspergillus flavus</i> na AFPA médiu | 18 |
| Použitá literatura | 19 |

Příloha

| | |
|--|----|
| Výskyt aflatoxinogenních kmenů <i>Aspergillus</i> sekce <i>Flavi</i> v potravinách v ČR | 20 |
| Autoři metodického doporučení..... | 28 |

METODICKÉ DOPORUČENÍ K MIKROBIOLOGICKÉMU ZKOUŠENÍ POTRAVIN A POKRMŮ

KULTIVAČNÍ METODA PRŮKAZU AFLATOXINOGENNÍCH MIKROMYCETŮ (PLÍSNÍ) *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* V POTRAVINÁCH A POKRMECH

Odůvodnění potřebnosti metodického doporučení

Metodické doporučení pokrývá oblast nezajištěnou na odpovídající odborné úrovni českým technickým předpisem (ČSN).

V soustavě českých technických norem (ČSN) neexistuje předpis pro kultivační metodu průkazu aflatoxinogenních mikromycetů (plísní) v potravinách a pokrmech. Metodické doporučení vychází a navazuje na doporučení Mezinárodní komise pro mykologii potravin (ICFM), která byla vytvořena v rámci Mezinárodní unie mikrobiologických společností (IUMS). V oblasti standardizace metod používaných v mykologii potravin proběhla řada mezinárodních seminářů – workshopů, na nichž byla kultivační metoda průkazu aflatoxinogenních mikromycetů v potravinách diskutována:

- International Workshop on Standardization of Methods for mycological examination of Foods - Boston 1986
- International Workshop on Standardization of Methods for mycological examination of Foods - Baarn 1990
- International Workshop on Standardization of Methods for mycological examination of Foods - Copenhagen, 1994.

Další setkání odborníků mykologie potravin proběhlo na světových mykologických kongresech (Praha 1994, Jeruzalém 1998, Sydney 1999, Oslo 2002).

Cílem metodického doporučení je poskytnout analytikům působícím v oboru mikrobiologického zkoušení potravin a pokrmů metodický postup, odpovídající současné koncepci průkazu toxinogenních mikromycetů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*.

Praktická aplikace metodického doporučení bude realizována při mikrobiologickém zkoušení potravin podle specifikací obsažených ve vyhlášce MZ ČR č. 294/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů.

1. Úvod

1.1 Charakteristika toxinogenních vláknitých mikromycetů

Toxinogenní vláknité mikromycety (plísně) jsou mikroorganismy, které mají schopnost produkovat mykotoxiny. Patří k významným faktorům, které mohou v negativním smyslu ovlivnit zdraví člověka. Plesnivé potraviny, obsahující toxinogenní mikromycety a mykotoxiny, představují významné nebezpečí pro zdraví populace v ČR, zejména z hlediska tzv. pozdních toxických účinků (např. karcinogenních, vývojové toxicity).

Potraviny jsou vhodným substrátem pro kontaminaci, růst a rozmnožování toxinogenních mikromycetů a následně pro produkci mykotoxinů. Z celkového počtu asi 114 druhů mikromycetů, které mají význam v potravinách, je 65 druhů toxinogenních (Ostrý 2000). Potraviny kontaminované toxinogenními mikromycety tedy představují významné nebezpečí tzv. "skrytých mykotoxinů". K nejvýznamnějším toxinogenním mikromycetům patří producenti aflatoxinů.

Jestliže byla u některého kmene určitého druhu vláknitých mikromycetů dříve zjištěna produkce určitého mykotoxinu, je možné považovat všechny kmeny tohoto druhu za *potenciálně toxinogenní*, tj. schopné produkovat určitý mykotoxin. Stanovení reálné toxinogenity kmenů se provádí kultivací na specifických živných půdách (např. YES médiu) s následným analytickým stanovením příslušných mykotoxinů. V posledních letech jsou ke stanovení toxinogenity používány metody molekulárně biologické (např. PCR). Pomocí nich lze detekovat specifické geny, které kódují enzymy podílející se na biosyntéze mykotoxinů.

1.2 Charakteristika aflatoxinogenních vláknitých mikromycetů

1.2.1 Taxonomie rodu *Aspergillus*

Systematické zařazení rodu *Aspergillus* je uvedeno v **tab. č. 1**.

Tabulka č. 1 Systematické zařazení rodu *Aspergillus*

| Říše | Oddělení | Řád | Čeleď | Anamorfní rod |
|---------------|------------|------------|----------------|--------------------|
| Fungi (houby) | Ascomycota | Eurotiales | Trichocomaceae | <i>Aspergillus</i> |

Další podrobnější členění rodu *Aspergillus* je uvedeno v následující **tab. č. 2**.

Tabulka č. 2 Vnitrorodové členění rodu *Aspergillus*

| Podrod | Sekce | Popsané teleomorfy | Významné druhy |
|-----------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Aspergillus</i> | <i>Aspergillus</i> | <i>Eurotium</i> spp. | |
| | <i>Restricti</i> | N | |
| <i>Fumigati</i> | <i>Fumigati</i> | <i>Neosartorya</i> spp. | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| | <i>Cervini</i> | N | |
| <i>Ornati</i> | <i>Ornati</i> | <i>Hemicarpensteles</i> spp. | |
| | | <i>Sclerocleista</i> spp. | |
| | | <i>Warcupiella</i> spp. | |
| <i>Clavati</i> | <i>Clavati</i> | N | <i>Aspergillus clavatus</i> |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Nidulantes</i> | <i>Emericella</i> spp. | <i>Aspergillus nidulans</i> |
| | <i>Versicolores</i> | N | <i>Aspergillus versicolor</i> |
| | <i>Usti</i> | N | |
| | <i>Terrei</i> | N | <i>Aspergillus terreus</i> |
| | <i>Flavipedes</i> | <i>Fennellia</i> spp. | |
| <i>Circumdati</i> | <i>Circumdati</i> | <i>Petromyces</i> spp. | <i>Aspergillus ochraceus</i> |
| | | | <i>Aspergillus melleus</i> |
| | | | <i>Aspergillus petrakii</i> |
| | <i>Wentii</i> | N | <i>Aspergillus wentii</i> |
| | <i>Flavi</i> | N | <i>Aspergillus flavus</i> |
| | | | <i>Aspergillus parasiticus</i> |
| | <i>Nigri</i> | N | <i>Aspergillus niger</i> |
| | <i>Candidi</i> | N | <i>Aspergillus candidus</i> |
| | <i>Cremeri</i> | <i>Chaetosartorya</i> spp. | |
| | <i>Sparsi</i> | N | |
| <i>Stilbothamnium</i> | | N | |

Pozn. N - teleomorfy zatím nebyly popsány

1.2.2 Přehled druhů rodu *Aspergillus* ze sekce *Flavi*

Přehled akceptovaných druhů a nově popsáných druhů aflatoxinogenních mikromycetů rodu *Aspergillus* ze sekce *Flavi* je uveden v **tab. č. 3**.

