

DETECTION OF FUNGAL CONTAMINATIONS IN POWDERED PEPPER USING MOLECULAR BIOLOGICAL METHODS

DETEKCE HOUBOVÝCH KONTAMINACÍ V PRÁŠKOVÉ PAPRICE POMOCÍ MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH METOD

Trojan V., Hanáček P., Havel L.

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

E-mail: xtrojan@node.mendelu.cz, lhavel@mendelu.cz

ABSTRACT

Detection of microbiological contamination in foods has always been a challenging undertaking. Because pathogenic fungi may be present at very low levels, they can be difficult to detect in foods, and components of the foods may also interfere with their detection. The only problem needn't be only the presence of fungi but their products called as mycotoxins could be also big risk for human health. The most useable spice in Czech Republic is red dry pepper in milled composition which is used in food industry as a part of spicy mixtures especially for meat industry. In these days are in Czech Republic used for detection classical cultivation methods as a cultivation on the plates. These methods are strict but time consuming. It is between days and one week. One from the advantages of molecular biology is sparing time. We used PCR with specific kits for isolation DNA from the samples red powdered pepper and in next step we amplified DNA for next secevation and detection of the concrete contaminant in our sample of red powdered pepper. We detected species of fungus *Nectria mauritiicola* which cause antraktosis of plant. It means that sample under the investigation shouldn't be risk for human health. This showed that molecular biological methods could be used for fungus contaminant detection directly in powdered pepper.

Key words: contaminant detection in spice, *Nectria mauritiicola*, pepper, PCR

Acknowledgments: Práce vznikla ve spolupráci s soukromou firmou 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 jednou z mnoha dalších předností je úspora času při provedení analýzy a to při srovnání s klasickými kultivačními metodami až několikanásobně. V oblasti koření se mezi hlavní rizika biologických kontaminantů řadí houby. Nemusí být nebezpečné pouze samotnou svojí přítomností, ale především látkami, které produkují, označované jako mykotoxiny jež v substrátu přetrvávají i při případném úhynu samotného producenta. V České republice z procenta využití různých druhů koření nese obrovský význam červená paprika v podobě sušeného drceného prášku. V dnešní době se pro detekci hub a to nejen v případě papriky používají klasické kultivační metody, které při dodržení standardních postupů trvají několik dnů až týden. Ve své práci se zabývám možností využití molekulárně biologické metody PCR (Polymerase Chain Reaction) pro detekci hub ve vzorcích sušené drcené červené papriky, používané jako surovina ve směsích koření pro masný průmysl.

MATERIÁL A METODIKA

Materiál:

Pro analýzu byl dodán firmou Trumf International s. r. o. vzorek o hmotnosti 0,5 kg červené sušené papriky po rozemletí, která se používá jako hlavní složka koření směsí pro masný průmysl. Množství pro jednotlivé pokusy odebíraná z tohoto vzorku měla jednotnou hmotnost 20 mg.

Metodika:

1) Izolace DNA

Vzorek červené sušené mleté papriky byl použit pro izolaci DNA pomocí dvou různých postupů. Prvním z nich byla izolace pomocí DNeasy Plant kit firmy Qiagen. Tato souprava je navržena pro izolaci DNA z rostlin, ale běžně je používána i pro izolaci DNA z hub. Druhým postupem byla izolace pomocí kitu pro bakteriální DNA, která se rovněž používá pro izolaci DNA z hub. Při použití DNeasy Plant kit byl využit přímo dodaný vzorek a vzorek homogenizovaný v tekutém dusíku. Získávaná DNA byla při vymývání z kolonky kitu rozdělena do dvou frakcí (1 a 2). Protože výsledky získané po homogenizaci vzorku v tekutém dusíku a z přímé izolace vzorku ukázaly téměř stejný výtěžek DNA, bylo při izolaci pomocí kitu pro bakteriální DNA využito pouze přímo dodaného vzorku.

