

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

Bc. MARKÉTA DOŠKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav Biologie rostlin



**Optimalizace molekulárně-biologických metod pro detekci
kontaminant v kořeni**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
MVDr. Ing. Václav Trojan, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Markéta Došková

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji,

že jsem práci:.....

.....
.vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu TAČR (dílčí) č. TAČR – TG012016.

Ráda bych také touto cestou poděkovala týmu z Ústavu biologie rostlin v čele s doc. Ing. Tomášem Vyhnánkem, Ph.D, jehož členové mě velice svědomitě, trpělivě a přátelsky provázeli veškerými úkoly souvisejícími s diplomovou prací. Velké díky samozřejmě patří také mému vedoucímu - MVDr. Ing. Václavu Trojanovi, Ph.D. nejen za počáteční motivaci, ale i příkladné vedení a ochotný přístup. V neposlední řadě pak mé drahé polovičce za podporu a shovívavost při vrtkavých náladách během posledního semestru.

ABSTRAKT

V literární části diplomové práce je pojednáno o kontaminantech v potravinách obecně s užším zaměřením na koření. Větší pozornost je věnována zejména mykotoxinům – sekundárním produktům plísní, základnímu přehledu, způsobům stanovení a legislativě ošetřující jejich monitoring. Hlavní část literární rešerše je zaměřena na způsoby hodnocení mikrobiologické kvality potravin, na popis metod klasických i moderních. Jelikož pro praktickou část posloužily vzorky sušené mleté papriky a pepře, je závěr teoretické části věnován způsobu zpracování pepře a papriky. V praktické části je popsána metodika jednotlivých kroků pro optimalizaci molekulárně-biologické metody. Výstupy z jednotlivých kroků jsou pak součástí výsledků a diskuze, stejně tak jako další vyhlídky a možnosti do budoucna.

ABSTRACT

Contaminants are described in food generally, with narrower aim to spices in literary part of thesis. Bigger attention is dedicated to mycotoxins – secondary products of molds, basic survey, ways of assessment and legislation connected with their monitoring. The main part of literary searches is focused on methods for microbial quality assessment of foods, then on description of classic and modern methods. Whereas samples of dried capsicum and pepper powders served as a samples for practical part, the end of theoretical part is devoted to individual steps for optimalization of new molecular-biological method. The outputs of each steps are then parts of results and discussion, as well as other prospects and possible ways to future.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE	11
3 KONTAMINANTY V POTRAVINÁCH	12
3.1 Analýza rizika	12
3.1.1 Hodnocení rizika	12
3.2 Chemické kontaminanty	13
3.2.1. Biocidy	13
3.2.2. Konzervační látky	14
3.3 Fyzikální nebezpečí.....	14
3.4 Biologické nebezpečí.....	15
3.4.1 Mykotoxiny	15
3.4.1.1 Účinky mykotoxinů.....	16
3.4.1.2 Diagnostika mykotoxinů	17
3.4.1.2.1 <i>Imunochemické metody</i>	18
3.4.1.3 Legislativa pro kontrolu mikroorganismů a jejich toxických produktů	19
4 HODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY POTRAVIN	21
4.1 Objektivní přístup identifikace	21
4.2 Elektronický nos	21
4.3 Biosenzory	22
4.3.1 DNA biosenzor.....	22
4.4 Kultivační vyšetření	23
4.4.1 Doplnující identifikační metody po kultivačním vyšetření	24
4.4.1.1 Identifikace pomocí biochemických testů	24
4.4.1.2 Identifikace pomocí diagnostických testů	25
4.5 Automatizované systémy využívané při identifikaci mikroorganismů.....	26
4.5.1 MALDI – TOF	27
4.6 Imunologické metody	27
4.6.1 ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	28
4.7 Metody molekulární biologie	30
4.7.1 Izolace nukleové kyseliny prokaryot.....	31
4.7.2 Detekce a kvantifikace nukleových kyselin	32
4.7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	33

4.7.3.1. Základní princip	33
4.7.3.2 Detekce PCR produktů.....	34
4.7.3.3 Real-time PCR (qPCR)	34
4.7.3.4 Aplikace PCR metody v rostlinné patologii, detekce a diagnóza patogenů.....	35
4.7.4 Stanovení sekvence DNA	36
4.7.4.1 Vyhledávání funkčních oblastí.....	37
4.4 Bioinformatika.....	38
4.4.1 Vyhledávání podobností sekvencí.....	38
5. ZPRACOVÁNÍ PAPIKY A PEPŘE, MOŽNÉ VSTUPY MIKROORGANISMŮ DO ŘETĚZCE	40
5.1 O koření obecně.....	40
5.2 Paprika (<i>Capsicum</i>).....	40
5.2.1 Zpracování	42
5.3 Pepř (<i>Piper sp.</i>).....	43
5.3.1 Zpracování	43
5.4 Ošetření a skladování koření.....	44
5.5 Kontaminace koření	45
6. MATERIÁL A METODIKA	48
6.1 Izolace DNA	48
6.2 PCR amplifikace a klonování DNA	48
6.3 Kultivace bakterií.....	51
6.4 Vyhodnocení	52
7. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
8. ZÁVĚR.....	62
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
10. SEZNAM ZKRATEK.....	70
11. PŘÍLOHY	71

1. ÚVOD

Přítomnost mikroorganismů (virů, bakterií, plísní) v potravinách je příčinou kažení, které většinou vede ke snížení obsahu výživově cenných látek, znehodnocení potraviny a také ke zhoršení sensorické kvality. Zejména významné jsou pak takové změny, které vedou ke vzniku zdravotních nebezpečí z potraviny. Alimentární onemocnění z potravin jsou velmi významnou záležitostí, vždyť je v České republice každoročně nahlášeno desítek tisíc případů a několik pacientů v důsledku takového onemocnění ročně zemře. Reálná nemocnost je však oproti evidenci několikrát vyšší. Velká část pacientů při mírnějších klinických příznacích nenavštíví lékaře a infekce tak uniká systému hlášení. Nejvyšší nemocnost je zaznamenávána pak u dětí.

V dnešní době existuje opravdu velký počet metod pro hodnocení mikrobiologické kvality potravin a roste tendence metody stále více objektivizovat. Již v roce 1963 padl návrh finského mikrobiologa Helge Gyllenberga použít pro identifikaci bakterií numerickou pravděpodobnostní metodu.

Teorie i praxe pravděpodobnostní numerické identifikace se dále vyvíjela a byla hlavně široce aplikována jako automatická identifikace v mikrobiologických diagnostických přístrojích. Nabízí objektivně získané řešení vyjádřené číselně. Numerická identifikace není jediná metoda používající výpočetní techniku. Ve vzorcích potravin se obvykle patogenní mikroorganismy vyskytují v nízkých počtech a při jejich průkazu standardními metodami je nutné je nejprve pomnožit, čímž se prodlužuje doba identifikace. Ke slovu se tak dostávají molekulárně-biologické metody. Při jejich použití se významně zkracuje potřebná doba pro stanovení. Na druhou stranu, stejně jako u jiných alternativních metod, musí být pozitivní výsledek (průkaz patogenního mikroorganismu přímo ve vzorku) potvrzen standardní kultivační metodou.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je zhodnocení nejznámějších, běžně dostupných a moderních metod pro posouzení mikrobiologické kvality potravin, nastínění jejich pozitiv i negativ. V praktické části pak využití a optimalizace molekulárně-biologické metody pro detekci mikrobiální kontaminace ve vzorcích koření, které byly poskytnuty soukromým subjektem zastupovaným tuzemskou firmou. V poslední části pak snaha o vylepšení metody rozšířením jejích aplikací.