Tabulka č. 3 Aflatoxinogenní mikromycety rodu *Aspergillus* ze sekce *Flavi*

| Akceptované druhy ¹ | Nově popsané druhy |
|--|--|
| <i>Aspergillus avenaceus</i> G. Sm. <i>Aspergillus clavato-flavus</i> Raper & Fennell <i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Aspergillus leporis</i> States & M. Chr. <i>Aspergillus nomius</i> Kurtzman et al. <i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) Cohn <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare <i>Aspergillus sojae</i> Sakag. & K. Yamada ex Murak. <i>Aspergillus subolivaceus</i> Raper & Fennell <i>Aspergillus tamarii</i> ² Kita <i>Aspergillus zonatus</i> Kwon-Chung & Fennell | <i>Aspergillus bombycis</i> Petersen et al. <i>Aspergillus caelatus</i> B.W. Horn <i>Aspergillus pseudotamarii</i> Ito et al. <i>Aspergillus zhaoqingensis</i> Z. Sun et Z. Qi |

Pozn. Aflatoxinogenní druhy jsou zobrazeny tučnou kurzívou

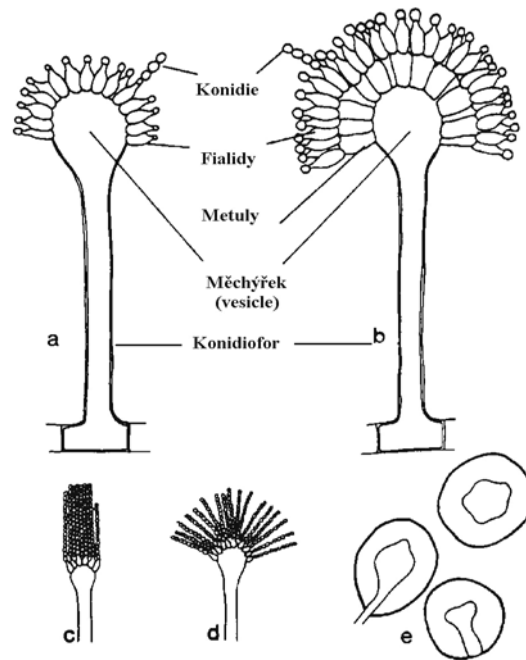
¹ Podle Samsona (1994)

² Průkaz toxinogenity a druhové identifikace je nutno ještě konfirmovat molekulárně biologickými metodami

1.2.3 Mykologická charakteristika rodu *Aspergillus*

Mikrohabitus rodu *Aspergillus* je uveden na **obr. č. 1**

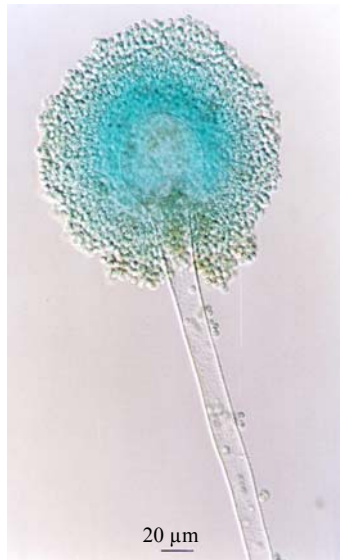
Obrázek č. 1 Mikrohabitus rodu *Aspergillus* podle Gamse aj. (1987)



- Vysvětlivky
- a* - uniseriální konidiofory (1 vrstva fialid)
 - b* - biseriální konidiofory (1 vrstva fialid, 1 vrstva metul)
 - c* - konidiální hlavice sloupcovitá
 - d* - konidiální hlavice paprscitá
 - e* - "Hülle cells" (prázdne buňky)

Mikrohabitus a makrohabitus *Aspergillus flavus* je uveden na **obr. č. 2**.

Obrázek č. 2 Mikrohabitus a makrohabitus *Aspergillus flavus*



a



b

Vysvětlivky: a – Mikroskopický preparát Aspergillus flavus – biseriátní konidiofor (400x)

b – Relativně rychlý růst na Czapekově agaru při 25°C, 5 dní inkubace

1.2.4 Výskyt v potravinách

Výskyt významných aflatoxinogenních druhů rodu *Aspergillus* sekce *Flavi* v potravinách v zahraničí je uveden v **tab. č. 4**. (Ostrý osobní sdělení).

Tabulka č. 4 Výskyt významných aflatoxinogenních druhů rodu *Aspergillus* sekce *Flavi* v potravinách v zahraničí

| Druh | Potravina |
|--------------------------------|--|
| <i>Aspergillus flavus</i> | kukuřice a výrobky z kukuřice, čirok, červená rýže, rýže (paddy rice), rýže (milled rice), rýže (parboiled), oves, pšeničná zrna, obiloviny a výrobky z obilovin, pšenice a pšeničná mouka, chléb, těstoviny, otruby, ječmen, millet (pearl millet) boby (velvet beans), boby (talo beans), sója mungo, hrách (chick peas), hrách (pigeon peas), sójové boby, čerstvé ovoce, citrusy, rajčata, liči, ananas, granátová jablka ořechy, arašídny, ořechy kemiri, pistácie, pekanové ořechy, lískové ořechy, vlašské ořechy, ořechy kola, kokosové ořechy, betelové ořechy pepř, černý pepř, koriandr zpracovaná masa, uzená masa, slanina, šunky, šunky ze Španělska, africké rybí výrobky, sušené, uzené nebo solené ryby z jihovýchodní Asie mléko, sýr |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | amaranth, millet (pearl millet) sójové boby arašídny, lískové ořechy, vlašské ořechy, pistácie, pekanové ořechy zpracovaná masa |
| <i>Aspergillus tamaris</i> | pšenice, ječmen, čirok, kukuřice, rýže (paddy rice), rýže (milled rice) sójové boby, zelené kávové boby, černé fazole, sója mungo, prách (cowpeas), kopra arašídny, pistácie, pekanové ořechy, lískové ořechy, vlašské ořechy, ořechy kola, betelové ořechy, kopra, kakao, palmové jádro, kešu, ořechy kemiri, koření, pepř masné výrobky, solené sušené ryby, uzené sušené ryby |

