REVIEW

METODY DETEKCE A IDENTIFIKACE PLÍSNÍ

Methods of detection and identification of moulds

Vlastimil Dohnal¹, Daniel Jun²

¹Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, katedra chemie, Hradec Králové

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie, Hradec Králové

Summary

Fibrous micromycetes (moulds) can negatively affect the human or animal health, either as parasites or organisms producing toxic secondary metabolites or due to reducing the nutritional quality of the food contaminated. These facts call for necessary development of new rapid detection techniques, which will be able to reveal the presence of moulds at just the right time.

For the identification, a standard cultivation method can be employed, where particular morphological characters are compared with figures in atlas. This procedure is very time consuming and thus, new molecular-biological, chemical or physical methods are stepwise being investigated and used for this purpose. The polymerase chain reaction and sequencing for the detection of specific genes is thus used. The genetic information also characterizes the metabolism of fibrous micromycetes. It includes a wide spectrum of chemical substances, as e.g. terpenes, polyketides, non-ribosomal peptides, fatty acids, etc. For the general detection, typical products can be used, as e.g. ergosterol or chitin. For more selective identification, it is possible to use volatile organic substances detected by artificial olfactory detectors or chromatographic methods, or specific fatty acids. In terms of physical methods, there is an increased interest in methods of the analysis of graphs obtained for different spectral regions, from the ultraviolet region to the infrared one.

The work offers an outline of these methods and discussion of benefits and drawbacks limiting their use in practice.

Key words: detection of moulds – mycotoxins – biomarkers – volatile organic substances

Souhrn

Vláknité mikromycety (plísňe) mohou negativně působit na člověka či zvířata jako parazité nebo produkci toxických sekundárních metabolitů či snížením výživové hodnoty kontaminovaných potravin. Tyto důvody vedou k nutnosti vývoje nových rychlých detekčních metod, které by byly schopny včas odhalit přítomnost plísní.

K identifikaci lze využít standardní kultivační metodu, kdy jsou jednotlivé morfologické znaky porovnávány s atlasy. Tento postup je časově velmi náročný, proto jsou postupně zkoumány a využívány molekulárně biologické, chemické či fyzikální metody. K identifikaci je tak využívána polymerázová řetězová reakce a sekvenování pro detekci specifických genů. Genetická informace rovněž udává metabolismus vláknitých mikromycet. Ten zahrnuje široké spektrum chemických látek, jako jsou například terpeny, polyketidy, neribosomální peptidy,

Submitted: 2012-03-01 • Accepted: 2012-08-27 • Published online: 2012-12-21

KONTAKT: 14/4: 497–504 • ISSN 1212-4117 (Print) • ISSN 1804-7122 (Online)

masné kyseliny aj. K obecné detekci mohou sloužit typické produkty, jako jsou ergosterol či chitin. Pro selektivnější určení lze využít těkavé organické látky stanovené umělými nosy či chromatografickými metodami nebo specifické masné kyseliny. Z fyzikálních metod se zvyšuje zájem o metody analýzy obrazu pořízeného v různých oblastech spektra od ultrafialové až po infračervenou oblast.

Práce je souhrnem těchto metod a diskutuje výhody a nevýhody, které limitují jejich využití v praxi.

Klíčová slova: detekce plísní – mykotoxiny – biomarkery – těkavé organické látky

ÚVOD

Plísně, přesněji vláknité mikromycety, patří k nejstarším živým organismům na Zemi. V současné době je známo více než 100 000 kmenů plísní, z nichž nejčastěji se vyskytující patří do rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Plísně mají extracelulární trávení, do substrátu vylučují trávicí enzymy, které degradují organickou hmotu a zpětně pak resorbují tráveninu. Jejich metabolismus zahrnuje produkci více než 200 000 sekundárních metabolitů.

Mnoho vyšších hub a plísní je člověkem od pradávna využíváno. Jedlé vyšší houby slouží často jako potrava či koření, z jedovatých druhů jsou pak ty psychoaktivní konzumovány pro navození halucinací u toxikomanů či při magických rituálech primitivních kmenů. V případě plísní jsou vybrané netoxogenní kmeny využívány při fermentaci asijských potravin, při výrobě sýrů či některých jiných fermentovaných potravin. Při výrobě sýrů nacházejí své uplatnění plísně rodu *Penicillium* (například *P. roqueforti* či *P. camemberti*), tempeh vzniká fermentací sójových bobů pomocí *Rhizopus oligosporus*, oncom *Neurospora sitophila*. Své uplatnění ve výživě nachází i tzv. quorn, což je mykoprotein, bílkovina produkovaná *Fusarium venenatum*. Quorn může u vegetariánů sloužit také jako alternativa k masu či jiné živočišné bílkovině.

