PCR IN DETECTION OF FUNGAL CONTAMINATIONS IN POWDERED PEPPER

Trojan V., Hanáček P., Havel L.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xtrojan@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The PCR method for fungal contaminations in powdered pepper was optimized in our previous work. At present work we use this method for detection fungal contaminations in fifteen particular samples of commercially distributed red dried powdered pepper. In all samples under the investigation a fungal contamination was found but none of that belonged to toxinogenic fungi. The results corresponded with classical cultivation fungal detection.

Key words: contaminant detection in spice, pepper, PCR

Acknowledgments: This experiment was realized in cooperation with private company Trumf International s. r. o.

ÚVOD

V dnešní době, kdy se veškeré technologické procesy a nejen v oblasti potravinářství neustále zrychlují, a proto je přímo nutností, zvyšovat rychlost kontroly kvality surovin vstupujících do procesu zpracování. Obrovskou možností se v dnešní době stávají molekulárně biologické metody ve všech svých různých modifikacích. Jejich výhodou je úspora času pro provedení analýzy. Při srovnání s klasickými kultivačními metodami až několikanásobně. A proto jsme se v předcházející práci zaměřili na optimalizaci metody PCR (Polymerase Chain Reaction) při detekci houbových kontaminací v práškové paprice, která má v České republice z procenta využití různých druhů koření největší význam. Optimalizovanou metodu jsme využili pro analýzu patnácti konkrétních vzorků komerčně dodávané papriky do obchodní sítě.

MATERIÁL A METODIKA

Materiál:

Pro ověření vyvinutého postupu bylo analyzováno 15 různých vzorků sušené červené mleté papriky, které byly dodány v množstvích á 25 g (obr. 1). Jejich popis je uveden v tabulce 1. Množství pro jednotlivé pokusy odebíraná z tohoto vzorku měla jednotnou hmotnost 20 mg.

Tab.1 Specifikace vzorků papriky.

Číslo protokolu	***Název suroviny***	***Šarže***	***Expirace***
P125-127/09	Paprika sl. Speciál 120 ASTA	J01071200PM	7.7.2009
P125-127/09	Paprika pálivá Rubín 100 ASTA	J01062100PM	6.7.2009
P125-127/09	Paprika pálivá S80 ASTA	J01071000PM	7.7.2009
P290-291/09	Paprika sladká 100 ASTA	J01161200	16.7.2009
P542-546/09	Paprika sladká Rubín 100 ASTA	J01162000PM	16.7.2009
P542-546/09	Paprika sladká HAMÉ 40 ASTA	J01191300PM	19.7.2009
P542-546/09	Paprika pálivá H60 ASTA	J01201000PM	20.7.2009
P542-546/09	Paprika pálivá HAMÉ 40 ASTA	J01192000PM	19.7.2009
P542-546/09	Paprika sladká Kalocsa 140 ASTA	J01191100PM	19.7.2009
P14686-14690/08	Paprika pálivá H60 ASTA	I12081000PM	8.6.2009
P14686-14690/08	Paprika sladká Rubín 100 ASTA	I12031400PM	3.6.2009
P14686-14690/08	Paprika pálivá Hamé 40 ASTA	112021300PM	3.6.2009
P11476-11477/08	Paprika sladká Kalocsa 140 ASTA	I10101800PM	10.4.2009
P9229-9231/08	Paprika pálivá H 60 ASTA	I08131600PM	13.2.2009
P6876-6878/08	Paprika sladká Eso	106021400	2.12.2008

Obr.1 Vzorky papriky ve stavu v jakém byly dodávány k analýze.



Metodika:

1) Izolace DNA

DNA byla izolována přímo ze vzorku červené sušené mleté papriky pomocí kitu DNeasy Plant kit firmy Qiagen podle návodu přiloženém výrobcem.