3 KONTAMINANTY V POTRAVINÁCH

3.1 Analýza rizika

Každý den konzumujeme tisíce různých chemických látek z potravin. Samozřejmě má převážná část těchto látek přírodní původ (nutrienty, naturální toxiny), některé mohou ale být v potravinách přítomny důsledkem znečištění životního prostředí (pak mluvíme o primárních kontaminantech) či vznikají v procesu zpracování prvotních surovin (sekundární kontaminanty). Další jsou zase úmyslně přidávány (aditiva) nebo používány ve výrobě (veterinární léčiva, pesticidy). Všechny tyto látky mají jednu společnou vlastnost: mohou poškodit zdraví konzumenta.

Pro posouzení toho, které látky mohou být zdraví škodlivé, posouzení analýzy potenciálních zdravotních následků a zvážení případných dalších nevýhod a opatření chránících konzumenta se používá analýza zdravotního rizika. Analýza rizika zahrnuje tři nedílné součásti: hodnocení rizika (risk assessment), řízení rizika (risk management) a komunikaci o riziku (risk communication).

Vzhledem k tomu, že se budou ve zbytku práce používat často pojmy jako jsou „nebezpečí“ či „riziko“, ráda bych tyto blíže definovala v následující podkapitole.

3.1.1 Hodnocení rizika

Hodnocení rizika (Risk assessment) – je vědecké hodnocení pravděpodobnosti výskytu známého nebo potenciálního škodlivého efektu, který je výsledkem expozice určité látky. Při hodnocení se používají dva základní pojmy – nebezpečí a riziko, zde je jejich vysvětlení:

- Nebezpečí (Hazard) – schopnost chemické látky poškodit zdraví,
- Riziko (Risk) – odhad pravděpodobnosti výskytu škodlivého efektu, váženého podle jeho závažnosti, který může být výsledkem přítomnosti nebezpečné látky v potravině (ZAPLETAL O. et kol., 2001; VANÍČEK J. a kol., 2010).

Účelem identifikace nebezpečí je odhalení potencionálního alimentárního nebezpečí v dané potravině, tedy těch činitelů nebo situací při zacházení s potravinou, které mohou vést k ohrožení zdravotního stavu konzumenta. Takové činitele mohou být dělené na základě jejich povahy na chemické, fyzikální a biologické (KOMPRDA T., 2004).

Legislativním podkladem v České republice pro nastavení požadavků na nezávadnost potravin týkající se kontaminantů je vyhláška Ministerstva zdravotnictví 298/1997 Sb.,

kteřou se stanovují chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky pro jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné – Příloha č. 3 – **Kontaminující látky v potravinách**. Jako nežádoucí kontaminanty jsou v této příloze mimo jiné uvedeny: arsen, cín, hliník, chrom, kadmium, měď, nikl, olovo, rtuť, zinek, železo, dusičnany, alifatické chlorované uhlovodíky, polyaromatické uhlovodíky, A-nitrosaminy, estery kyseliny ftalové, polychlorované bifenyly (PCB), mykotoxiny (Aflatoxin B₁, Aflatoxin M₁, Aflatoxiny (suma B₁, B₂, G₁, G₂), Sterigmatocystin, Deoxinivalenol (DON), Patulin, Ochratoxin A.

3.2 Chemické kontaminanty

Chemické kontaminace mohou způsobovat konzervační látky, rezidua růstových stimulátorů, fungicidy, pesticidy, herbicidy a jiné látky jako jsou chlorované dibenzo- p- dioxiny, dibenzofurany, bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, akrylamid a ftaláty.

3.2.1. Biocidy

Biocidy jsou látky, které se používají k tlumení a omezování růstu a proliferace škůdců ve všech oblastech lidské činnosti.

Rozdělení biocidů

- Dezinfekční látky
- Konzervační látky
- Přípravky pro regulaci škůdců (pesticidy, repelenty aj.)

Používání přípravků na ochranu rostlin může vést k výskytu **reziduí účinných látek** (pesticidů) v potravinách. Těmi mohou být nezměněné účinné látky (nejčastěji), jejich reakční a rozkladné produkty. Rezidua pesticidů se do potravin **dostávají** buď přímo, kdy z ošetřených plodin přechází do produktů určených k potravinářským účelům, nebo nepřímo, kdy dochází k jejich přenosu prostřednictvím krmiv nebo opylovačů do produktů původu živočišného (maso, mléko, vejce, med), prostřednictvím půdy do následných plodin a jejich produktů nebo prostřednictvím vody a vzduchu do různých potravních zdrojů.

Snad nejpoužívanější z nich jsou v tomto ohledu pesticidy – tedy přípravky a prostředky, které ve smyslu znění zákona č. 147/1996 Sb. a směrnice ES č. 91/414/EEC jsou určeny k tlumení a hubení rostlinných a živočišných škůdců a k ochraně rostlinných kultur, stromů, keřů, skladových zásob, výrobních závodů, aj. Kromě zmíněného pozitivního účinku mají pochopitelně i negativní. Jejich neuváženým používáním dochází k zásahům do přírody. Pesticidy spláchnuté dešťovými srážkami z polí mohou způsobit vážné škody a především narušit rovnováhu v ekosystému.

V případě potravin dovezených ze třetích zemí (převážně africké a asijské státy) se také častěji jedná o rezidua v EU neschválených pesticidů (hlavně organofosfátové insekticidy - profenofos, triazofos, ethion; z fungicidů např. procymidon). MLR jsou nejčastěji překračovány v nezpracované zelenině a ovoci (brukvovitá a listová zelenina, **čerstvé bylinky - bazalka, petržel** a celer listový a řapíkatý) a ve zpracovaných i nezpracovaných čajových listech (což se týká i bylinných čajů), divoce rostoucích houbách, **koření - kmín**, rýži, produktech plodové zeleniny a v suchých semenech luštěnin. Jedná se hlavně o rezidua insekticidů (dimethoát, chlorpyrifos, profenofos, acetamiprid a imidakloprid). Časté je také překročení MLR u některých fungicidů (dithiokarbamáty, karbendazim, iprodion, procymidon). (ZAPLETAL O. et kol; 2001; PEPPERŇY K., 2015).

3.2.2. Konzervační látky

Do této skupiny patří látky různorodé chemické povahy, které prodlužují dobu trvanlivosti potravin a chrání je proti zkažení způsobené činností mikroorganismů (KOMPRDA T., 2004).

3.3 Fyzikální nebezpečí

Jedná se o cizí předměty nebo mechanické nečistoty tj. ostré a tvrdé předměty, které mohou poškodit zdraví spotřebitele, pocházející z prostředí nebo z provozoven, rozdělujeme je do dvou dílčích skupin; **endogenní zdroje** – nečistoty a předměty pocházející ze surovin, např. kameny, skořápky, kosti, chlupy, písek, hlína a **zdroje exogenní** – osobní předměty pracovníků v potravinářství nebo stravovacích službách (sponky, nedopalky z cigaret, knoflíky, mince. Dále jsou to kontaminace z technologie a pracovního prostředí (střepy, skla, šroubky, části zařízení, omítka apod.).

Mleté koření bývá často falšováno přidávkem jiných sypkých materiálů, například škrobu, barviv nebo hlínky, objevuje se i písek a dokonce jsou i popsány zdraví ohrožující

případy falšování, kdy byly odhaleny příměsi solí olova v mleté paprice. Pokud jde o mletou papriku, setkáváme se také se záměrným přidáváním cihlového prášku (VOLDRICH M., 1999).

Mletá kořeninová paprika, kayenský pepř ani paprika kořeninová pálivá (celá či mletá) nesmějí obsahovat živý ani mrtvý hmyz a plísň. V posledních letech bylo největším problémem falšování mletých chilli papriček barvivy Sudan I, Sudan II, Sudan III a Sudan IV (červený šarlat), která nejsou povolena pro barvení potravin. Kromě sudanových barviv bylo zjištěno falšování i dalšími syntetickými barvivy jako je Rhodamine B, Orange II, Para red, která jsou potencionálně karcinogenní a bylo zjištěno i použití bixinu, které je povoleno k barvení jiných potravin. Jejich přítomnost však nedokážeme sami odhalit, dají se zjistit pouze laboratorními metodami. Při dalším zpracování se pak nepovolená barviva dostávají do směsí, kečupů nebo dresinků (SMĚLÁ D., 2015).