2) PCR amplifikace

Pro amplifikaci metodou PCR byly použity primery ITS (internal transcribed spacer) oblasti jaderné DNA a to z několika důvodů. Jedná se o běžný postup při amplifikaci a sekvenování jak rostlin, tak hub, existuje rozsáhlá databáze ITS sekvencí na internetu a primery pro tuto analýzu máme k dispozici – jde o primery ITS1F a ITS4B, které jsou navrženy (na rozdíl od obecných ITS1 a ITS4 pro eukaryota) speciálně pro houby. Předběžné výsledky ukazovaly, že vzorek neobsahuje ITS z hub. Předběžný negativní výsledek se dal však vysvětlit tím, že primer ITS4B je komplementární pouze k bazidiomycetům. A proto bylo použito páru ITS1F a ITS4 který je specifický pro kteroukoli skupinu hub. Po využití těchto primerů, byl již detekován produkt.

Pro ostřejší produkt na gelu byla optimalizována teplota annealingu pomocí gradientové PCR.

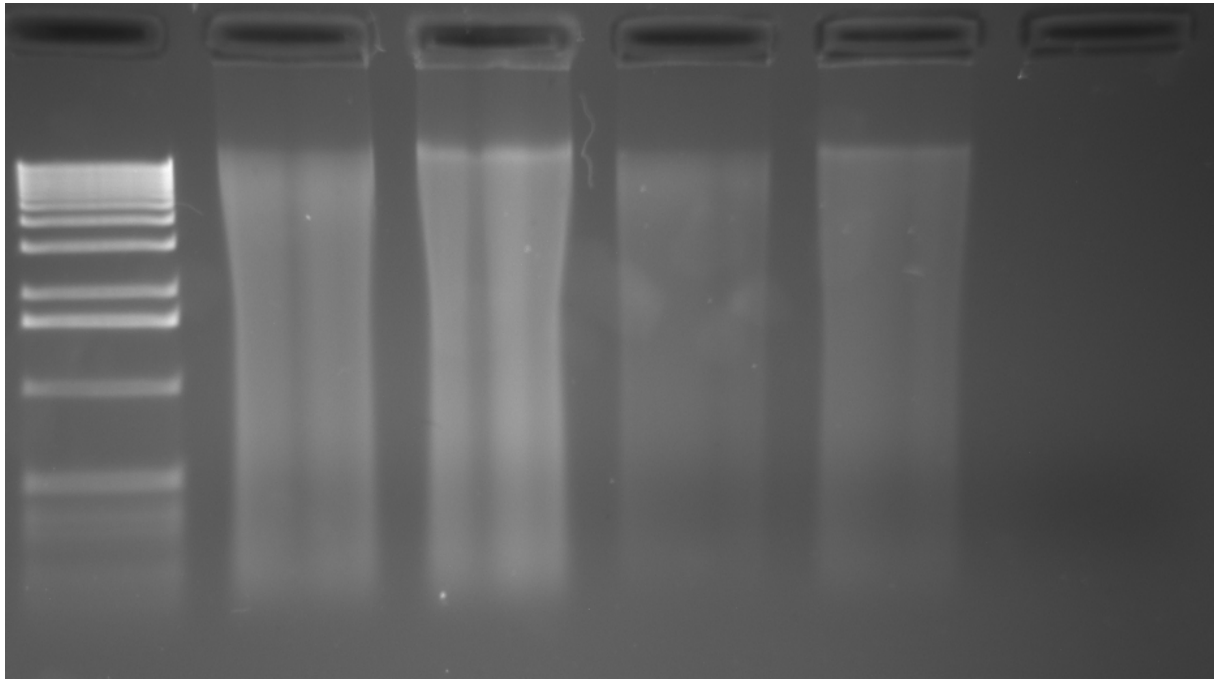
3) Sekvenování

PCR produkty byly purifikovány pomocí Qiagen purifikačního kitu. Koncentrace DNA byla změřena na fluorimetru a sekvence vzorků byla zjištěna v laboratoři ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Výtěžky izolace DNA při použití kitu pro rostlinnou DNA přímo dodaného vzorku červené sušené mleté papriky a vzorku červené sušené mleté papriky homogenizovaného v tekutém dusíku byly srovnatelné. Výsledná koncentrace DNA se po agarózové elektroforéze jevila jako částečně degradovaná, homogenizace v kapalném dusíku mírně výtěžek zvýšila. U takto izolované DNA oběma metodami však nelze kvantifikovat poměr DNA papriky a DNA případně přítomné houby (obr. 1).