2) PCR amplifikace

Na základě předchozích výsledků byly použity primery ITS1F a ITS4. Tento pár je specifický pro kteroukoli skupinu hub. Optimální teplota annealingu, při které byl PCR produkt na gelu nejostřejší byla 55 °C (Trojan et al. 2008).

3) Sekvenování

Získané produkty PCR byly purifikovány pomocí Qiagen purifikačního kitu podle návodu dodaného výrobcem. Celková hmotnost amplifikované DNA byla semikvantitativně určena, dle intenzity zobrazeného proužku na gelu srovnáním se standardem, 30ng a sekvence vzorků byla zjištěna v laboratoři ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat MZLU v Brně na přístroji ABI 310.

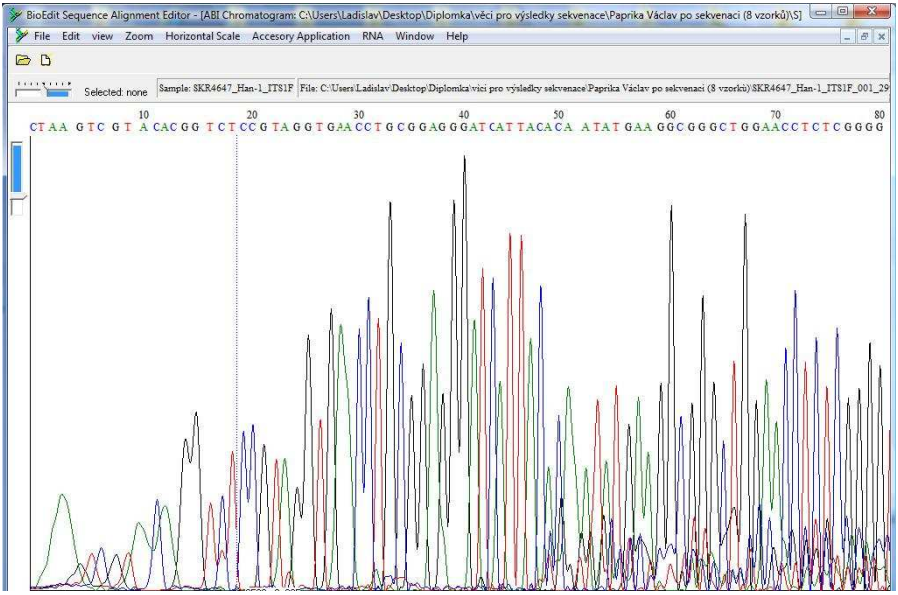
4) Hodnocení výsledků získaných sekvenováním

Pro vyhledání konkrétního organismu byly získané sekvence porovnávány v databázi NCBI pomocí nástroje BLAST.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky sekvenování byly zobrazeny programem Bioedit (obr. 2). .

Obr 2. Příklad části získaného chromatogramu v programu Bioedit, znázorňující pořadí nukleotidů v sekvenovaném vzorku DNA.



U vybraných vzorků byly zjištěny tyto sekvence.

Vzorek 1 - Paprika sl. Speciál 120 ASTA

CTAAGTCGTACACGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAC
AATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTAT
TCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACC
ACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAA
TTAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATG
CCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTC
TTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCC
TACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCT
AGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCAGCTGAAACTTAAGCATATGTCAGCCGGAGGAAAAACCTCAAAACC
AGAAGGCACTCCCACGATGAACTTAAGCATATCAGTAAGAAGAAGGAAAA
AAAGAATATATAGTTTAAGTTAGATGTAACAGAA

Vzorek 2 - Paprika pálivá Rubín 100 ASTA

TAAAAGTCGTACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACA
CAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATT
ATTCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCA
CCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACA
AATTAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCA
TGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCG
TCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGG
CCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGT
CTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCAGCTGAAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGA

Vzorek 3 - Paprika pálivá S80 ASTA

CTAGTCGTACAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAA
TATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTC
ACCCTTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCAC
TAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATT
AATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCC
TGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTCTT
GTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTA
CTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAG
CATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT
ACCAGCTGAACTTAAGCATATAATTAAAGCGGGAGGGAT