V průmyslové výrobě slouží plísně k produkci metabolitů, mezi které patří například různé enzymy, nízkomolekulární organické kyseliny, antibiotika, steroidní látky, bílkoviny apod. Například námel (*Claviceps purpurea*) slouží k produkci námelových alkaloidů používaných pro výrobu léčiv, *Aspergillus niger* k výrobě více než 99 % celosvětové produkce kyseliny citronové, *Ashbya gossypii* pro výrobu riboflavinu.

Přítomnost plísní může mít také nežádoucí důsledky pro člověka. Plísně mohou parazito-

vat i na savcích a způsobovat tak mykózy. Jejich působením na substrát dochází také ke změně jeho organoleptických vlastností, jako jsou vůně, morfologie, barva, chuť apod. Kromě toho snižují nutriční hodnotu substrátu, především aminokyselin, sacharidů a tuků. Ještě závažnější je však produkce toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů. Některé mykotoxiny mohou být dokonce zneužity jako bojové chemické látky (Štětina, 2004, s. 128).

Výše uvedené důvody ukazují nutnost detekce a kontroly přítomnosti plísní nejen v environmentálním prostředí, ale též v celém produkčním řetězci potravin, a to od polního přes sklizňový a posklizňový management. Nelze opomenout i často přehlížené nevhodné skladovací podmínky v jednotlivých domácnostech.

Detekce plísní

Plísně stejně jako jiné organismy během své existence produkují velké množství metabolitů. Ovlivňují též prostředí, ve kterém žijí a ze kterého čerpají živiny. K detekci plísní lze tak využít metody chemické, kdy jsou sledovány jednotlivé metabolity, respektive skupiny metabolitů, metody fyzikální, kdy jsou detekovány změny v absorpci elektromagnetického záření různých vlnových délek od ultrafialového (UV) až po infračervené (IČ). Vzhledem k tomu, že tvorba metabolitů a způsob působení na okolní prostředí jsou kódovány v DNA, nacházejí zde uplatnění také metody genetické, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR).

Mikrobiologická detekce (kultivace)

Metoda kultivace patří mezi standardní metody identifikace plísní. Plísně jsou kultivovány na různých substrátech a následně identifikovány podle morfologických vlastností. Zde se sledují charakteristické makroskopické a mikroskopické

ké znaky. Sledovanými makroskopickými znaky jsou například velikost kolonií, rychlost růstu, povrch kolonií, barva mycelia, a to i z reverzní strany, barva difundující do okolní půdy, přítomnost a barva kapek transpirované tekutiny na vzdušném myceliu a přítomnost zvláštních útvarů viditelných pouhým okem. Mikroskopicky se pak sleduje zejména charakter mycelia po stránce tloušťky vláken, přítomnosti sept, způsobu větvení, barvy a struktury, dále charakter konidioforu, jeho délka, tloušťka obalů, počet, tvar a povrch askospor, případně charakter dalších orgánů. Poté se na základě atlasů a klíčů určují jednotlivé rody (Gottvaldová, 2008, s. 1).

Z časového hlediska patří mezi méně výhodné metody, zvláště pokud je nutné znát výsledek ve velmi krátké době. V současné době se v laboratořích uplatňují spíše molekulárně biologické postupy na základě analýzy sekvencí DNA.

Chemické metody – biomarkery

Jak již bylo zmíněno v úvodu, metabolismus plísni zahrnuje přibližně 200 000 různých chemických látek. Z toho jen velmi malá část je toxická. V současné době je známo asi 450 mykotoxinů. Výskyt některého jednotlivého metabolitu či skupiny metabolitů může být za specifických podmínek důkazem přítomnosti plísni ve zkoumaném vzorku. Nejvýznamnějšími biomarkery užívanými pro detekci plísni jsou těkavé organické látky (Volatile Organic Compounds, VOC), dále steroid buněčné stěny ergosterol, stavební polysacharid chitin a mastné kyseliny.