3.4 Biologické nebezpečí

Do této kategorie nejčastěji zahrnujeme bakterie, viry (potraviny jsou vektory přenosu), v úvahu přicházejí také modifikované prionové proteiny. Největší význam mají z kvantitativního hlediska patogenní mikroorganismy, patogenita je obecná vlastnost bakterie způsobit infekční onemocnění. Tuto vlastnost určuje její virulence, jež je mírou patogenity (SCHINDLER J., 2008).

3.4.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, vyvolávají toxické syndromy, které souhrnně nazýváme mykotoxikózy. Vyskytují se na všech úrovních potravního řetězce.

Mykotoxiny řadíme mezi prioritní kontaminanty potravin. Z chemického hlediska jsou vysoce stabilní nízkomolekulární organické sloučeniny nebílkovinné povahy. Ve vztahu posuzování zdravotních rizik spojených s konzumací potravin řadí odborníci mikrobiální kontaminaci hned na první místo. Kritérii pro zhodnocení významu jsou především potencionální rizika a závažnost negativních účinků, spolu s frekvencí případů, kdy daná látka byla průkaznou příčinou intoxikací a také častý výskyt v běžně konzumovaných potravinách (DOLEŽAL M., 2012).

Vznik a výskyt mykotoxinů je výsledkem složité interakce mezi genomem toxinogenních mikrobiálních hub a zevním prostředím, včetně druhu substrátu, na kterém rostou, klimatických faktorů, způsobu sklizně a skladování, distribuce a zpracování.

Mykotoxiny produkované patogenem pomáhají kolonizaci rostliny. Deoxynivalenol (DON) se například účastní aktivace obranných mechanismů rostliny, které vedou k produkci ROS a programované buněčné smrti (SALAČOVÁ L. a kol., 2015).

Asi 50 % druhů plísní významných v potravinářství produkuje mykotoxiny. Známo je více než 350 mykotoxinů. Pokud už jednou mykotoxin v potravine vznikne, není možné jej nijak odstranit nebo zničit. Proto je potřeba vyhýbat se potravinám napadeným plísněmi (OLEJKOVÁ D., 2001).

Současné výzkumy dokazují, že riziko mykotoxinů existuje na celém světě. Například deoxynivalenol (DON) je mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*), které jsou běžnými patogeny obilnin. DON patří k celosvětově nejrozšířenějším trichothecenům. Během výroby piva deoxynivalenol přechází z kontaminovaného ječmene do sladu a následně do sladiny, jeho přítomnost, mimo jiné, může vést ke vzniku nežádoucího jevu zvaného „gushing“, nebo-li přepěňování piva. Tento úkaz je velmi komplexní a může souviset i s produkcí jiných metabolitů – třeba hydrofobinů.

Z toxikologického hlediska má asi největší význam ochratoxin A, který ve své molekule obsahuje atom chloru. OTA je sekundárním metabolitem některých mikroskopických hub rodu *Penicillium* a *Aspergillus* (JEŽKOVÁ A. et kol, 2009).

3.4.1.1 Účinky mykotoxinů

Otravy mykotoxiny jsou známé již od antických dob. Některé mykotoxiny (např. aflatoxiny) významným způsobem kontaminují produkci potravin v zemích s teplejším klimatem a dostávají se importem do Evropy. Jiné (např. ochratoxiny, trichotheceny, fumonisiny) mohou být produkovány ale i přímo v našich podmínkách (ZAPLETAL et kol., 2001).

Příčinou vzniku alimentárního onemocnění jsou tedy toxiny přítomné v potravine, mezi významné původce alimentárních intoxikací patří *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*. Jak je uvedeno výše, zdrojem kontaminace potravin ve výrobním procesu mohou být suroviny, prostředí nebo i člověk. Také nevhodné pod-

mínky skladování a manipulace s potravinami během přípravy v domácnostech nebo stravovacích zařízeních, kde nejsou důsledně dodržovány zásady správné hygienické praxe, mohou negativně ovlivnit zdravotní nezávadnost potravin (JEŽKOVÁ A. et kol, 2009).

Onemocnění způsobená požitím mykotoxinů mohou mít řadu klinických projevů. Na člověka mohou mykotoxiny působit hepatotoxicky (aflatoxiny, sterigmatocystin), hematotoxicky (aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, trichotheceny), nefrotoxicky (ochratoxin A, citrinin), neurotoxicky a myotoxicky (tremorgeny, citreoviridin), dermatotoxicky (psoraleny, trichotheceny), genitotoxicky (zearalenony), genotoxicky (aflatoxiny, ochratoxin A, citrinin, zearalenon, patulin, trichotheceny, fusarin C), imunotoxicky (aflatoxiny, ochratoxin A, patulin, trichotheceny) a jako toxiny dýchací soustavy (patulin) a zažívacího traktu (T-2 toxin aj.) (BURSOVÁ Š., NECIDOVÁ L., DUŠKOVÁ M., 2014).

3.4.1.2 Diagnostika mykotoxinů

Detekce mykotoxinů v potravině představuje značný technický problém – rozmístění mykotoxinu není totiž v surovině většinou homogenní, z čehož vyplývají jisté nároky na způsob odběru a velikost reprezentativního vzorku k analýze. Nákladné metody instrumentální analýzy (chromatografické metody) jsou v poslední době doplňovány rychlymi imunodiagnostickými metodami. (ZAPLETAL et kol., 2001)

Například přímé stanovení DON ve vzorcích rostlinného původu bez jejich předchozí úpravy je vzhledem ke složitosti matrice velmi obtížné. Z toho důvodu se používají různé postupy a metody, aby byl vliv matrice eliminován. Nejčastěji používanou metodou je extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction - SPE). Při tomto způsobu bývá s různou výtěžností aplikována celá řada sorbentů (aktivní uhlí - alumina, iontově výměnné pryskyřice, silica, Florisil, grafitizované saze (GCB), MycoSep kolonky a imunoafinitní kolonky). K vlastnímu stanovení nejen DON v potravinách se v poslední době používají chromatografické metody, jako je např. plynová chromatografie s detektorem elektronového záhytu (ECD) nebo s hmotnostním detektorem, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí či superkritická fluidní chromatografie. Kromě těchto metod jsou často aplikovány právě imunologické postupy, např. radioimunologická analýza (RIA) či enzymová imunoanalýza (JEŽKOVÁ A. et kol, 2009).

3.4.1.2.1 Imunochemické metody

Třebaže imunochemické techniky poskytují extrémně specifické a citlivé metody pro studium funkčních a strukturálních vlastností antigenů z rostlinných patogenních mikroorganismů, je zde také mnoho zpráv o tom, jak jsou tyto techniky aplikovány na identifikaci mikrobiálních toxinů v rostlinných tkáních. Přítomnost mykotoxinů v potravinách rostlinného původu může nastat taktéž před nebo během sklizně. Byly vyvinuty techniky na detekci mnoha mykotoxinů (aflatoxinů, ochratoxinů, trichothecenů aj.). Byly úspěšně aplikovány při analýze kukuřice, pšenice, ječmene, bavlněného semínka a buršských oříšků.

- Imunotesty pro detekci aflatoxinů

Mnoho rozličných postupů bylo vytvořeno pro spojení AFB₁ na nosný protein, což by mělo být základním krokem metody. Nejběžnější metoda pro produkci protilátek požadovaných komponentů zahrnuje především složitou reakci - formaci oximů (MODRÁ H., SVOBODOVÁ Z.; 2009).