1.2.5 Metody stanovení a identifikace

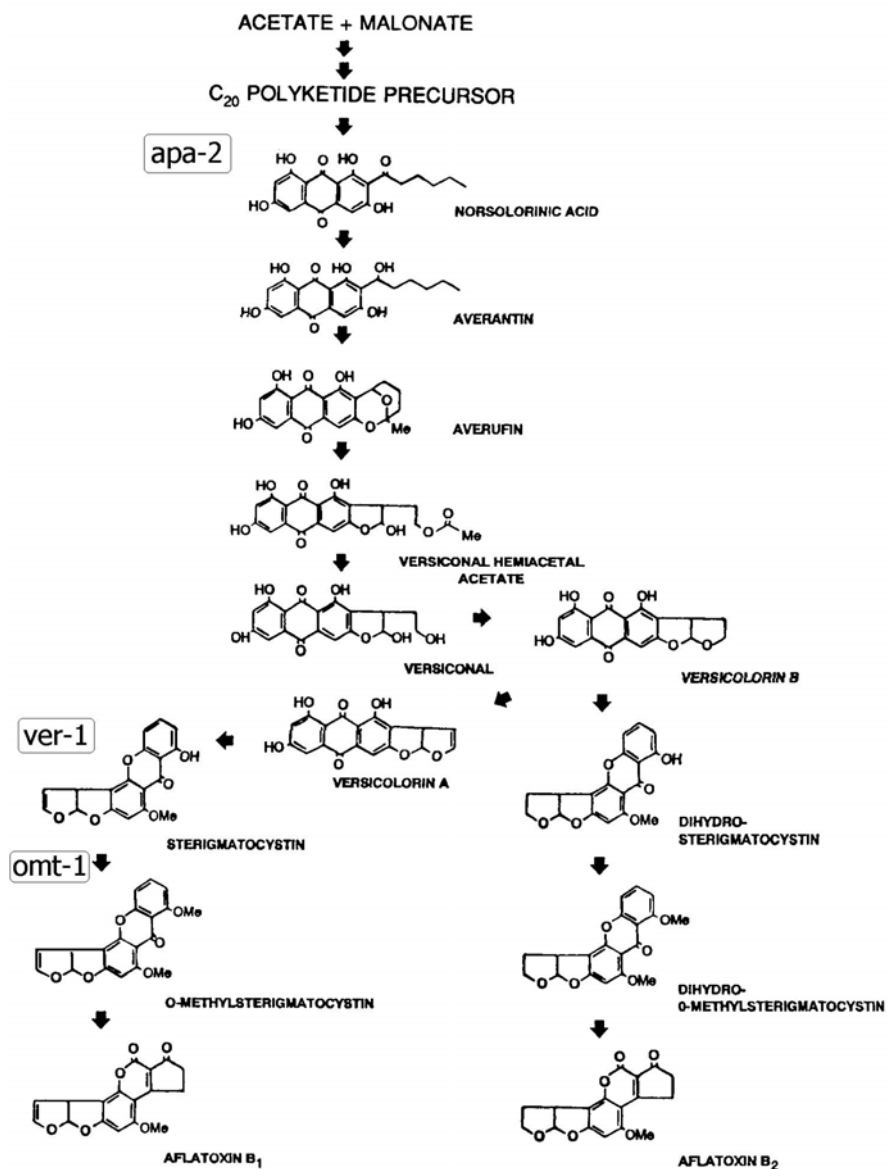
Při determinaci aflatoxinogenních mikromycetů rodu *Aspergillus* ze sekce Flavi jsou využívány:

- morfologické znaky (makrohabitus a mikrohabitus)
- biochemické znaky (např. produkce pigmentů vzniklých reakcí aspergilových kyselin s železitými ionty na AFPA nebo ADMB médiu – u *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* ano, u dosud testovaných kmenů *Aspergillus nomius* nikoliv)
- fyziologické znaky (např. růst na Czapkově agaru při 42°C – *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* dobrý, *Aspergillus nomius* omezený)

V poslední době dochází k rozvoji molekulárně biologických metod pro identifikaci druhů rodu *Aspergillus* v potravinách a zjištění jejich toxinogenity (např. PCR metody).

Na obr. č. 3 je znázorněno schéma biosyntézy aflatoxinů včetně specifických genů (*omt-1*, *ver-1*, *afl R /apa-2/*) a jejich exprese v podobě enzymů, podílejících se a umožňujících uvedenou biosyntézu.

Obrázek č. 3 Schéma biosyntézy aflatoxinů



2. Předmět metodického doporučení a oblast použití

Toto metodické doporučení specifikuje přípravu a použití kultivační metody pro průkaz toxinogenních mikromycetů (plísní) *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* v potravinách a pokrmech.

3. Normativní odkazy

Tabulka č. 5 Normativní odkazy

| Číslo | Název |
|---------------|---|
| ČSN ISO 6887 | <i>Všeobecné pokyny pro přípravu ředění při mikrobiologickém zkoušení</i> |
| ČSN ISO 7667 | <i>Standardní struktura metod mikrobiologického zkoušení</i> |
| ČSN ISO 7954 | <i>Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísni.</i> |
| ČSN ISO 6611 | <i>Mléko a mléčné výrobky – Stanovení počtu jednotek kvasinek a/nebo plísni tvořících kolonie.</i> |
| ČSN ISO 13681 | <i>Maso a masné výrobky – Stanovení počtu kvasinek a plísni – technika počítání kolonií.</i> |
| ČSN ISO 7698 | <i>Obiloviny, luštěniny a odvozené výrobky – Stanovení počtu bakterií, kvasinek a plísni.</i> |
| ČSN ISO 10718 | <i>Korkové zátky – Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie kvasinek, plísni a bakterií schopných růstu v půdě s alkoholem.</i> |

4. Podstata zkoušky

Průkaz toxinogenních mikromycetů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* je založen na reakci kyseliny aspergilové, produkované toxinogenními mikromycety a železitých iontů (Fe^{3+}), které jsou součástí testovacího média. Při této reakci dochází ke vzniku oranžovo - žlutého komplexu, který způsobuje pigmentaci spodní strany kolonie.