Identifikace jednotlivých druhů a kmenů plísni na základě stanovení jediného metabolitu je nemožná, neboť produkce daných metabolitů není vázána pouze na jeden kmen či druh. Kompetitivní plísň produkují obecně širší spektrum sekundárních metabolitů v porovnání s ruděrálními. Pro účely identifikace je nutné stanovit více metabolitů různých chemických skupin (terpeny, polyketidy, neribosomální peptidy aj.), které byly kultivovány za přesně definovaných podmínek (živné medium atd.). Takto získané metabolické profily, tzv. „otisky prstů“, lze s výhodou využít k účelům chemotaxonomie (Frisvad et al., 2008, p. 231). K dosažení tohoto cíle není možné pracovat s metabolity, které jsou přítomné ve všech druzích plísni, mezi něž patří například pyruvát, acetylkoenzym A, ergosterol či linoleová kyselina. Pro zpřesnění identifi-

ce a omezení spektra možných kmenů plísni je možné použít pouze metabolity, které vznikají specificky v reakci na konkrétní abiotické podmínky.

K metabolickému profilování mohou sloužit standardizované analytické metody, jako jsou například tenkovrstvá chromatografie, plynová a kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza. Detekce bývá často zajištěna hmotnostním detektorem.

Těkavé organické látky

Produkce těkavých látek plísněmi může být spojena s vylučováním inhibičních meziproduktů metabolismu, které vznikají v nepříznivém prostředí. Mohou mít též inhibiční efekt na jiné plísň a regulovat vlastní růst a vývoj (Linton, Wright, 1993, p. 1). Mezi těkavé látky patří například degradační produkty mastných kyselin. V případě kontaminace cereálií mohou obsahovat například alkoholy, karbonylové sloučeniny, alifatické i aromatické uhlovodíky apod. Ethanol je produkován za anaerobních podmínek. Alkoholy vznikají z aminokyselin Ehrlichovou syntézou. 1-okten-3-ol a další osmi- a desetiuhlíkaté sloučeniny vznikají oxidací kyseliny linoleové. Odbourávání lipidů lipázami jde přes volné mastné kyseliny, ty se oxidují na β -ketokyseliny a následnou dekarboxylací vznikají methylketony. Z laktonů vznikají γ -ketokyseliny. Z alkoholů vznikají reakcí s acetylkoenzymem A estery. Pyraziny vznikají kondenzací acetoinu a amoniaku, dimethylsulfid z methinoninu (Magan, Evans, 2000, p. 319). Složení směsi těkavých látek závisí na biotických a abiotických podmínkách růstu plísni (Larsen, Frisvad, 1995, p. 135), fázi vývoje plísně a také na médiu. Z tohoto důvodu je možné využít stanovení VOC za přesně definovaných podmínek kultivace k identifikaci druhu, respektive kmene plísně (Zhang, Li, 2010, p. 127).

Těkavé organické látky je možné využít také k detekci plísňových onemocnění lidí. Například pro detekci patogenních vláknitých hub je typická a téměř specifická produkce 2-pentylfuranu. Významné množství tohoto metabolitu je produkováno plísněmi *A. fumigatus* a *Fusarium* ssp., menší množství pak *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* a *Scedosporium* ssp. Úspěšnost zachytu pacientů s plísňovým napadením detekcí 2-pentylfuranu v dechu činí přibližně 77–78 %, proto

bylo navrženo použití této látky k monitorování průběhu léčby pacientů při invazi *Aspergillus fumigatus* (Chambers et al., 2011, p. 54–61).

Ergosterol

Ergosterol je látka steroidní struktury produkována omezeným počtem organismů. V jejich buňkách slouží zejména k zajištění správné funkce buněčných membrán. Tvorba komplexů s ergosterolem či inhibice jeho biosyntézy je postatou funkce většiny antimykotik a fungicidních látek. Je také provitaminem D2, který je důležitý pro správný metabolismus minerálních látek a tvorbu kostí u savců a ptáků. Ve své nativní podobě je neaktivní. Aktivizuje se nejprve ozářením UV záření a následnou metabolizací v játrech a poté v ledvinách na vitamin D. Přehledový článek o ergosterolu a jeho významu v různých oblastech vědy byl otištěn v časopise Kontakt (Dohnal et al., 2008a, s. 449).