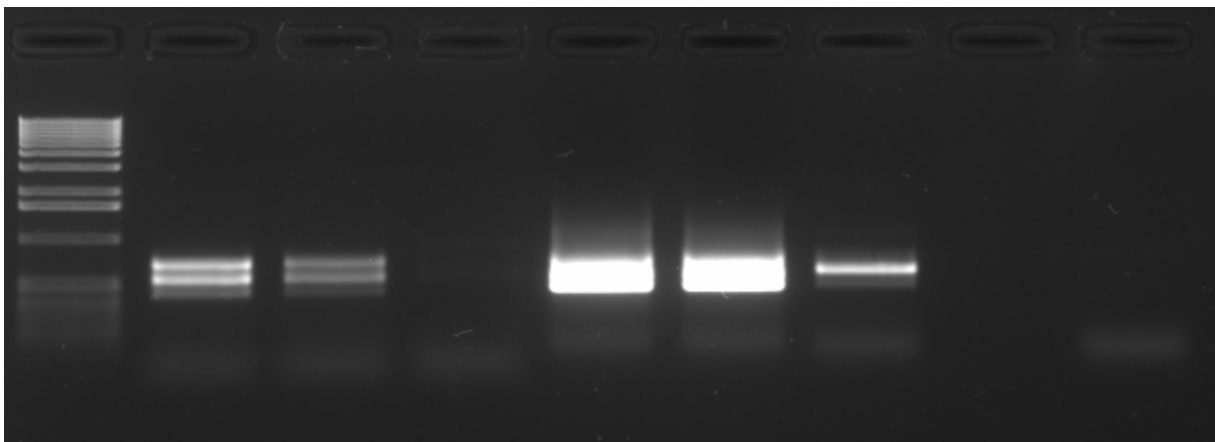
Výtěžek izolace DNA s pomocí kitu pro bakteriální DNA byl v porovnání s předchozím postupem slabší, byl zde ale předpoklad, že izolovaná DNA náleží výhradně houbě (obr. 1).



Obr. 1 Izolace DNA

Zleva doprava: 1 kb DNA Ladder 250 ng (Invitrogene); DNA izolovaná kitem pro izolaci rostlinné DNA po homogenizaci vzorku tekutým dusíkem (frakce 1); DNA izolovaná kitem pro izolaci rostlinné DNA po homogenizaci vzorku tekutým dusíkem (frakce 2); DNA izolovaná kitem pro izolaci rostlinné DNA přímo z dodaného vzorku (frakce 1); DNA izolovaná kitem pro izolaci rostlinné DNA přímo z dodaného vzorku (frakce 2); DNA izolovaná kitem pro bakteriální DNA v přímo dodaném vzorku.

Při amplifikaci s využitím primerů ITS1F a ITS4B předběžné výsledky ukazovaly, že vzorek neobsahuje houbovou ITS. Negativní výsledek se dal však vysvětlit tím, že primer ITS4B je komplementární pouze k bazidiomycetům. A proto bylo použito páru ITS1F a ITS4 který je specifický pro kteroukoli skupinu hub. Po využití těchto primerů, byl již detekován produkt, což byl důkaz přítomnosti houbové DNA (obr. 2)