4.1 Popis a historie diagnostické půdy

Bothast a Fennell (1974) v návaznosti na práci Jarvise (1973) vyvinuli *Aspergillus* diferenční medium (ADM), obsahující 1,0 % kvasničného extraktu, 1,5 % tryptonu a 0,5 % chloridu železitého, doporučená inkubace byla 3 dny při 28°C. Hamsa a Ayres (1977) přidali do ADM streptomycin a dichloran a doporučili živnou půdu inkubovat 5 dnů při 28°C. Obě média jsou založena na vytvoření jasné oranžovo - žluté spodní pigmentace kolonie u *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Assante aj. (1981) zjistili, že pigmentace spodní strany kolonie je způsobena reakcí kyseliny aspergilové, produkované toxinogenními mikromycety a železitých iontů (Fe^{3+}), které jsou součástí testovacího média. King aj. (1979) a Pitt aj. (1983) dále upravili a optimalizovali složení diagnostické půdy tak, že dochází k dostatečně intenzivnímu zbarvení spodku kolonie a umožňuje rozeznání kolonií *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* za 42 až 48 hodin při 30°C.

V současné době jsou na trhu k dispozici dva obdobné produkty¹, které vychází z práce Pitta aj. (1983):

1. *Aspergillus* Differentiation Medium Base (ADMB) od firmy HIMEDIA
2. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* agar (AFPA) od firmy OXOID

4.2 Příprava diagnostické půdy

4.2.1 *Aspergillus* Differentiation Medium Base (ADMB)

4.2.1.1 Složení ADMB diagnostické půdy

Složení ADMB diagnostické půdy je uvedeno v *tab.č. 6*.

Tabulka č. 6 Složení ADMB diagnostické půdy

| | |
|--|---------|
| Kvasničný extrakt | 20 g |
| Pepton | 10 g |
| Citran železito-amonný | 0,5 g |
| Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin) | 0,002 g |
| Chloramfenikol | 0,1 g |
| Agar | 15 g |
| Destilovaná nebo deionizovaná voda | 1000 ml |

4.2.1.2 Pracovní postup

Suspendovat 22,75 g ADMB v 500 ml destilované vody. Zahřát směs k varu a kompletně rozpustit. Sterilizovat v autoklávu 15 minut při 121°C. Po zchlazení na 50°C asepticky přidat sterilní rehydratovaný obsah jedné lahvičky (50 mg) Chloramfenicol Selective Supplement (FD033) a důkladně promíchat. pH připraveného média by mělo dosáhnout hodnoty $6,3 \pm 0,2$. Rozplnit připravenou živnou půdu do sterilních Petriho misek (průměr 9 cm) po 15 ml a nechat ztuhnout. Použít buď okamžitě nebo uchovávat v temnu při 2 – 4°C. Připravenou půdu je možno používat až 4 týdny.

4.2.1.3 Fyzikální vlastnosti

Vzhled: barva jantarová, čirá

pH : $6,3 \pm 0,2$ (4,55 % vodný roztok živné půdy)

¹ Tato informace je určena uživatelům tohoto metodického doporučení SZÚ pro usnadnění výběru a neznamená podporu či propagaci těchto produktů autory metodického doporučení.

4.2.1.4 Skladovatelnost (expirace)

Pro připravené médium 4 týdny při 2 – 8°C

4.2.1.5 Aplikace vzorku

Vzorek je možno aplikovat několika způsoby:

- na Petriho misku s živnou půdou provést roztěr 0,1 ml naředěného vzorku
- na Petriho misku s živnou půdou aplikovat vzorek izolovaného kmene *Aspergillus flavus* či *Aspergillus parasiticus* jehlou namočenou do suspenze připravené z konidií zkoumaného izolátu a polotuhého agaru
- na Petriho misku s živnou půdou umístit části testovaného vzorku (např. obilky apod.)

4.2.1.6 Inkubace

48 – 72 hodin při 30°C

4.2.1.7 Odečítání výsledků a interpretace

Aspergillus flavus a *Aspergillus parasiticus* produkují oranžovo-žlutou (chromově žlutou) pigmentaci spodní strany kolonie.

Aspergillus niger někdy také produkuje světle žlutou pigmentaci na spodní straně kolonie. Je však snadno rozeznatelný po další 24 – 48 hodinové inkubaci, kdy se začínou vytvářet černé hlavičky konidioforů.

4.2.1.8 Zabezpečení jakosti

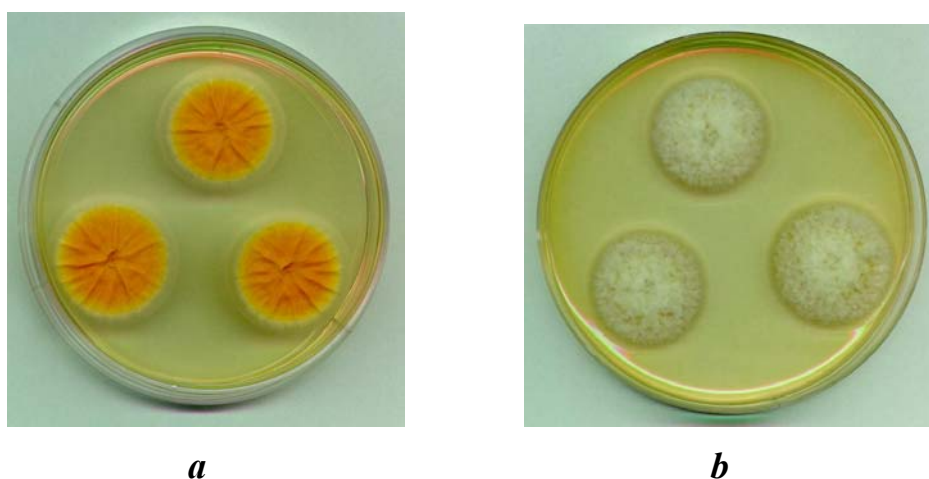
- Jako pozitivní a negativní kontrola se použijí testovací sbírkové kmeny viz **tab. č. 7**, které musí růst na živné půdě definovaným způsobem
- Užívá se inokulační technika
- Spodní strana kolonií musí získat typickou pigmentaci za 48 – 72 hodin inkubace při teplotě 30°C

Tabulka č. 7 Testovací kmeny k zabezpečení jakosti

| Testovací kmeny | ATCC | CSIRO | NRRL | ČSM | Kontroly |
|--------------------------------|-------|-------|------|-------------|---------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> | 22547 | 3084 | 3251 | CCM F - 108 | <i>pozitivní kontrola</i> |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 28285 | 2744 | 2999 | CCM F - 550 | <i>pozitivní kontrola</i> |
| <i>Aspergillus niger</i> | 9642 | 2522 | 3361 | CCM 8189 | <i>negativní kontrola</i> |

4.2.1.9. Specifický růst *Aspergillus flavus* na ADMB médiu

Obrázek č. 4 Specifický růst *Aspergillus flavus* na ADMB médiu



a - spodní strana Petriho misky - typické žlutooranžové zbarvení spodní strany kolonií

b - horní strana Petriho misky

4.2.2 *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* agar (AFPA)

4.2.2.1 Složení AFPA diagnostické půdy

Složení AFPA diagnostické půdy je uvedeno v *tab. č. 8*.