Omezený výskytu ergosterolu je možné využít pro detekci a eventuálně i kvantifikaci organismů, které jej syntetizují. Mezi producenty ergosterolu se řadí zejména kvasinky a plísně. Proto v prostředích, kde je přítomnost kvasinek minimální, je možné ergosterol použít jako marker přítomnosti plísní. Od roku 1977, kdy tým kolem Seitze navrhnul využití ergosterolu jako indikátoru plísňové kontaminace obilovin (Seitz et al., 1977, p. 1207), stále roste počet publikací zabývajících se touto problematikou. V roce 2004 byl ergosterol dokonce navrhnut jako nový parametr kvality rajčat a produktů z nich vyrobených (Kadalkal, Artik, 2004, p. 349).

Stanovení obsahu ergosterolu bylo z výše uvedených důvodů zvoleno v České republice jako metoda vhodná pro monitorování stavu vybraných druhů trav na konci vegetačního období. Právě na podzim dochází k masivnímu rozvoji hub v porostech píce. Cílem prací autorů (Dohnal et al., 2007, s. 9; Skládanka et al., 2008, p. 320) bylo ověřit tuto myšlenku sledováním ozimých (srha laločnatá, *Dactylis glomerata* a *Festulolium*, kříženec *Festuca arundinacea* a *Lolium multiflorum*) a jarního druhu trav (ovsík vyvýšený, *Arrhenatherum elatius*). Ozimé druhy trav jsou schopny růst i při nízkých teplotách.

Z měření vyplynulo, že obsah ergosterolu je nejvyšší ve vzorcích sklizených v prosinci a byl registrován různý obsah pro různé píce, tedy různá odolnost jednotlivých píce vůči napá-

dení plísněmi. Získaná data dále prokázala, že metoda stanovení obsahu ergosterolu je vhodná jako marker stupně kontaminace materiálu plísněmi. Nelze jej však použít k odhadu množství mykotoxinů, jejichž produkce je vázána především na příznivější biotické a abiotické podmínky v období letním, kdy je zejména teplota vyšší a vhodná pro produkci toxických sekundárních metabolitů (Skládanka et al., 2011, p. 37).

Polysacharidy – chitin, mannany, β -glukany

Jsou hlavními strukturními složkami buněčné stěny plísní, kde chitin je umístěn převážně na vnitřní straně stěny, zatímco mannany na vnější straně. Chitin je z chemického hlediska poly-N-acetyl-D-glukosamin. Po celulóze je druhým nejrozšířenějším polymerem na světě. V přírodě se nevyskytuje pouze v plísních, lze jej nalézt například v krunýřích korýšů či vajíčkách hádátek. Stanovení obsahu těchto polysacharidů bylo použito pro sledování růstu plísní (Whipps et al., 1982, p. 385).

Mastné kyseliny

Mastné kyseliny patří mezi základní složky buněčných membrán. Vyskytují se zejména ve formě esterů jako fosfolipidy, acylglyceroly, sfingolipidy aj. nebo ve výjimečných případech i jako ethery. Celkové množství volných a esterifikovaných fosfolipidů může být využito pro detekci mikrobiální a fungální biomasy v půdě (Froste-gård, Bååth, 1996a, p. 59; Sakamoto et al., 2004, p. 1827). U živých organismů jsou fosfolipidy lokalizovány v buněčných membránách. Po buněčné smrti dochází k lýze buněk a uvolněné enzymy způsobují hydrolýzu těchto fosfolipidů za vzniku diglyceridů. Indikátorem přítomnosti plísní mohou být například nesubstituované mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (Wells et al., 1996, p. 6223) (24:0 a 26:0) či linolová kyselina (18:2 ω 6) (Froste-gård, Bååth, 1996, p. 59), dále s ní 18:3 ω 3 a 18:3 ω 6 (Froste-gård et al., 1996, p. 55) či v případě arbuskulárních mykorrhizálních hub 16:1 ω 5 (Kelly et al., 1999, p. 1455), 18:1 ω 9, 20:1 ω 9 a 20:4, kde 20:1 ω 9 je doporučována pro kvantifikaci externích hyf (*Gigaspora rosea*) (Sakamoto et al., 2004, p. 1827). V kontrolovaném prostředí je možné použít pro identifikaci *Giga margarita* 18:1 ω 9c, 20:1 ω 9c, 20:2 ω 6c a 22:1 ω 9c (Madan et al., 2002, p. 125).

Stanovení mastných kyselin se provádí rutině zpravidla po esterifikaci metanolem (Fatty Acids Methyl Esters, FAME) metodou plynové chromatografie.