Vzorek 4 - Paprika sladká 100 ASTA

AAAGTCGTAACAGGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAC
AAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTA
TTCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCAC
CACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAA
ATTAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCAT
GCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGT
CTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGC
CTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTC
TAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACTTAAGCATATAATTAAAACCGGAAGAAAGGCCTAAA
AACAAGCAGGACTCCCACGGAGAACTTAACAATACAATAAACGGAAGGAA
TTTGATATTTATATGTTATATTTAAAGATGAAAATGGAGGAAGGA

Vzorek 10 - Paprika pálivá H60 ASTA

TTAAGTCGTACACGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCC
AATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTAT
TCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACC
ACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAA
TTAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATG
CCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGAGTTGGGCGTC
TTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCC
TACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCT

AGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCTTAAAGCGGGAGGATGCC

Vzorek 11 - Paprika sladká Rubín 100 ASTA

AAAGTCGTACTGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAG
GGTGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGTCTTGGTGAATTGTTG
ACCCTTGGCGTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCAC
TAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCATTAGTCCGTAACAAAT
TAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGATCTGGCTTCGATGAA
TAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGGGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTTAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGC
CTGGCCGAGCGTCATTTGGACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTCT
TGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCT
ACTGGTTTCGGAGCGCAGGTCAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTA
GCATCAATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGAAGGGAT
ACCAGCTGAAACTTAGACATATCATAAGCGGAGGAAGCG

Vzorek 13 - Paprika sladká Kalocsa 140 ASTA

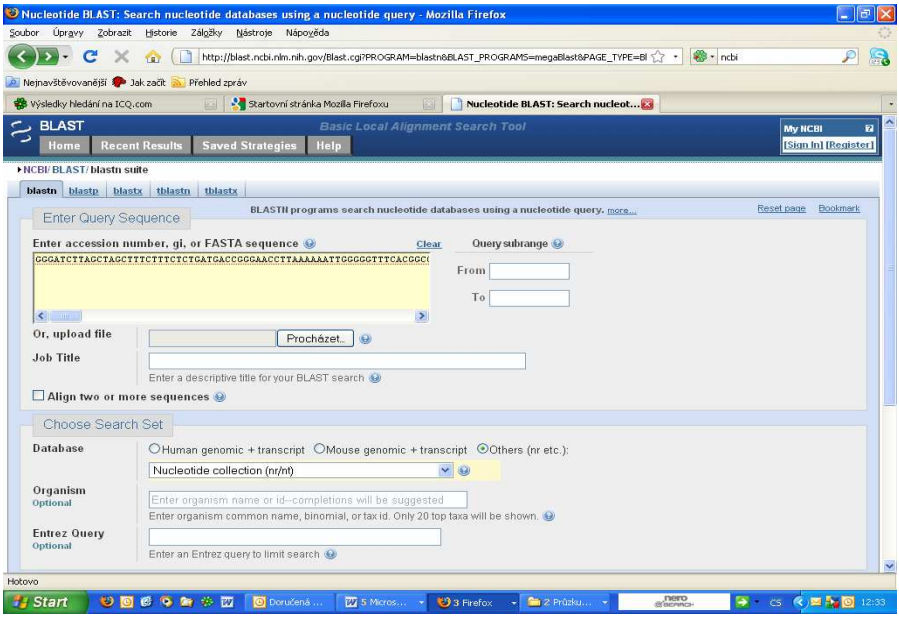
TAAGTCGTACATGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACA
GTATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATT
CACCCTTGTCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCA
CTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAAT
TAATAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGC
CTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGTCT
TGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCT
ACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTA
GCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TAACCAGCTGAACTTAAGCATATATTATAAAGGGGAAGAAAAACCTTAGA
AACATTAAAGGACTCGCCCGATAAACCTAAGCATATCAATAAACAGGAGG
AAAATATTATAGGTAGTAGTAGAAGAGGGGAGAGGAGAGAG