Tabulka č. 8 Složení AFPA diagnostické půdy

| | |
|--|---------|
| Kvasničný extrakt | 20 g |
| Pepton | 10 g |
| Citran železito-amonný | 0,5 g |
| Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin) | 0,002 g |
| Chloramfenikol | 0,1 g |
| Agar | 15 g |
| Destilovaná nebo deionizovaná voda | 1000 ml |

4.2.2.2 Pracovní postup

Suspendovat 22,75 g AFPA Base v 500 ml destilované vody. Zahřát směs a kompletně rozpustit. Připravit sterilní vodný roztok z jedné lahvičky (50 mg) Chloramfenicol Supplement (SR78) a přidat asepticky do živné půdy. Sterilizovat v autoklávu 15 minut při 121°C. Po zchlazení na 50°C rozplnit připravenou živnou půdu do sterilních Petriho misek (průměr 9 cm) po 15 ml a nechat ztuhnout. Použít buď okamžitě nebo uchovávat v temnu při 2 – 8°C. Připravenou půdu je možno používat až 4 týdny.

4.2.2.3 Fyzikální vlastnosti

Vzhled: barva jantarová, čirá

pH : $6,3 \pm 0,2$

4.2.2.4 Skladovatelnost (expirace)

Pro připravené médium 4 týdny při 2 – 8°C

4.2.2.5 Aplikace vzorku

Vzorek je možno aplikovat několika způsoby:

- na Petriho misku s živnou půdou provést roztěr 0,1 ml naředěného vzorku
- na Petriho misku s živnou půdou aplikovat vzorek izolovaného kmene *Aspergillus flavus* či *Aspergillus parasiticus* jehlou namočenou do suspenze připravené z konidií zkoumaného izolátu a polotuhého agaru
- na Petriho misku s živnou půdou umístit části testovaného vzorku (např. obilky apod.)

4.2.2.6 Inkubace

42 – 48 hodin při 30°C

4.2.2.7 Odečítání výsledků a interpretace:

Aspergillus flavus a *Aspergillus parasiticus* produkují oranžovo-žlutý (chromově žlutý) pigment na spodní straně kolonie.

Aspergillus oryzae údajně může také produkovat oranžovo-žlutý (chromově žlutý) pigment na spodní straně kolonie. U kmenů, které jsme testovali jsme tuto pigmentaci za 42 – 48 hodin inkubace při teplotě 30°C nepozorovali.

Aspergillus niger někdy také produkuje světle žlutý pigment na spodní straně kolonie. Je však snadno rozeznatelný po 43 hodinové inkubaci, kdy se začnou vytvářet černé hlavičky konidioforů.

4.2.2.8 Zabezpečení jakosti

- Jako pozitivní a negativní kontrola se použijí testovací sbírkové kmeny viz *tab. č. 7*, které musí růst na živné půdě definovaným způsobem
- Užívá se inokulační technika
- Spodní strana kolonií musí získat typickou pigmentaci za 42 – 48 hodin inkubace při teplotě 30°C

4.2.2.9 Specifický růst *Aspergillus flavus* na AFPA médiu

Obrázek č. 5 Specifický růst *Aspergillus flavus* na AFPA médiu



a



b

a - spodní strana Petriho misky - typické žlutooranžové zbarvení spodní strany kolonií

b - horní strana Petriho misky (kultivace obilíků pšenice na AFPA médiu)

5. Použitá literatura

- Assante G. et al.: J. Ag. Food Chem. 29, 785 - 790 (1981).
- Beuchat L.R.: J.D. Protection 47, 512-591 (1984).
- Bothast R.J. and Fennell D.I.: Mycologia 66, 365-369 (1974).
- Gams, W., Aa, H.A., Plats-Niterink, A.J., Samson, R.A., Stalpers, J.A.: CBS Course of Mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands, 1987, 136 s.
- Hamsa T.A., Ayres J.C.: J. Food Sci. 42, 449-453 (1977).
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N.: Dictionary of the Fungi. International Mycological Institute, UK, 1994, 616 s.
- Jarvis B.: J. Appl. Bact 36, 723-727 (1973).
- King D.A., Hocking A.D., Pitt J.I.: J. Appl. Bact. 37, 959-964 (1979).
- Marvanová, L., Hanuláková, D.: Catalogue of Cultures : Fungi. CCM – Czech Collection of Microorganisms, Brno, 1995, 45 s.
- Ostrý V. : Vesmír. 79, 4, 187-189 (2000).
- Pitt J.I., Hocking A.D., Glenn, D.R.: J. Appl. Bacteriol. 54, 109-114 (1983).
- Samson R.A., Hocking A.D., Pitt J.I., King A.D.: Modern Methods in Food Mycology. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, 1992, 388 s.
- Samson R.A.: Taxonomy – Current Concepts of *Aspergillus* Systematics. In: *Aspergillus* (ed. Smith J. E.). Plenum press, New York, 1994, 1-22.
- Samson, R. A., Pitt, J.I.: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000, 510 s.
- Thom, Ch., Raper, K.B.: A Manual of the Aspergilli. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA, 1945, 373 s.
- Tuijtelars, A. C. J., Samson, R.A., Rombouts, F.M., Notermans, S.: Food Microbiology and Food Safety Into the Next Millennium. Foundation Food Micro '99, Ponsen and Looyen, Wageningen, The Netherlands, 1999, 942 s.

Příloha

Výskyt aflatoxinogenních kmenů *Aspergillus* sekce *Flavi* v potravinách v ČR

Vzhledem k tomu, že v ČR nebyla k dispozici aktuální data o míře kvalitativní a kvantitativní kontaminace potravin vláknitými mikromycety a ucelená spolehlivá data o výskytu toxinogenních mikromycetů – producentů aflatoxinů a ochratoxinu A v potravinách, byla připravena a v letech 1999 – 2001 realizována studie MYKOMON v rámci projektu Monitoringu zdravotního stavu obyvatelstva ČR ve vztahu k životnímu prostředí. Další ročník studie MYKOMON probíhá i v roce 2002.