Genetická identifikace

V současné době je pro identifikaci plísni využíváno jejich genetické informace. Metody jako polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo PCR s reverzní transkripcí (RT-PCR) se stávají alternativními testy k časově náročným mikrobiologickým a chemickým metodám detekce a identifikace producentů mykotoxinů (Niessen, 2007, p. 38). Vývoj PCR metod probíhá ve vlnách, vždy jsou vyvíjeny specificky pro stanovení aktuálně sledovaných producentů mykotoxinů. První PCR metody byly vyvinuty pro detekci *A. flavus*, producenta aflatoxinů (Tang et al., 1993, p. 1313). Aflatoxin B1 je nejsilnějším známým lidským hepatokarcinogenem. Následovaly další metody

pro detekci producentů trichothecenů, fumonisinů, patulinu aj. V současné době jsou dostupné testy pro detekci všech nejvýznamnějších toxinogenních plísni. V některých případech lze identifikovat i jednotlivé kmeny (Stakheev et al., 2011, p. 462).

Proces identifikace začíná izolací DNA z biomasy s následnou kontrolou její čistoty gelovou elektroforézou. Poté je přistoupeno k výběru vhodných primerů a amplifikaci části genu, který je těmito primery vymezen. K tomuto účelu slouží právě PCR. Čistotu produktů PCR je vhodné ověřit opět pomocí gelové elektroforézy, kdy je potvrzena délka sekvence amplifikované části DNA. Pro úplné potvrzení identity je nutné provést sekvenaci produktů PCR, kdy je zjištěno pořadí nukleových bazí v sekvenci.

Výhody a nevýhody mikrobiologické a chemické detekce plísni jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1 Výhody a nevýhody mikrobiologické a chemické detekce plísni

Metoda	Popis	Výhody	Nevýhody
Kultivace plísni	Plísně jsou kultivovány na živném médiu. Kvantifikace na základě počtu kolonií.	– nízká cena	– médium, čas, teplota kultivace ovlivňuje, které druhy plísni budou kultivovány – ne všechny plísně mohou být úspěšně kultivovány (falešně negativní výsledky) – podhodnocení počtu pomalu rostoucích plísni – možné interakce mezi jednotlivými druhy – možná kompetice s bakteriemi – vliv objemu vzorku na detekční limit
Stanovení ergosterolu kapalinovou chromatografií	Poskytuje odhad celkové fúgální biomasy.	– citlivější než měření suché biomasy	– nerozlišuje mezi rody či kmeny – není přesným vyjádřením hmoty biomasy
Kvantitativní PCR	Ze vzorku je extrahována DNA, jsou použity vhodné primery a provedena kvantifikace pomocí PCR analýzy.	– citlivá a specifická metoda – rychlost, možnost analýzy v reálném čase	– nutnost předchozí identifikace kmenů či rodů – možnost falešných pozitivních výsledků u mrtvých buněk
Detekce genů či proteinů	Detekce genů metabolických drah mykotoxinů. Detekce specifických proteinů pomocí Western Blot techniky.	– užitečná pomůcka k morfologické identifikaci	

Metoda	Popis	Výhody	Nevýhody
Přímé pozorování	Optickým či elektronovým mikroskopem, taxonomická identifikace pomocí morfologie.	– nízká cena	– subjektivní identifikace; nemožné pro nesporulující druhy či druhy nesporulující v době odběru vzorku – často pouze identifikace rodu
Hmotnostní spektrometrie (identifikace)	Vzorky jsou smíchány s matricí a laserovým pulzem ionizovány (MALDI). Zaznamenávána jsou hmotnostní spektra.	– vysoká přesnost, citlivost a rychlost	– vyžaduje kompletní databáze

Převzato, upraveno a doplněno (Sonigo et al., 2011, p. 19)