Vzorek 15 - Paprika sladká Eso

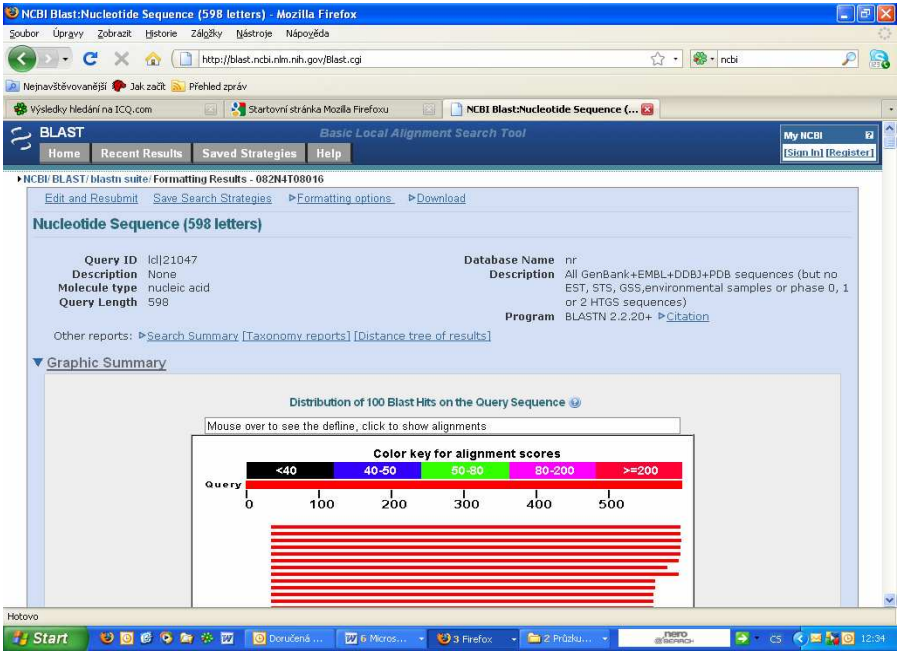
GAGTCGTAACAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTCAT
GGTTCTGGCTGGGTGGAACCGCTCGCGGCGACAGTCTTGTTGACTTATTC
GCCCTTGCCTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGCGGGTTCGCCCACCAC
TAGGACAAAGTTAAACCTTATTGTAATTGCAAAATTTTACCAGTAACTCT
TTGTAATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGGTCTGGCGTCGATGAA
GAACGCAACGAAATGCGATAAGTAAATTGAATTGCAGAATTCAGTGCATT
ATCGAATCTTTGAAGGCACATTGCGTCCTTTGGGATTCCAAAGGGCCTGC
CTGGTCTAGTGTCTTTTGGGCCCTCAAGCTGTGCTTGGCGTGGGGAGTGT
TGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCT
ACTGGTTTCGGAGCGCAGTACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTA
GCATCCATTAAGCCTTTGTTTCACTTTTTGACCTCGAATCTGTAGGGATA
CCCGCTGAAACTTAAGCATATAATAAGCGGAGGAATGGCCTCAAATCAAG
TAGCACTACCCGCTGAACTTTAGCTATCATTAAGCGAAGGAACTTTCATG
GAAAATGAAACATACCTTAGAAAGG

Vyhledávání konkrétního organizmu bylo provedeno pomocí nástroje BLAST (obr 3) v databázi NCBI (obr. 4-6).