Cílem studie je získat informace o míře aktuální kontaminace potravin uvedenými toxinogenními mikromycety v ČR. Ke specializovanému mykologickému vyšetření jsou použity vzorky potravin zakoupené v tržní síti v rámci projektu monitoringu dietární expozice chemickým látkám. Výběr vyšetřovaných komodit je proveden s využitím dat spotřebního koše potravin a je zaměřen na ty významné skupiny potravin, které byly v minulosti u nás a ve světě kontaminovány sledovanými toxinogenními mikromycety. Vzorky zakoupené náhodně v tržní síti ČR simulují reálnou situaci při nákupu potravin spotřebitelem. Získané výsledky mykologického vyšetření modelují aktuální situaci před konzumací potravin v domácnostech, nikoliv pouze stav u výrobce, či v obchodní síti. Zohledňují i „nákup, transport potravin spotřebitelem a uchování potravin v domácnostech“. Tím se zaměření studie liší od kontroly potravin prováděné dozorovými orgány MZe ČR.

Získaná data studie MYKOMON a vyhodnocení trendů výskytu toxinogenních mikromycetů v potravinách jsou prvním předpokladem pro realizaci hodnocení dietární expozice a zdravotního rizika toxinogenních mikromycetů v potravinách v ČR.

Výskyt toxinogenních mikromycetů byl pro potřebu hodnocení kontaminace potravin charakterizován stanovením jejich celkového počtu (KTJ/g) a indexem kontaminace (I_k), tzn. poměrem počtu potenciálně toxinogenních mikromycetů (KTJ/g) k celkovému počtu mikromycetů (KTJ/g). Jedná se o původní pomocný ukazatel, který byl zaveden pro potřeby studie. Index I_k nabývá hodnot 0 - 1. Čím více se index blíží číslu 1, tím je kontaminace potravin toxinogenními mikromycety závažnější. Při indexu $I_k = 1$ se toxinogenní mikromycety vyskytují v potravinách v monokultuře. V odborné literatuře se uvádí, že v monokultuře bývá mnohem vyšší produkce mykotoxinů (např. aflatoxinů) než ve směsné kultuře, kde se mohou uplatnit kompetitivní (ochranné) vztahy mezi mikromycety.

Výsledky laboratorní analýzy studie MYKOMON v letech 1999 - 2001

V každém roce bylo ve čtyřech termínech odebráno 25 druhů komodit na 12 odběrových místech v ČR, což představuje 300 vzorků potravin (*tab. č. 1.*)

Tabulka č. 1 Přehled odebraných potravin

| Odběrový termín | Potravina | Počet vzorků |
|-----------------|---|--------------|
| 1. | salám Vysočina, salám Selský, salám polosuchý, salám Poličan, rozinky, těstoviny, rýže | 84 |
| 2. | sýr Eidam | 12 |
| 3. | paprika sladká, kmín, pepř černý | 36 |
| 4. | čočka, fazole, hrách, ořechy vlašské, arašídny, mouka polohrubá, mouka hladká, mouka hrubá, vločky ovesné, kroupy, krupice dětská, krupice dětská instantní, čaj ovocný a čaj černý | 168 |
| Celkem | | 300 |

V uvedených potravinách byly získány již tři sady frekvenčních dat o kvalitativním a kvantitativním výskytu toxinogenních mikromycetů. Byl stanoven celkový počet kolonie tvořících jednotek mikromycetů (KTJ/g) a mykologický profil vybraných toxinogenních mikromycetů, který byl dále charakterizován indexem kontaminace (I_k).

- **Stanovení celkového počtu vláknitých mikromycetů**

Stanovení celkového počtu vláknitých mikromycetů (KTJ/g) v potravinách v roce 2001 je uvedeno v *tab. č. 2.*

Tabulka č. 2 Stanovení celkového počtu vláknitých mikromycetů (KTJ/g) v potravinách v r. 2001

| Potravina | Počet vzorků n | Aritmetický průměr* (KTJ/g) | Medián* (KTJ/g) | Rozsah (min/max) (KTJ/g) |
|-----------------------------|---------------------------|--|----------------------------|---|
| Arašídý | 12 | 6 | 5 | <10 - 10 |
| Čaj černý | 12 | 473 | 215 | 47 - 2600 |
| Čaj ovocný | 12 | 983 | 100 | <10 - 10000 |
| Čočka | 12 | 7 | 5 | <10 - 20 |
| Fazole | 12 | 9 | 5 | <10 - 20 |
| Hrách | 12 | 67 | 8 | <10 - 640 |
| Kmín | 12 | 111 | 39 | 10 - 390 |
| Kroupy | 12 | 502 | 56 | <10 - 5000 |
| Krupice dětská | 12 | 94 | 104 | <10 - 200 |
| Krupice dětská inst. | 12 | 44 | 24 | <10 - 220 |
| Mouka hladká | 12 | 578 | 255 | 150 - 4000 |
| Mouka hrubá | 12 | 143 | 73 | <10 - 830 |
| Mouka polohrubá | 12 | 487 | 160 | 25 - 4200 |
| Ořechy vlašské | 12 | 14963 | 2800 | 320 - 100000 |
| Paprika sladká | 12 | 196 | 56 | <10 - 820 |
| Pepř černý | 12 | 4532 | 185 | <10 - 38000 |
| Rozinky | 12 | 51303 | 9000 | 100 - 240000 |
| Rýže | 12 | 365 | 190 | <10 - 2000 |
| Salám Poličan | 12 | 2520 | 8 | <10 - 1900 |
| Salám polosuchý | 12 | 17 | 5 | <10 - 100 |
| Salám Selský | 12 | 36 | 5 | <10 - 200 |
| Salám Vysočina | 12 | 91 | 5 | <10 - 760 |
| Sýr Eidam | 12 | 52 | 23 | <10 - 220 |
| Těstoviny | 12 | 10 | 5 | <10 - 57 |
| Vločky ovesné | 12 | 59 | 13 | <10 - 190 |

* U celkového počtu mikromycetů < 10 KTJ/g byla pro výpočet aritmetického průměru a mediánu použita hodnota 1/2 limitu stanovitelnosti = 5 KTJ/g

Medián celkového počtu vláknitých mikromycetů (KTJ/g) v potravinách v letech 1999 - 2001 je uveden v **tab. č. 3**.