- Imunotesty pro další mykotoxiny

Co se týče dalších mykotoxinů, značné úsilí bylo namířeno na vývoj metody pro OTA, zearalenon, sterigmatocystein. RIA a ELISA byly popsány pro determinaci zearalenolu, další výzkumy zase na použití ELISA pro detekci sterigmatocystinu. Mnoho technik bylo popsáno také pro OTA, všechny používají protilátky generované proti konjugátu vytvořeného spojením toxinu na protein přes funkční karboxylovou kyselinu. Metoda pro rubratoxin, fumonisin a fusarochromonon byly také popsány.

- Imunoafinitní chromatografie

Tato unikátní technika byla použita pro izolaci specifických protilátek využívajících imobilizované analyty. Nedávné úsilí bylo zaměřeno na imobilizaci protilátek na stacionární fázi pro separaci malých molekul. Fáze pokrytá protilátkami je umístěna v koloně, rozpouštědlo obsahuje specifický analyt, který tím protéká. Během tohoto kroku zachycuje analyt, separující jej od ostatních komponentů v rozpouštědle. Zachycený analyt může být přesunut z adsorbentu disociací komplexu protilátky s roztokem pufru.

Imunoafinitní technika, která „chytá do pastí“ mykotoxiny byla použita pro AFB₁, AFM a OTA. Toxin může být vylučován z kolony pro následnou analýzu, jakou je ELISA nebo RIA. Afinitní kolona slouží jako specifické pročištění a nástroj pro zakoncentrování mykotoxinu pro analýzu a je vhodný pro zakoncentrování polárních látek, které je často velmi těžké koncentrovat z okolí vzorku za použití obvyklých resinů.

- Imunochromatografie

Protilátky mohou být použity jako chemicky selektivní detektory následující po HPLC separaci materiálů z komplexu směsí látek. Použití ELISA bylo vyvinuto jako pokolový monitorující systém pro HPLC pro analýzu rozličných skupin trichothecenů. Jednotlivé frakce eluované z kolony byly analyzovány ELISA metodou používajících druhové protilátky proti skupině trichothecenů A. Tímto přístupem lze nejen identifikovat každou jedinou skupinu trichothecenů A, ale můžeme také určit jejich koncentraci. Kombinace HPLC a imunochemických metod se prokázala být velmi efektivní, citlivá a specifická pro analýzu trichothecenů a ostatních mykotoxinů. Existuje zde však jedna limitace, a ta je, že k metodě není žádný on-line imunodetektor umožňující real-time imunochemické snímání výtoku z kolony. Jak jsou frakce sbírány, rozpouštědlo se musí měnit, aby bylo kompatibilní s protilátkami a immunoassay funguje pro individuální frakci z HPLC (TSUNG-CHE T., 1995).

3.4.1.3 Legislativa pro kontrolu mikroorganismů a jejich toxických produktů

Krátce po vstupu ČR do EU došlo v kooperaci států k vytvoření legislativy, která byla snadněji aplikovatelná než ta předešlá. Došlo tedy k vydání nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických požadavcích na potraviny, které bylo po dvou letech novelizováno nařízením komise (ES) č. 1441/2007. Základním principem těchto nařízení, která zahrnují pouze ty mikroorganismy, u kterých lze deklarovat reálné nebezpečí s ohledem na jejich výskyt a rozšíření, je, že potraviny nesmí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny i metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví. Hlavní odpovědnost za dodržování tohoto nařízení leží na provozovatelích potravinářských podniků.

Metody odběru vzorku a metody analýzy pro úřední kontroly množství mykotoxinů v potravinách jsou dány nařízením 401/2006 (ES). Tento dokument také zahrnuje i opatření v případě heterogenní distribuce mykotoxinů ve vzorkovaném materiálu.

Uplatňováním potravinářských zákonů v praxi, posuzováním a sjednocováním legislativy jednotlivých evropských zemí, která se týká kontroly výskytu mykotoxinů v potravinách, se zabývá nevládní organizace FLEP (Food Law Enforcement Practitioners - Sdružení zástupců evropských inspekčních orgánů).

Kontrola mykotoxinů je ve většině evropských zemí věnována velká pozornost, přesto panují v metodice kontroly i posuzování rizika značné rozdíly. Cílem pracovní skupiny FLEP je sjednocení těchto postupů, včetně stanovení jednotných limitů.

V České republice existují jedny z nejpřísnějších norem pro stanovení přípustného obsahu mykotoxinů v potravinách a Česká zemědělská a potravinářská inspekce jejich výskyt průběžně monitoruje. Například poslední nález aflatoxinu B1 byl zjištěn v září a říjnu loňského roku v pistáciích a oříšcích, které byly okamžitě staženy z prodeje a zničeny (DEMNEROVÁ K., 2012; OLEJKOVÁ D., 2001).

4 HODNOCENÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY POTRAVIN

4.1 Objektivní přístup identifikace

Jak již bylo zmíněno v úvodu, v posledních 50 letech narůstá snaha metody co nejvíce objektivizovat, zapojit výpočetní techniku a eliminovat chyby způsobené zejména lidským faktorem. Zlatým středem stále zůstává kultivace, takové vyšetření se považuje za klasické. Má své výhody i nevýhody, o kterých bude pojednáno v podkapitole níže. Používají se však i automatizované přístroje, očkují se například i mikrotesty, zařízení je inkubuje, posléze při ukončení testy samo vyhodnotí, většinou fotometricky, a vytiskne výsledek. Výhodou takových objektivních a automatických systémů je úspora mezd, na základě vytvořených databází téměř bezchybné odečtení výsledků, identifikace bakterie zabudovaným počítačem s velkou pravděpodobností a případně i expertní interpretace z hlediska závažnosti nálezu. Většinou se dnes takovým přístrojem stanoví už i citlivost k antibiotikům. Tyto přístroje však nejsou nikterak levné (DEMNEROVÁ K., 2012; SCHINDLER J., 2008).

4.2 Elektronický nos

Přístroje vylepšují diagnostiku ve spoustě směrech. Téměř stoletou zkušenost, že některé bakterie mají typický zápach, využívají diagnostikové k takřka neomylnému posudku. Nejde tak ani o učebnicové pachy bakterií, jako je nasládlý pach *Pseudomonas aeruginosa* nebo kváskový pach *Escherichia coli*, ale o pachy málo intenzivní. Některé bakterie mají pach hub, jiné máku, naftalinu a podobně. Potíž je v tom, že práh vnímání je individuální. Snaha tyto znaky objektivizovat přinesla metoda, která je označovaná jako elektronický nos. Jedná se o systém, který napodobuje čichové ústrojí savců. Analogií čichových buněk jsou senzory z polymerních materiálů, které reagují na určité vůně, zachycují je a převádějí na elektrochemické signály. Senzory reagují s různou specifitou a citlivostí, podle toho jsou seskupeny do pole, přes něž se přehánějí vyšetřované páry. Různost odpovědi se zpracovává statisticky a každému zdroji (bakterii), se přiřadí určitý profil odpovědi sady senzorů. Největší službou elektronického nosu je identifikace bakterií přímo ze vzorku (SCHINDLER J., 2008).

4.3 Biosenzory

Biosenzor je analytický systém, který převádí biologickou odpověď na elektrický signál. Využívá kombinaci biotechnologie, technologie integrovaných obvodů a způsobu jejich výroby. Je jich celá řada a aplikují různé varianty základního principu. V diagnostice se používají DNA biosenzory sestavené do pole, které zachycuje ve vyšetřovaném vzorku malé množství cílové DNA bakterií. Je-li ve vzorku bakterie přítomna, vygeneruje se elektrický signál, který se zajímá a zpracuje.

Biosenzor, může být i mikroorganismus či celá buňka nebo její specifická část schopná se vázat na mikroorganismy určitých druhů. Součástí biosenzoru je i převaděč (transducer), který převádí událost rozpoznání do měřitelného elektrického signálu – optický, elektrochemický, termometrický, piezoelectický, magnetický a mikromechanický nebo jejich kombinace.