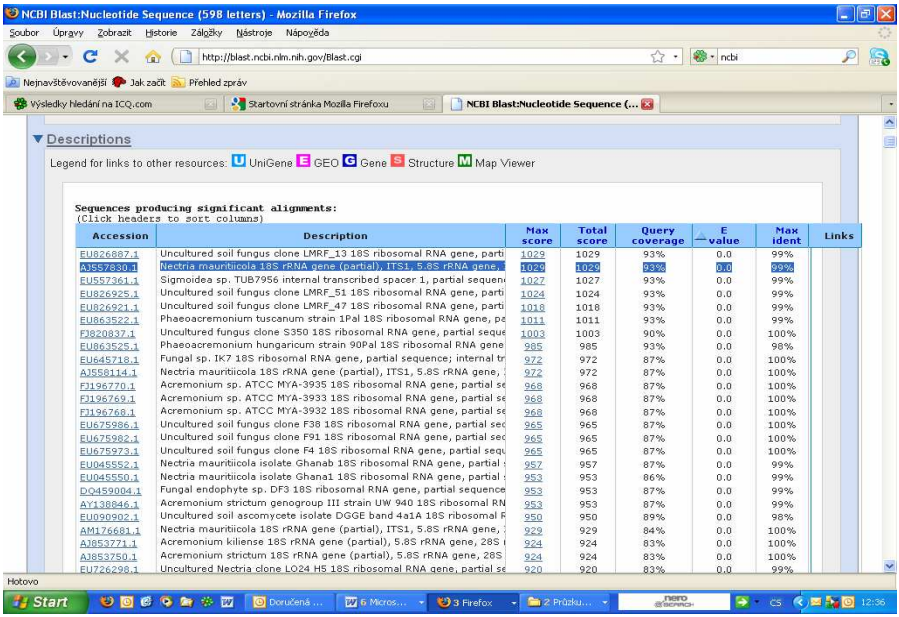
Obr.3 Vložení získané sekvence do nástroje BLAST.



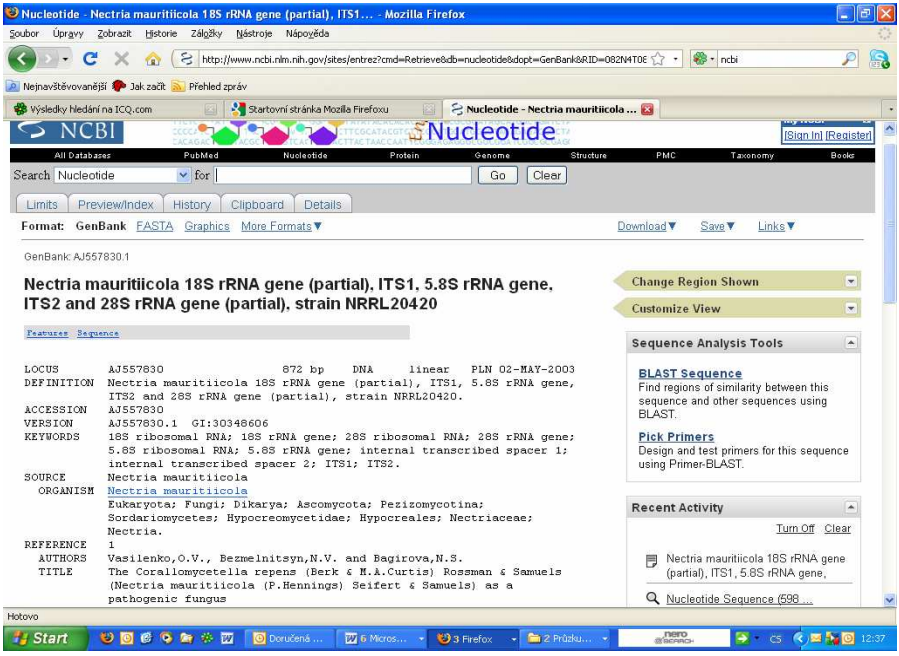
Obr. 4 Příklad výsledku z databáze NCBI zjištěné nástrojem BLAST část 1.



Obr. 5 Příklad výsledku z databáze NCBI zjištěné nástrojem BLAST část 2.



Obr. 6 Příklad výsledku z databáze NCBI zjištěné nástrojem BLAST část 3.