Tabulka č.3 Medián celkového počtu vláknitých mikromycetů (KTJ/g) v potravinách v letech 1999-2001

| Potravina | Medián * | | |
|-----------------------------|----------|------|------|
| | (KTJ/g) | | |
| | 1999 | 2000 | 2001 |
| Arašídy | 5 | 5 | 5 |
| Čaj černý | 310 | 570 | 215 |
| Čaj ovocný | 415 | 265 | 100 |
| Čočka | 8 | 5 | 5 |
| Fazole | 47 | 17 | 5 |
| Hrách | 29 | 5 | 8 |
| Kmín | 675 | 540 | 39 |
| Kroupy | 26 | 80 | 56 |
| Krupice dětská | 27 | 27 | 104 |
| Krupice dětská inst. | 5 | 10 | 24 |
| Mouka hladká | 555 | 1130 | 255 |
| Mouka hrubá | 61 | 245 | 73 |
| Mouka polohrubá | 190 | 225 | 160 |
| Ořechy vlašské | 800 | 3400 | 2800 |
| Paprika sladká | 580 | 700 | 56 |
| Pepř | 1500 | 25 | 185 |
| Rozinky | 1525 | 255 | 9000 |
| Rýže | 35 | 35 | 190 |
| Salám Poličan | 5 | 5 | 8 |
| Salám polosuchý | 10 | 5 | 5 |
| Salám Selský | 5 | 5 | 5 |
| Salám Vysočina | 5 | 5 | 5 |
| Sýr Eidam | 5 | 5 | 23 |
| Těstoviny | 5 | 5 | 5 |
| Vločky ovesné | 25 | 23 | 13 |

- U celkového počtu mikromycetů < 10 KTJ/g byla pro výpočet mediánu použita hodnota 1/2 limitu stanovitelnosti = 5 KTJ/g

- **Průkaz *Aspergillus flavus***

V roce 2001 byla prokázána přítomnost potenciálně toxinogenních mikromycetů *Aspergillus flavus*, producentů aflatoxinů celkem v 13 vzorcích (18 %) uvedených typů potravin: v pepři černém, kmínu, čaji černém, čaji ovocném, vločkách ovesných a mouce hladké (**tab. č. 4 a 5**).

Index kontaminace (I_k) *Aspergillus flavus* a stanovení toxinogenity izolovaných kmenů *Aspergillus flavus* jsou uvedeny v **tab. č. 6**.

10 izolovaných kmenů *Aspergillus flavus* (77 %) bylo posouzeno jako toxinogenní. Jejich toxinogenita byla ověřena stanovením produkce aflatoxinů na testovací živné půdě (YES médiu) metodou HPTLC.

Tabulka č. 4 Frekvence výskytu potenciálně toxinogenních kmenů *Aspergillus flavus* v potravinách v roce 2001

| Potravina | Počet vzorků (vz. pozitivní / vz. celkem) | % |
|---------------|--|----|
| Čaj černý | 4 / 12 | 33 |
| Čaj ovocný | 1 / 12 | 8 |
| Kmín | 1 / 12 | 8 |
| Mouka hladká | 1 / 12 | 8 |
| Pepř černý | 5 / 12 | 42 |
| Vločky ovesné | 1 / 12 | 8 |
| Celkem | 13 / 72 | 18 |

Tabulka č. 5 Frekvence výskytu toxinogenních kmenů u izolovaných kmenů *Aspergillus flavus* z potravin, na základě výsledků stanovení jejich toxinogenity v roce 2001

| Potravina | Počet kmenů <i>Aspergillus flavus</i> (toxinogenní kmeny / kmeny celkem) | Toxinogenní kmeny (%) |
|---------------|---|-----------------------------|
| Čaj černý | 3 / 4 | 75 |
| Čaj ovocný | 1 / 1 | 100 |
| Kmín | 1 / 1 | 100 |
| Mouka hladká | 0 / 1 | 0 |
| Pepř černý | 5 / 5 | 100 |
| Vločky ovesné | 0 / 1 | 0 |
| Celkem | 10 / 13 | 77 |

Tabulka č. 6 Index kontaminace (I_k) a hodnocení toxinogenity izolovaných kmenů *Aspergillus flavus* v roce 2001

| Počet izolátů | Označení izolátu | Izolován ze vzorku | Počet <i>A. flavus</i> (KTJ/g) | I_k | Toxinogenita |
|---------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|-------|--------------|
| 1 | <i>Aspergillus flavus</i> 102B | pepř černý | 2400 | 0,50 | + |
| 2 | <i>Aspergillus flavus</i> 111B | pepř černý | 22800 | 0,60 | + |
| 3 | <i>Aspergillus flavus</i> 119 | kmín drcený | 39 | 0,10 | + |
| 4 | <i>Aspergillus flavus</i> 120 | pepř černý | 306 | 0,07 | + |
| 5 | <i>Aspergillus flavus</i> 123B | pepř černý | 1700 | 0,27 | + |
| 6 | <i>Aspergillus flavus</i> 126 | pepř černý | 300 | 1,00 | + |
| 7 | <i>Aspergillus flavus</i> 192A | mouka hladká | 10 | 0,04 | - |
| 8 | <i>Aspergillus flavus</i> 213 | čaj černý | 84 | 0,03 | - |
| 9 | <i>Aspergillus flavus</i> 241A | čaj černý | 10 | 0,02 | + |
| 10 | <i>Aspergillus flavus</i> 250A | vločky ovesné | 10 | 0,08 | - |
| 11 | <i>Aspergillus flavus</i> 254 | čaj ovocný | 20 | 0,20 | + |
| 12 | <i>Aspergillus flavus</i> 269 | čaj černý | 10 | 0,04 | + |
| 13 | <i>Aspergillus flavus</i> 297A | čaj černý | 18 | 0,27 | + |

Srovnání frekvence výskytu toxinogenních kmenů *Aspergillus flavus* v potravinách v letech 1999-2001 je uvedeno v **tab. č. 7**.

Tabulka č. 7 Srovnání frekvence výskytu toxinogenních kmenů *Aspergillus flavus* v potravinách v letech 1999-2001

| Potravina | Počet vyšetřených vzorků za rok | Frekvence (%) | | | Toxinogenita (%) | | |
|---------------|---------------------------------|---------------|------|------|------------------|------|------|
| | | 1999 | 2000 | 2001 | 1999 | 2000 | 2001 |
| Čaj černý | 12 | 17 | 25 | 33 | 100 | 33 | 75 |
| Čaj ovocný | 12 | 25 | 0 | 8 | 100 | - | 100 |
| Kmín | 12 | 17 | 8 | 8 | 50 | 0 | 100 |
| Krupice | 12 | 8 | 0 | 0 | 100 | - | - |
| Mouka hladká | 12 | 8 | 8 | 8 | 100 | 100 | 0 |
| Pepř černý | 12 | 83 | 25 | 42 | 60 | 100 | 100 |
| Vločky ovesné | 12 | 8 | 0 | 8 | 100 | - | 0 |

- **Průkaz *Aspergillus tamarii***

Přítomnost toxinogenních mikromycetů *Aspergillus tamarii*², producentů aflatoxinů byla v roce 2001 prokázána celkem ve 3 vzorcích pepře černého (25 %) a ve 2 vzorcích čaje černého (17 %). 4 izolované kmeny *Aspergillus tamarii* (80 %) byly posouzeny jako toxinogenní. Jejich toxinogenita byla ověřena stanovením produkce aflatoxinů na testovací živné půdě (YES médiu) metodou HPTLC.