Pomocí biosenzorů jsou zkoumány interakce protilátka-antigen, DNA - DNA, DNA - protein, receptor - ligand, protein - ligand a mnoho dalších interagujících dvojic.

Přednostmi biosenzorů jsou vysoká citlivost a selektivita, měření bez speciálních reagentů, rychlost analýzy, nízké náklady a snadná obsluha. Analýzy probíhají v reálném čase. Častou výhodou biosenzorů je jejich malá velikost a přenositelnost, tudíž stačí relativně malé množství vzorku a potřebných chemikálií pro analýzu. Velkým problémem je sterilizace biosenzorů. Některé typy pracují jen v úzkém rozsahu koncentrace analytu, mají pomalou odezvu, jsou citlivé na elektrický šum a jejich miniaturizace může mít vliv na velikost signálu. Při použití enzymů se obvykle liší optimální provozní pH enzymu od pH prostředí (POHANKA M., 2009).

4.3.1 DNA biosenzor

Účelem technologie je najít cílový oligonukleotid hledané bakterie. Bakteriální ribozomová 16 S RNA se zachycuje na povrchu senzoru zachytnou sondou, což je právě odpovídající nukleotid. Ta (NK) je pak detekována hybridizací s detekční sondou značená navázaným barvivem – fluoresceinem - na němž je protilátka s oxidoredukčním enzymem. Činností tohoto enzymu se redukuje další složka systému – mediátor, vznikne elektrický proud, který se zesílí a zaregistruje.

Byl také vyvinut DNA mikročip pro přímou identifikaci patogenů. Čip je malý, kompaktní a všechny operace provádí v jedné komůrce. Vzorek, v němž se bakterie prokazují, se zahřeje na 90 °C a hledaná DNA se hybridizací zachytí specifickou sondou, hybridní

komplex genom-sonda se naváže na magnetická tělíska, která se poté magnetem oddělí a navázaná DNA se použije pro amplifikaci. Amplifikované úseky DNA se zachytí na elektrodách, označí zlatými nanočásticemi s galvanicky naneseným oxidem stříbra a elektrochemicky se změří množství zachyceného materiálu. Jedná se o postup komplikovanějšího rázu, je avšak dobře fungující (POHANKA M., 2009; SCHINDLER J., 2008).

4.4 Kultivační vyšetření

I přes velký rozvoj alternativních a moderních metod se stále nejvíce praktikuje kultivační vyšetření. Konvenční kultivační metody používané pro detekci mikroorganismů v potravinách jsou dobře zavedené, jednoduché, levné a mohou být použity pro kvantitativní i kvalitativní analýzu.

Cílem kvantitativních metod je stanovení počtu životaschopných buněk cílové skupiny mikroorganismů. Mezi základní techniky patří **metoda zalití**, **metoda roztěru** a metoda stanovení nejpravděpodobnějšího počtu mikroorganismů (**MPN**, Most Probable Number). Stanovení počtu některých mikroorganismů (zejména patogenů) může být rozšířeno o krok resuscitace, jehož cílem je zachycení i poškozených buněk. Kvalitativní stanovení je pak zaměřeno na průkaz přítomnosti či absence cílového mikroba ve vzorku potravin. Tento typ stanovení je časově i materiálově náročnější a obvykle probíhá v několika navazujících stupních – primární pomnožení, sekundární pomnožení, izolace a konfirmace. Růst cílového mikroorganismu se projeví vznikem kolonií s typickou morfologií. Protože jenom velmi málo používaných diferenciálních živných médií je zcela specifických, je nejen při kvalitativním stanovení nezbytné provést vhodnými metodami konfirmaci suspektních kolonií cílových mikroorganismů.

Klasickým rozbohem **CPM** (Celkový Počet Mikroorganismů) se nestanoví termofilní MO, psychrotrofní MO, striktní anaeroby, kultivačně náročné druhy a některé kvasinky a plísňe. CPM poskytuje čistě vzato jen základní informace o stupni mikrobiální kontaminace, z čehož můžeme usuzovat na způsobu zpracování, technologií a dodržování hygienických podmínek při sklizni, výrobě, přepravě a uskladnění – celkově při zacházení s potravinou. Metoda stanovení nezachycuje počet všech metabolicky aktivních buněk, ale pouze počet buněk tzv. kolonie tvořících jednotek (**CFU**). V jistém slova smyslu více selektivní metoda, také založena na počítání kolonií, je například stanovení počtu jednotek psychrotrofních mikroorganismů (bakterie, kvasinky a plísňe, které mají schopnost

růst při teplotách do 7 °C do 10 dnů (rody *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Bacillus*, aj.). Plotnovou metodou se dále stanoví i bakterie mezofilní (vytvářejí kolonie na tuhé selektivní půdě MRS o pH = 5,7 po inkubaci při 30 °C 72 hodin), jedná se zejména o bakterie rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Pediococcus*. Plotnová metoda je univerzální mikrobiologickou metodou pro stanovení mnohých čeledí, pro takový účel je pak dle konkrétní čeledi upravena. (BURDYCHOVÁ P., SLÁDKOVÁ P.; 2007).

Přednost kultivačních metod obecně spočívá v tom, že pracujeme s bakteriemi, které máme přímo před očima a v „ruce“. Izolace na půdách, které obsahují to nejlepší, co lze bakteriím nabídnout, je jednak metoda velmi citlivá a standardní a navíc víme, že živé bakterie na půdě vždy vyrostou. Pokud jde o jejich identifikace, následné testy ve zkumavkách se již neprovádějí, protože jsou příliš nákladné, vyžadují mnoho práce na přípravu, množství chemikálií a příliš místa v inkubátorech. Už mnoho let se používají diagnostické soupravy, které umožňují provádět testy miniaturizované. Výsledky testů se pak obvykle porovnávají s tabulkami znaků jednotlivých druhů.

Mezi jejich nevýhody, zejména při stanovení patogenních mikroorganismů, patří opět nezbytnost kultivace v několika různých živných médiích, detekce růstu vizuálně a potřeba provedení konfirmačních testů (biochemických a serologických). To má za následek zvýšenou pracnost, subjektivní hodnocení výsledků a zejména dlouhou dobu stanovení (SCHINDLER J., 2008).

4.4.1 Doplnující identifikační metody po kultivačním vyšetření

4.4.1.1 Identifikace pomocí biochemických testů

Kromě fyziologických vlastností mikroorganismů (pohyblivost, vztah ke kyslíku, teplotě aj.) můžeme určovat bakterie i na základě jednoduchých biochemických testů, jako doplnění k morfologickým, mikro- a makroskopickým znakům.

Spousta testů je založena na průkazu enzymů. Mikrobiální enzymy mohou být intracelulární i extracelulární. Některé komplexní látky příliš velké na to, aby mohly vstoupit do buňky, musí být předem degradovány. **Extracelulární enzymy** jsou většinou hydrolytické povahy. **Intracelulární enzymy** se účastní metabolických pochodů v buňce. Ty jsou důležité pro výrobu energie a udržení funkcí buňky.

Mezi nejpoužívanější metody, sloužící k základnímu rozlišení, patří například důkaz amyláz (průkaz hydrolýzou škrobu), důkaz proteáz (hydrolýzou kaseinu), důkaz lipáz

(hydrolyzou lipidů) či průkaz schopnosti mikroorganismů hydrolyzovat extracelulárními proteázami želatinu. Tímto se dokazují enzymy extracelulární aktivity. Intracelulární enzymatická aktivita mikroorganismů se dokazuje například schopností fermentace sacharidů, která patří mezi nejdůležitější diagnostické testy bakterií. Při fermentaci sacharidů mohou bakterie tvořit organické kyseliny (octovou, mléčnou, propionovou) nebo plyny (CO_2 , H_2) nebo obojí současně. Tvorbu kyselin můžeme pozorovat pomocí vhodného indikátoru, který je přidáván přímo do pūd (většinou fenolovou červeň, která má při neutrálním pH červenou barvu a v kyselém prostředí přechází do barvy žluté). Konkrétními testy jsou například **ONP test** (test na fermentaci laktózy), či **O-F test** (oxidačně-fermentační test). Dalším příkladem mohou dále být **IMViC** testy (indol, methylová červeň, Voges-Proskauer test, utilizace citrátu). Uvedené zkoušky jsou postaveny na kultivaci mikroorganismů, v případě hydrolyzy želatiny se může test provádět kromě toho i ve zkumavce klasickou metodou vpichu. Inkubace je tak či tak nutná.