Výsledky vyhledávání v NCBI amplifikované houbové DNA v osmi náhodně vybraných vzorcích jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2 Houbové kontaminace v sledovaných vzorcích papriky.

Číslo vzorku	Přístupový údaj	Popis organismu	Identita (%)
1	EF432274.1	Alternaria sp. G5A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
2	DQ491089.1	Alternaria sp. EAL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
3	DQ491089.1	Alternaria sp. EAL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
4	EU326185.1	Alternaria tenuissima isolate XSD-83 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
10	DQ491089.1	Alternaria sp. EAL1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
11	AY154710.1	Alternaria tenuissima strain IA279 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
13	EU326185.1	Alternaria tenuissima isolate XSD-83 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
15	AB369904.1	Alternaria alternata genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 53969	88

Vyvinutá metoda byla použita na patnácti konkrétních vzorcích červené sušené mleté papriky dodané producentem. Ve všech těchto vzorcích byla zjištěna přítomnost houbové DNA, což odpovídalo výsledkům zjištěných klasickou kultivační metodou v akreditované laboratoři Státního veterinárního ústavu v Olomouci (protokoly o výsledcích jsou k dispozici – Trojan, 2009).

Naše výsledky získané sekvenací osmi náhodně vybraných vzorků DNA (všechny vzorky nemohly být z finančních důvodů sekvenovány) ukázaly přítomnost rodu *Alternaria*, v jednom případě druhu *Alternaria alternata*.

Do současné doby bylo publikováno více než 10 000 prací, které se zabývají problematikou rodu *Alternaria* v rámci jednotlivých oborů aplikované mykologie (Prokinová 2004). Z tohoto velkého počtu prací mimo jiné vyplývá, že přinejmenším některé druhy mohou produkovat toxiny. Obsah těchto toxinů v krmivech a potravinách nebývá však tak vysoký, aby ohrožoval zdraví spotřebitele. Zdá se tedy, že význam toxinů produkovaných houbami rodu *Alternaria* jako kontaminantů potravin a krmiv rostlinného původu není příliš velký (Prokinová 2004).

Klasickou kultivační metodou provedenou podle ČSN ISO 7954 nebyly zachyceny žádné potenciálně toxinogenní plísně v žádném ze vzorků. Při optimalizaci PCR pro detekci houbových kontaminací ve vzorcích červené sušené mleté papriky byl použit jiný vzorek papriky, ve kterém nebyla přítomnost rodu *Alternaria* vůbec zaznamenána (Trojan et al. 2008). Otázkou tedy zůstává, jak se zmíněný rod do zkoumaných vzorků dostal, protože se hojně vyskytuje v životním prostředí. Z naší práce vyplývá, že metoda PCR může významně zpřesnit a urychlit vyhledávání plísňových kontaminant, které nemusí být v době kontroly běžnou kultivační metodou již v životaschopné formě.

ZÁVĚR

Získané výsledky prokázaly kontaminaci dodaných vzorků červené sušené mleté papriky houbami. Metodu molekulární biologie PCR je možné aplikovat na série vzorků červené sušené mleté papriky a zřejmě i na další druhy koření, ve kterých se prokazuje možná kontaminace plísněmi. Jež při klasické kultivaci používané dnes pro kontrolu zdravotní nezávadnosti nemusí být vůbec zaznamenány.

LITERATURA

Prokinová E. Druhy rodu *Alternaria* – původci chorob rostlin, producenti toxinů a alergeny: přehled dosavadních poznatků, Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí, VÚRV Praha Ruzyně, 2004 18 s. Dostupné na World Wide Web: http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-04-04.pdf

Trojan V. Sledování mikrobiálních kontaminací pomocí molekulárně biologických metod ve vybraných surovinách pro výrobu koření. Diplomová práce MZLU, 2009. 81 s.

Trojan V., Hanáček P., Havel L. Detekce houbových kontaminací v práškové paprice pomocí molekulárně biologických metod, MendelNET Agro 2008 str. 94.