Index kontaminace (I_k) *Aspergillus tamarii* a stanovení toxinogenity izolovaných kmenů *Aspergillus tamarii* jsou uvedeny v **tab. č. 8**

Tabulka č. 8 Index kontaminace (I_k) a hodnocení toxinogenity izolovaných kmenů *Aspergillus tamarii* v roce 2001

| Počet izolátů | Označení izolátu | Izolován ze vzorku | Počet <i>A. tamarii</i> (KTJ/g) | I_k | Toxino-genita |
|---------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------|---------------|
| 1 | <i>Aspergillus tamarii</i> 102A | pepř černý | 800 | 0,17 | + |
| 2 | <i>Aspergillus tamarii</i> 111A | pepř černý | 15200 | 0,40 | + |
| 3 | <i>Aspergillus tamarii</i> 123C | pepř černý | 200 | 0,03 | + |
| 4 | <i>Aspergillus tamarii</i> 227 | čaj černý | 10 | 0,01 | - |
| 5 | <i>Aspergillus tamarii</i> 241B | čaj černý | 570 | 0,98 | + |

Srovnání frekvence výskytu toxinogenních kmenů *Aspergillus tamarii* v potravinách v letech 1999-2001 je uvedeno v **tab. č. 9**.

² Izolované kmeny byly identifikovány s využitím klasických mykologických metod (podle makrohabitu a mikrohabitu) jako *Aspergillus tamarii*. Zda se skutečně jedná o *Aspergillus tamarii* nebo o nově popsany druh *Aspergillus pseudotamarii* nám odpoví pouze DNA analýza s využitím molekulárně biologických metod (např. PCR) v blízké budoucnosti. Izoláty kmenů mikromycetů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus tamarii* jsou deponovány ve Sbírcce kultur hub (CCF) katedry botaniky přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a souběžně v hlubokomrazicím boxu při -71°C na SZÚ-CHPŘ v Brně.

Tabulka č. 9 Srovnání frekvence výskytu toxinogenních kmenů *Aspergillus tamarii* v potravinách v letech 1999-2001

| Potravina | Počet vyšetřených vzorků za rok | Frekvence (%) | | | Toxinogenita (%) | | |
|------------|--|---------------|------|------|------------------|------|------|
| | | 1999 | 2000 | 2001 | 1999 | 2000 | 2001 |
| Čaj černý | 12 | 0 | 25 | 17 | - | 33 | 50 |
| Pepř černý | 12 | 25 | 25 | 25 | 100 | 100 | 100 |

Závěr

V rámci studie MYKOMON byly v letech 1999-2001 z aflatoxinogenních kmenů *Aspergillus* sekce *Flavi* izolovány kmeny *Aspergillus flavus* a *Aspergillus tamarii*. Kmeny *Aspergillus parasiticus* a *Aspergillus nomius* nebyly izolovány.

Použitá literatura

Ostry, V., Skarkova, J., and Ruprich, J.: The Mycotoxin Research in Foodstuffs in the Czech Republic in the 90th Years. *Mycotoxin Research*, 17A, 2, 2001, s. 183 - 186.

Ostry, V., Ruprich, J., Prochazkova, I., Skarkova, J., Kubatova, A.: MYKOMON, Project for the Determination and the Identification of Toxigenic Fungi in Food in the Czech Republic. In: 5th International Conference Mycotoxins and Dioxins and the Environment, Bydgoszcz, Bydgoszcz University of Kazimierz Wielki, 2000, s. 191-196.

Ostry, V., Ruprich, J., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A.: Occurrence of the Toxigenic Fungi (Producers of Aflatoxins and Ochratoxin A) in Foodstuffs in the Czech Republic in Years 1999-2000. In: 23th Mycotoxin Workshop, Vienna, Veterinary University of Vienna, 2001, s. 35.

Ostry, V., Ruprich, J., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A.: The System Approach to the Identification of Aflatoxigenic Fungi in Foodstuffs and Feedstuffs. In: 23th Mycotoxin Workshop, Vienna, Veterinary University of Vienna, 2001, s. 1.

Ostry, V., Ruprich, J., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A.: The System Approach to the Identification of Aflatoxigenic Fungi in Foodstuffs and Feedstuffs. *Mycotoxin Research*, 17A, 2, 2001, s. 178 - 182.

Ostry, V., Ruprich, J., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A.: Occurrence of the Toxigenic Fungi (Producers of Aflatoxins and Ochratoxin A) in Foodstuffs in the Czech Republic 1999 - 2000. *Mycotoxin Research*, 17A, 2, 2001, s. 188 - 192.

Ostry, V., Ruprich, J., Skarkova, J., Prochazkova, I., Kubatova, A.: MYKOMON - Monitoring Project of Toxigenic Fungi in Food in Years 1999-2000. In: 24th Mycotoxin Workshop, Berlin, Part: Monitoring and Quality Assessment, The German Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, 2002, s. 3.

Ostry, V.: Mycological Analysis of Foodstuffs. In: System of monitoring the environmental impact on population health of the Czech Republic. Summary report-1999. Kliment, V., (ed.), National Institute of Public Health, EnviTypo, Prague, August 2000, ISBN 80-7071-144-2, s. 106.

Ruprich, J., Řehůrková, I., Karpíšková, R., Ostrý, V. a kol.: Zdravotní důsledky zátěže lidského organismu cizorodými látkami z potravinových řetězců v roce 1999: alimentární onemocnění, bakteriologická a mykologická analýza potravin a dietární expozice člověka. Státní zdravotní ústav v Praze, Praha 2000, ISBN 80-7071-153-1, s.181.

Skarkova, J., Ostry, V., and Ruprich, J.: Application of Planar Chromatography to the Chemical Standardization of Aflatoxigenic Micromycetes. In: Nyireddy S (Ed.) *Planar Chromatography 2002*, International Society for Planar Chromatography, Hévíz, 2002, s. 441 - 446.

Autoři metodického doporučení SZÚ/CHPŘ:

MVDr. Vladimír Ostrý, CSc.

Mgr. Jarmila Škarková

Národní referenční centrum pro mikroskopické houby a jejich toxiny v potravinových řetězcích,
Státní zdravotní ústav, Centrum hygieny potravinových řetězců v Brně
Palackého 3a, 612 42 Brno

Konzultant :

RNDr. Alena Kubátová, CSc.

CCF – Sběrka kultur hub, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze ,Benátská 2, 128 01 Praha 2