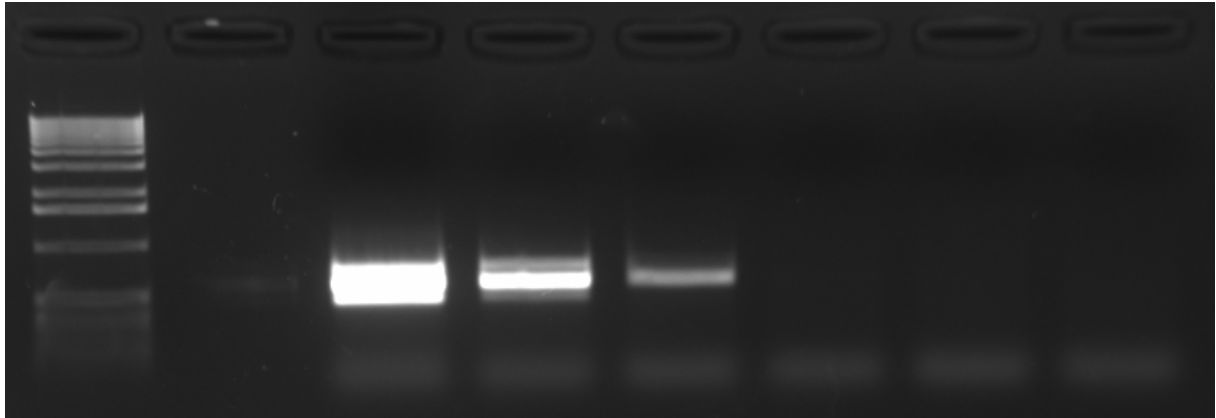


Obr. 2 Amplifikace DNA

Zleva doprava: 1 kb DNA Ladder 250 ng (Invitrogene); primer ITS1 a ITS4, izolace kitem pro rostlinnou DNA, s homogenizací tekutým dusíkem; primer ITS1 a ITS4, izolace kitem pro

rostlinnou DNA přímo z dodaného vzorku; primer ITS1 a ITS4, izolace kitem pro bakteriální DNA přímo z dodaného vzorku; primer ITS1F a ITS4, izolace kitem pro rostlinnou DNA, s homogenizací tekutým dusíkem; primer ITS1F a ITS4, izolace kitem pro rostlinnou DNA přímo z dodaného vzorku; primer ITS1F a ITS4, izolace kitem pro bakteriální DNA přímo z dodaného vzorku.

Pomocí gradientové PCR byla zvolena optimální teplota annealingu, při které byl PCR produkt na gelu nejostřejší. A to je 55 °C (obr. 3).



Obr. 3

Zleva doprava: 1 kb DNA Ladder 250 ng (Invitrogene); 53,1 °C; 54,4 °C; 57,5 °C; 61,4 °C; 65,6 °C; 67,8 °C.

Výsledkem sekvenování byla zjištěna tato sekvence:

```
GGGATCTTAGCTAGCTTTTCTTTCTCTGATGACCGGGAACCTTAAAAAATTGGGGG
TTTCACGGCGTGGCCGAGCCGCTCTCCGGTGCGAGGTGTGCTACTACGCAGGGGA
GGCTGCGGCGCGACCGCCACTCAATTTGGGGGACAGGGGCCCGGAGGCCGCTGA
TCCCCAGCACCAGGTCCCCCCCCGAAAGGGGGTCCTGAGGGTTGAAATGACGCTCG
GACAGGCATGCCCGCCGGAGTGCCGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTGTTCGGGC
TTTCGCCCTCAGAGATTCACAATAAAATCAGAGTTTGGTTGTCCCCGGCGGACG
CCCGGAGCCCGGAGGCACCGCGCGCTGAGCCCGCCGAGGGAACGATAGGTATGT
TCACAATGGGTTGGAGAGCCTAGGGCACTCTGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCA
CCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTTAAATGACCAAGA
```

Při porovnání zjištěné sekvence s databází NCBI byla zjištěna s 99% pravděpodobností shoda s jediným druhem houby *Nectria mauritiicola*. Tato houba vyvolává antraknózu papriky (Cornelius 2008). To vysvětluje přítomnost DNA tohoto organismu ve

sledovaných vzorcích. Tedy tato houba byla už na sklízených plodech před jejich zpracováním.

Analýzou DNA vzorku červené sušené papriky po rozemletí se podařilo identifikovat houbu a porovnáním její sekvence v databázi ji taxonomicky přiřadit. Zvoleným postupem však nelze tuto houbu ve vzorku kvantifikovat, ani určit její životaschopnost. Kvantifikovat by pravděpodobně bylo možné pomocí RT-PCR, která bude následovat jako další etapa výzkumu.

ZÁVĚR

Získané výsledky prokázaly, že je možné izolovat DNA přímo ze vzorků sušené mleté červené papriky, technologicky využívané ve výrobě kořenicích směsí pro masný průmysl, a pomocí molekulárně biologické metody PCR dokázat kontaminaci konkrétním houbovým organizmem.

LITERATURA

Cornelius, K.A. (2007): Morphological, molecular, and genetic characterization of *Colletrichum* species from pepper. dostupné na internetu: http://www.dep.anl.gov/p_undergrad/ugsymp/2007abstracts/36.html