Mikroorganismy izolované z přirozeného prostředí většinou nemají tytéž vlastnosti jako axenické sbírkové kultury, takže se v jednom či více znacích neshodují. Kromě toho i samotné vyhodnocování testů vyžaduje práci zaškoleného pracovníka s určitými zkušenostmi (BURDYCHOVÁ Š., SLÁDKOVÁ M., 2007; BURSOVÁ a kol., 2014).

4.4.1.2 Identifikace pomocí diagnostických testů

V praxi se pro práci s diagnostickými soupravami využívá i McFarlandovy zákalové stupnice. Při smíchání roztoků chloridu barnatého a kyseliny sírové vzniká ve vodě nerozpustná sraženina síranu barnatého. Tato sloučenina se stala základem pro přípravu zákalové stupnice podle které lze přibližně stanovit koncentraci bakterií v neznámé suspenzi. Srovnáním zákalu bakteriální suspenze zákalem BaSO_4 této stupnice můžeme orientačně určit počet mikroorganismů potřebných k provedení testů. McFarlandova stupnice tak nahrazuje nefelometrické nebo turbidimetrické měření mikrobiálního zákalu nebo přímé stanovení počtu buněk v jednotkovém objemu pomocí Bürkerovy či Thomovy komůrky.

Doplňkovým testem pak může být test pohyblivosti, který ověřuje přítomnost bičíků. Mikroorganismy s bičíky (*Citrobacter freundii*) jsou pohyblivé, bez bičíků nepohyblivé. Test se provádí v polotuhém médiu, ve zkumavce. Konzistence média umožní pohyb mikrobů. Naočkování se provádí vpichem do média. Jiným doplňkovým testem se zjišťuje

produkce hemolysinů – tedy hemolytická činnost bakterií. Ke zjištění hemolytické aktivity se používá krevní agar. Jako kontrolní mikroorganismus k testu je použit *Streptococcus thermophilus* (BEDNÁŘ M., 2012).

4.5 Automatizované systémy využívané při identifikaci mikroorganismů

Za posledních pár let je snad největší novinkou identifikace mikroorganismů založená na principu hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF), kdy jsou výsledky k dispozici během několika minut.

Princip systému spočívá ve schopnosti mikroorganismů metabolizovat sacharidové substráty, kdy jsou umístěné v 96-ti jamkové mikrotitrační destičce. Pokud naočkované mikroorganismy mají vybavení na přeměnu daných substrátů, dochází k uvolnění elektronů ze substrátu a probíhá oxidace. Tyto elektrony přijímá barvivo trifenyltetrazoliumchlorid (TTC), čímž se redukuje a dochází ke vzniku trifenylformazanu (TPF), reakce je i tedy doprovázena změnou barvy. Dostatečné množství buněk v jamce mikrodestičky tak zajišťuje pozorovatelnou barevnou změnu. Nejdříve se na agaru izoluje čistá kultura, poté se připraví inokulum a naočkuje se vhodná destička. Na konci inkubace je mikrodestička umístěna do mikrostanice pro analýzu, kde reader (čtečka) odečte absorbanci (k odečtům se používá dvou vlnových délek, 590 nm a 750 nm). Výsledky jsou zaznamenány a srovnány s širokou databází mikroorganismů, ve které je uloženo přes 2 000 druhů. Systémy existují buď manuální (MicroLog), poloautomatické (MicroStation) – zahrnující kromě softwaru i identifikační reader, a dokonce i plně automatické – systém OmniLog (software, inkubátor/reader).

Výhodou je rychlá a poměrně přesná identifikace mikroorganismů díky široké škále biochemických reakcí obsažených v mikrodestičce a komplexní databázi mikrobů. Nevýhodou tohoto systému je možnost identifikace pouze kultivovatelných mikroorganismů, pro vhodný výběr panelu testů se musí předem určit, o jakou skupinu mikroorganismu se jedná. Existuje i potenciální riziko křížových reakcí, u manuální verze navíc není možné měřit absorbanci (vyhodnocení je vizuální).

V nejnovějším provedení tohoto systému lze identifikovat na stejném panelu jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie zároveň, a tím odpadá před vlastní analýzou barvení dle Grama a další testování pro výběr vhodného panelu substrátů.

4.5.1 MALDI – TOF

Rychlou a velmi přesnou identifikaci a typizaci mikroorganismů poskytuje hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzáto-rem (MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Díky MALDI-TOF mohou být identifikovány bakterie a kvasinky přímo z kolonií vyrostlých na kultivačních miskách. Proces určení spočívá na analýze ribosomálních a dalších proteinů v buňce. Ribosomální proteiny představují zhruba 20 % veškerých buněčných bílkovin a asi 3 % celkové hmoty. Tyto makromolekuly jsou specifické pro jednotlivé bakteriální druhy a díky tomu mohou být považovány za vhodné biomarkery. Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá analytická technika s detekčními limity řádově až desetiny femtomolů (WIESER A., et kol; 2012).

4.6 Imunologické metody

O menším využití imunologických metod bylo již pojednáno v podkapitole 3.4.1.2.1. Imunochemické metody pro detekci mykotoxinů.

Imunologické metody jsou obecně založeny na vysoce specifické reakci mezi protilátkou a antigenem. Tvoří základ celé řady testů, které mohou být v mikrobiologii potravin použity pro detekci specifických mikroorganismů, předně pak alimentárních patogenů a také některých toxinů. Jako antigen označujeme molekulu, která je schopná vyvolat v živých organismech produkci specifických protilátek. Tuto úlohu mohou splňovat specifické části cílového mikroorganismu (např. lipopolysacharidy v buněčné stěně gramnegativních bakterií či bičíkové proteiny), nebo toxin a jiný produkt vznikající při růstu mikroorganismu. Protilátky jsou strukturou proteiny produkované bílými krvinkami (jenž jsou aktivované B-lymfocyty) živočichů po infekci cizím mikrobem nebo molekulou. V mikrobiologii potravin se používají v testech určených k detekci specifických mikroorganismů, proteinů či toxinů. U některých mikroorganismů může docházet ke zkříženým reakcím jejich somatických antigenů, a proto, i když jsou imunologické metody relativně specifické, nelze je k potvrzení přítomnosti určitého mikroorganismu použít samostatně. Z tohoto důvodu musí být výsledky imunologických testů potvrzeny opět konvenční kultivací s následnou confirmací sledovaného mikroorganismu.

Pravděpodobně nejrozšířenější metodou detekce specifických mikroorganismů v potravinách je technika **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Využití nachází

také metoda imunomagnetické separace, která umožňuje oddělení cílových mikroorganismů z homogenátů potravin či pomnožených vzorků a tím snižuje negativní vliv potravinové matrice a ostatní doprovodné mikroflóry. Běžně se používá při stanovení *E. coli* O157, kde je nejen součástí referenční kultivační metody, ale i dalších alternativních metod.

Využití imunologických metod při vyšetření potravin nese některá rizika a problémy. Jedním z nich je doprovodná mikroflóra, která může inhibovat růst sledovaného mikroorganismu nebo zkříženě reagovat s použitými protilátkami (falešně pozitivní výsledky). Řada technologických postupů při výrobě potravin může způsobit poškození mikroorganismů, které potom nejsou schopny růstu v selektivních médiích. Z tohoto důvodu je nezbytné zařazení kroku pomnožení vzorku před vlastní imunologickou detekci. Na trhu je v současné době řada testovacích souprav umožňujících detekci běžně se vyskytujících alimentárních patogenů a jejich toxinů.