Elektronické (umělé) nosy

Elektronické nosy (artificial noses) sestávají ze dvou základních částí – a to z několika jednotek až desítek senzorů, které jsou schopny detekovat množství těkavých organických látek v plynném skupenství, a z části, která je schopna naměřený signál vyhodnotit. Každý jednotlivý senzor má různou citlivost a odezvu vůči jednotlivým těkavým organickým látkám. Vzhledem k tomu, že specifita takového jednoho senzoru je velmi nízká, jsou volena řešení, která obsahují více různých nespecifických senzorů. Odezvy takového „pole“ senzorů tvoří vektor složený z hodnot získaných z jednotlivých senzorů. Takové vektory jsou mnohem více specifické pro konkrétní analyty a po statistickém zpracování i pro identifikaci jednotlivých těkavých látek, respektive jejich skupin. V případě, že je po kalibraci senzorů nalezen vektor (tedy kombinace signálů) charakteristický pro vzorek kontaminovaný plísněmi, je tento vzorek vyhodnocen jako pozitivní na kontaminaci plísněmi. K vyhodnocení měřených signálů a jejich klasifikaci se používají různé statistické metody, jako jsou metoda parciálních nejmenších čtverců, lineární diskriminantní analýza či umělé neuronové sítě (Dohnal et al., 2008b, s. 66).

Elektronické nosy jsou používány v celé řadě odvětví, například k identifikaci bakteriální kontaminace potravin, detekci onemocnění lidí či v posledních letech k detekci onemocnění rostlin (Zhang, Li, 2010, p. 127).

Spektrální metody – fluorescence, hyperspektrální metody, UV-IR

Další z metod detekce napadení vzorku plísněmi je využití záznamu absorpčního spektra porízeného v oblasti 400 až 1 000 nm, tedy ultrafialové až infračervené. Metody analýzy obrazu nabývají v posledních letech na významu, což se odráží i na zvyšujícím se počtu odborných publikací v tomto odvětví. Po nasnímání spekter je klíčová kalibrace a vytvoření matematického modelu, kde hraje zřejmě nejvýznamnější roli výběr nejvhodnějších vlnových délek záření využitých pro tvorbu modelu.

Spektrální metody byly úspěšně využity při detekci plísní u kukuřice, kdy se napadení plísní *Aspergillus niger*, respektive *Aspergillus flavus* podařilo identifikovat již 48 hodin od inokulace (Del Fiore et al., 2010, p. 64). Také spektroskopie v blízké infračervené oblasti byla využita pro hodnocení přítomnosti klasových fuzarióz (*Fusarium head blight disease*), deoxynivalenolu a ergosterolu u jednotlivých pšeničných zrn. Na základě kalibrace naměřenými spektry bylo možné rozlišit mezi zdravými a kontaminovanými zrny (Dowell et al., 1999, p. 573). Stejná metoda byla použita Petterssonem a Åbergovou pro detekci deoxynivalenolu u pšeničných zrn infikovaných plísní *Fusarium culmorum* (Pettersson, Åberg, 2003, p. 229). K modelování bylo použito spekter v oblasti 670 až 1 100 nm jako vstupních dat. Model vytvořený pomocí metody parciálních nejmenších čtverců (Partial Least

Squares, PLS) s 11–13 PLS faktory a validačním setem čítajícím 20 vzorků. Standardní chyba modelu činila 381 µg DON/kg.

Jin et al. (2009, p. 158) úspěšně využili hyperspektrální zobrazení ke klasifikaci toxinogenních a netoxinogenních kmenů *Aspergillus flavus*. Data byla nejprve redukována a nekorelována metodou hlavních komponent (PCA) s následnou selekcí hlavních komponent pomocí genetických algoritmů a klasifikaci pomocí metody Support Vector Machine (SVM).

ZÁVĚR

Plísňe svou přítomností zásadně a často negativním způsobem ovlivňují prostředí nebo substrát, na kterém žijí. Proto je jejich detekce velmi důležitá. Článek shrnuje metody nejen

standardně používané, například kultivaci či polymerázovou řetězovou reakci, ale věnuje se i metodám využívajícím změn chemických či fyzikálních vlastností. Význam sledování chemických biomarkerů, jako jsou těkavé organické látky, ergosterol, polysacharidy či mastné kyseliny, stále roste. V současné době je nejvíce využíváno stanovení obsahu ergosterolu. V případě těkavých látek nelze opomenout využití umělých nosů, u kterých lze předpokládat větší využití například ve skladištích potravin či krmiv. V současné době je pozornost věnována i metodám nedestruktivním, založeným na analýze obrazu pořízeného v rozsahu ultrafialové až mikrovlnné části elektromagnetické části spektra. Vývoj v oblasti detekce směřuje k rutinním a rychlým metodám.