4.6.1 ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ELISA, známá také jako EIA (Enzyme Immunoassay), se již celkem běžně používá pro detekci patogenních mikroorganismů. Je relativně jednoduchá, může být i poloautomatická, výsledky poskytuje poměrně rychle. Je to ale stále metoda screeningová, pozitivní výsledky musí být potvrzeny klasickým způsobem.

ELISA je založena na principu specifické vazebné reakce mezi antigenem a protilátkou. V ELISA testech se používají monoklonální nebo polyklonální protilátky. Polyklonální protilátky jsou produkovány při imunitní odpovědi hostitele na infekci organismu relativně velkou molekulou (protein, mikroorganismus), jsou produktem mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů. Monoklonální protilátky jsou produkovány jedním klonem B lymfocytů po styku s jedním konkrétním antigenem, připravují se na tkáňových kulturách. Ke značení protilátek se v ELISA metodě používá enzym, obvykle schopný katalyzovat přeměnu bezbarvého substrátu na barevný produkt (případně může dojít i ke změně barvy substrátu). Díky tomu je hodnocení testu vizuální nebo spektrofotometrické. Nejčastěji se využívá enzym alkalická fosfatasa reagující s para-nitrofenyl fosfátem nebo peroxidasa reagující s tetramethylbenzidinem. Protilátky, případně antigen, jsou v průběhu ELISA metody zakotveny na nějakém pevném nosiči, nejčastěji se jedná o mikrotitrační destičky (toto uspořádání se používá pro stanovení většího počtu vzorků) či mikrozku-

mavky, lze použít i papírové membrány nebo polystyrenové tyčinky. V mikrobiologii potravin je detekce obvykle zaměřena na průkaz antigenu (bakterie, toxin) pomocí známých protilátek. Při použití polystyrenových tyčinek (tzv. dipstick) je pevný nosič navržen tak, aby byl přenosný. Antigeny navázané na pevném nosiči (tyčince) mohou být přenášeny do různých živných médií (podpora růstu a namnožení cílových buněk), po přenesení do roztoku substrátu právě dojde k barevné reakci. K pevnému nosiči je přidán vzorek obsahující buňky mikroorganismů, které interagují s navázanou protilátkou. Po odstranění nenavázaných složek následuje aplikace druhé protilátky, která je značená enzymem. Finální detekce se uskutečňuje enzymaticky, kdy je bezbarvý substrát přeměněn na barevný produkt. Kvantifikace se tak dá provést měřením intenzity zabarvení (KLOUDA P., 2016).

Jak jsem již výše zmínila, v mikrobiologii potravin má ELISA širší uplatnění, běžně se používá na detekci mikroorganismů a toxinů jako jsou: *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli O157:H7*, *Campylobacter spp.*, stafylokokové enterotoxiny, diarhogenní enterotoxiny *B. cereus*, Shigatoxiny a neurotoxiny *C. botulinum*. Nejčastěji jsou to soupravy na bázi „sandwich“ ELISA využívající jako pevný nosič mikrotitrační destičky. K vizuálnímu hodnocení je k dispozici barevná šablona nebo čtecí zařízení mikrotitračních destiček. Promývací kroky lze provádět ručně nebo automaticky. Na trhu jsou v dnešní době dostupné i zcela automatizované systémy vyžadující minimum ruční práce.

Při stanovení patogenů v potravinách je obecně požadavkem detekce 1 buňky ve 25 g (ml) potravin, u ELISA testu je to 105 buněk v ml, z tohoto důvodu je nezbytné před vlastním ELISA testem provést předmnožení vzorku ve vhodném živném médiu. Současně krok pomnožení umožňuje resuscitaci poškozených buněk, například tepelným šokem, příliš nízkým pH, aj. Možností zvýšení citlivosti metody je již zmíněné využití imunomagnetické separace. ELISA metody mají dostatečnou specifitu (díky používaným protilátkám, které vykazují nízkou úroveň zkřížených reakcí s jinými mikroorganismy). U některých typů potravin může docházet k nespecifickým reakcím, tomu lze vyhnout jejich vhodnou úpravou před vlastním stanovením.

ELISA umožňuje práci s vysoce sofistikovaným zařízením. Na druhou stranu se jedná o screeningovou metodu, takže pozitivní výsledky musí být vždy potvrzeny klasickou metodou. Náklady na provedení ELISA metody jsou nepochybně vyšší než u ekvivalentního konvenčního testu, na druhou stranu je ale vyvažují poskytované výhody (např. nižší požadavky na pracovní sílu či rychlejší uvolňování výrobků s negativním

průkazem sledovaného mikroorganismu či toxinu). Na metodě je nicméně stále co zlepšovat a aplikovat ji tak do ostatních směrů použití. Aplikace imunoanalýzy výrazně přispívá ke kontrole kvality a bezpečnosti potravin (KARAMONOVÁ L. a kol., 2003; SAMARAJEEVA U., 1991).

4.7 Metody molekulární biologie

Klasické kultivační metody ale nepostačí, pokud jsou bakterie sice živé, ale nelze je kultivovat. Pak přicházejí ke slovu molekulární metody. A nejen tehdy, o dalších nesporných výhodách bude pojednáno v průběhu kapitoly.

V dnešní době je pro rodovou a druhovou identifikaci bakterií k dispozici celá řada molekulárně biologických metod. Tyto metody jsou založené na principu řetězové polymerázové reakce (PCR) a znalosti genomu detekovaného mikroorganismu. GI bakterií se nachází převážně v nukleoidu, úseky DNA představují informaci o složení bílkoviny nebo RNA, či mají regulační funkci a jsou označovány jako geny. Bakterie mohou obsahovat i extrachromozomální DNA, a to ve formě plazmidů. Buňky plísni pak mají místo úložiště své GI – jádro – odděleno od cytoplazmy dvojitou jadernou membránou (KALHOTKA L., TESAŘOVÁ M.; 2014).

Ke konci 20. století se začaly velmi rychle rozvíjet také **genotypové metody**. Ty se zaměřují na studium rozdílností (polymorfizmů) v primární struktuře nukleových kyselin – DNA, RNA. Genotypové metody jsou zaměřeny buďto na celkovou DNA, na určitý úsek DNA či RNA nebo na analýzu plazmidové DNA. Mohou být založeny na štěpení DNA restrikcí endonukleasami s následnou amplifikací získaných fragmentů pomocí PCR (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), na amplifikaci úseků ohraničených repetitivními sekvencemi (REP-PCR, ERIC-PCR) i na amplifikaci fragmentů náhodnými primery (RAPD).

Poskytují vysoce objektivní, přesné a reprodukovatelné výsledky a umožňují také identifikovat nekultivovatelné mikroorganismy. Dále eliminují speciální růstové požadavky a zkracují čas potřebný ke správné identifikaci. Tyto techniky významně zhodnotily kvalitu identifikace mikroorganismů (DEMNEROVÁ K., 2012).

U některých metod je potřeba velkého množství DNA či RNA ve vzorku, neboť nedochází k amplifikaci (namnožení) cílových nukleových kyselin. Mezi tyto klasické metody řadíme např. **Southern blotting** a **Northern blotting**. Oproti tomu amplifikační me-

tody (založené na polymerázové řetězové reakci) se vyznačují vysokou sensitivitou a specifitou a jsou dobře funkční i při nižším množství cílových NK v analyzovaném vzorku. Samotná příprava vzorku pro možnost použití PCR metody zahrnuje vždy několik základních kroků, jako například izolace nukleové kyseliny, detekce a kvantifikace izolovaných nukleových kyselin, samotná PCR, stanovení sekvence a použití bioinformatiky (ERCOLINI D. a kol., 2004).