LITERATURA

1. Del Fiore A, Reverberi M, Ricelli A, Pinzari F, Serranti S, Fabbri AA, Bonifazi G, Fanelli C (2010). Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 144/1: 64–71.
2. Dohnal V, Kaderová I, Ježková A, Skládanka J (2007). Obsah ergosterolu u vybraných druhů trav na konci vegetačního období. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 4: 9–14.
3. Dohnal V, Ježková A, Skládanka J (2008a). Ergosterol: Klíčový steroid hub. *Kontakt.* 10: 449–454.
4. Dohnal V, Sládková A, Kuča K, Jun D (2008b). Umělé nosy při detekci plísni a mykotoxinů. *Voj. Zdrav. Listy.* 77: 66–70.
5. Dowell FE, Ram MS, Seitz LM (1999). Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chem.* 76/4: 573–576.
6. Frisvad JC, Andersen B, Thrane U (2008). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112/2: 231–240.
7. Frostegård A, Bååth E (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils.* 22: 59–65.
8. Frostegård A, Tunlid A, Bååth E (1996). Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biol. Biochem.* 28: 55–63.
9. Gottvaldová R (2008). Xerofilní plísňe jako původci kažení potravin s vysokým obsahem jednoduchých sacharidů a nízkou vodní aktivitou. *Bakalářská práce: LF MU, Brno, 1 s.*
10. Chambers ST, Bhandari S, Scott-Thomas A, Syhre M (2011). Novel diagnostics: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 49: S54–61.
11. Jin J, Tang L, Hruska Z, Yao H (2009). Classification of toxigenic and atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* with hyperspectral imaging. *Comp. Elec. Agric.* 69/2: 158–164.
12. Kadakal C, Artik N (2004). A new quality parameter in tomato and tomato products: ergosterol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44/5: 349–351.
13. Kelly JJ, Haggblom M, Tate III RL (1999). Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.* 31/10: 1455–1465.
14. Larsen TO, Frisvad JC (1995). Comparison of different methods for collection of volatile chemical markers from fungi. *J. Microbiol. Meth.* 24/2: 135–144.
15. Linton C, Wright S (1993). Volatile organic compounds: microbiological aspects and some technological implications. *Lett. Appl. Microbiol.* 75: 1–12.
16. Madan R, Pankhurst C, Hawke B, Smith S (2002). Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. *Soil Biol. Biochem.* 34/1: 125–128.

17. Magan N, Evans P (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stor. Prod. Res.* 36/4: 319–340.
18. Niessen L (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 119/1–2: 38–46.
19. Petterson H, Aberg L (2003). Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control.* 14: 229–232.
20. Sakamoto K, Iijima T, Higuchi R (2004). Use of specific phospholipid fatty acids for identifying and quantifying the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Soil Biol. Biochem.* 36/11: 1827–1834.
21. Seitz LM, Mohr HE, Burroughs R, Sauer DB (1977). Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.* 54/6: 1207–1217.
22. Skládanka J, Dohnal V, Ježková A (2008). Fibre and ergosterol contents in forage of *Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata* and *Festulolium* at the end of the growing season. *Czech J. Anim. Sci.* 53: 320–329.
23. Skládanka J, Nedělník J, Adam V, Doležal P, Moravcová H, Dohnal V (2011). Forage as a primary source of mycotoxins in animal diet. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8: 37–50.
24. Sonigo P, De Toni A, Reilly K (2011). A review of fungi in drinking water and the implications for human health. Final report. Defra, p. 1–107.
25. Stakheev AA, Ryazantsev DYU, Gagkaeva TYU, Zavriev SK (2011). PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. *Food Control.* 22/3–4: 462–468.
26. Štětina R (2004). Mykotoxiny. In Patočka J et al.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing, a. s., 178 s. ISBN 80-247-0608-3.
27. Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen L (1993). The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 148/5: 1313–1317.
28. Wells GB, Dickson RC, Lester LR (1996). Isolation and composition of inositolphosphorylceramide-type sphingolipids of hyphal forms of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 178/21: 6223–6226.
29. Whipps JM, Haselwandter K, McGee EEM, Lewis DH (1982). Use of biochemical markers to determine growth, development and biomass of fungi in infected tissues, with particular reference to antagonistic and mutualistic biotrophs. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79/3: 385–400.
30. Zhang Z, Li G (2010). A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.* 95/2: 127–139.

✉ **Kontakt:**

Doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D., Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové 3
E-mail: vlastimil.dohnal@gmail.com