4.7.1 Izolace nukleové kyseliny prokaryot

Obecný postup získání nukleových kyselin zahrnuje narušení buněčných membrán a uvolnění buněčného obsahu, oddělení nukleové kyseliny a v případě izolace DNA také odstranění RNA. Počátečním krokem v provedení genotypových metod je extrakce nukleové kyseliny a její oddělení od ostatních složek buňky. K narušení buněčné stěny se využívají detergenty iontové povahy (např. soli žlučových kyselin či dodecylsulfát sodný – SDS), neionogenní detergenty (např. Triton X100), nebo fyzikálně - chemické postupy (např. ultrazvuková lázeň). K oddělení nukleové kyseliny z roztoku buněčného obsahu se používá denaturace působením tepla, srážení organickými rozpouštědly, fenol-chloroformová extrakce, vysolování, chelatační iontoměničové pryskyřice, silikátové kolony nebo paramagnetické nosiče. Molekuly RNA je možné degradovat enzymem ribonukleasou, proteiny např. enzymem proteinasou. Novější postupy izolací využívají fakt, že DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adheruje na silikátový povrch. K roztoku obsahujícímu lyzované buňky se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. Po odstranění roztoku zůstává na částicích adherovaná přečištěná DNA. Tu lze pak z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění či sedimentaci zůstanou na dně mikroskopické kavy pouze silikátové částice, nad nimi je čistý roztok DNA.

Výhodou metod založených na přichycení na silikát je rychlost a také pohodlnost. Z tohoto důvodu jsou na nich založeny i komerční soupravy – kity – pro rutinní extrakce DNA. Kity bývají vytvořeny na určitý typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Kity často využívají speciální pryskyřice, namísto silikátů. Mají různě upravené složení pufrů, mohou tak například preferovat adsorpci molekuly DNA určité velikosti (BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P.; 2007).

4.7.2 Detekce a kvantifikace nukleových kyselin

Máme-li purifikovanou DNA dostatečně čistou, tj. zbavenou ostatních látek, které absorbují ultrafialové záření (např. RNA, volných nukleotidů, proteinů), lze určit její koncentraci spektrofotometrickým měřením absorpance roztoku, a to konkrétně při vlnové délce 260 nm. Tento způsob byl také použit v rámci praktické části diplomové práce. Míra specifické absorpce za těchto podmínek odpovídá koncentraci nukleových kyselin v roztoku. Protože UV záření absorbují DNA i RNA téměř shodně, je podmínkou stanovení koncentrace jedné z NK to, že z roztoku odstraníme druhou složku.

Jelikož jsou ale nukleové kyseliny izolovány z buněk, jsou jejich roztoky často kontaminovány také bílkovinami. Ty obsahují aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin, které rovněž specificky absorbují UV záření. Protože se intenzita absorpce UV záření nukleovými kyselinami a bílkovinami při různých vlnových délkách liší, čistotu vzorku lze posoudit z poměru absorbancí při 230 nm, 260 nm a 280 nm.

Čistota DNA je tedy nejčastěji odhadována na základě poměru absorbancí při různých vlnových délkách:

- pro čistotu DNA platí poměr $A_{260}/A_{280} = 1,80$ a $A_{260}/A_{230} > 2,00$;
- pro čistou RNA platí poměr $A_{260}/A_{280} = 2,00$

Parametr A_{260}/A_{280} je nejdůležitější a v běžné praxi nejčastěji používaný. Pro DNA platí, že pokud je hodnota nižší než 1,80, pak je vzorek DNA kontaminován proteiny, je-li vyšší je kontaminací RNA. Pokles hodnoty A_{260}/A_{280} pod hodnotu 2,00 značí přítomnost zbytků chaotropních činidel používaných při izolaci DNA.

Pro kvantifikaci jednovláknové DNA, např. oligonukleotidových primerů se rovněž používá spektrofotometrický přístup. Absorbance 1 roztoku jednovláknové DNA při vlnové délce 260 nm je v tomto případě ekvivalentní koncentraci 30 mikrogramů na ml. Analogický přístup je vhodný i pro kvantifikaci jednovláknové RNA. Absorbance 1 při stejné vlnové délce odpovídá koncentraci RNA 40 mikrogramů/ml (ŠMARDA J. a kol., 2008).

Další možností je stanovení pomocí fluorimetrie, kdy se využívá barviv typu ethidium bromidu, jenž umožňují interkalaci mezi báze nukleových kyselin a následnou detekci v červeno-oranžové (590 nm) části spektra po ozáření ultrafialovým světlem (BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007).

Od koncentrace purifikované nukleové kyseliny se mohou odvíjet i další kroky, jako je nastavení teplotních parametrů PCR metody.

4.7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí této techniky, jež je základem většiny molekulárně – biologických metod, může být za podmínek *in vitro* rychle a velmi selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v DNA.

4.7.3.1. Základní princip

Principem PCR je opakované kopírování (amplifikace) templátové (vzorové) molekuly DNA pomocí enzymu DNA-polymerázy. Syntéza DNA je řízena dvěma krátkými oligonukleotidy (primery), které se komplementárně párují s templátovou DNA na počátku a na konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. V průběhu polymerázové řetězové reakce se opakovaně střídají 3 kroky. Prvním krokem je **denaturace**, kdy obvykle při 95 °C dojde k uvolnění vodíkových můstků a z dvouřetězcové DNA (dsDNA) vzniknou dvě jednořetězcové DNA (ssDNA). Následuje **annealing** – nasedání (hybridizace) primerů k templátové ssDNA. Tím dojde k ohraničení cílové sekvence, která bude amplifikována. Tento krok probíhá při teplotě 50 až 65 °C. Ta závisí na bodu tání primerů (T_m), jejich délce a nukleotidové sekvenci. Poté následuje poslední krok, syntéza nového vlákna DNA (vznik dsDNA), tzv. **elongace**. Probíhá obvykle při teplotě 72 °C a kromě DNA-polymerasy jsou nutné všechny čtyři 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTPs). Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat vždy konkrétně na daný materiál. Tyto kroky se 25 až 35× cyklicky opakují. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA. Nově vytvořená DNA se v dalším cyklu stává matricí (templátovou DNA). Celý proces amplifikace probíhá v přístroji termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Aby byl zabezpečen správný průběh PCR, je potřeba připravit reakční směs (master mix) obsahující templátovou DNA, primery, dNTPs, reakční pufr, hořčnaté kationty, PCR H₂O a DNA-polymerasu (nejčastěji se používá termostabilní Taq polymerasa izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*). Výsledným produktem polymerázové řetězové reakce jsou amplikony, úseky DNA s definovanou délkou, o velikosti obvykle desítky až tisíce párů bazí (bp). Koncentrace a množství jednotlivých komponent reakční směsi hraje rozhodující roli při tvorbě PCR produktu a stanovuje se empiricky.

Správný průběh reakce se sleduje systémem kontrol. Ty nám mohou indikovat např. kontaminaci PCR komponent (negativní kontrola) nebo funkčnost všech složek reakce

(pozitivní kontrola). Pro rutinní provádění polymerázové řetězové reakce jsou dostupné komerčně předpřipravené PCR master mixy (např. od firmy Top-Bio, s.r.o. či Qiagen, GmbH) obsahující DNA polymerasu, reakční pufr, MgCl₂, barvivo a aditiva potřebná pro detekci ampliconů agarózovou gelovou elektroforézou (ŠMARDA a kol., 2008).

4.7.3.2 Detekce PCR produktů

K analýze produktů polymerázové řetězové reakce mohou být použity různé metody - např. hybridizace, ELISA nebo sekvenční analýza. Nejpoužívanější a levnou metodou je však separace gelovou elektroforézou (ELFO). PCR produkty migrují agarózovým gelem, ten vytváří molekulové síto. Na základě jejich záporného náboje se pohybují od katódy ke kladně nabitě anodě. Elektroforetickou pohyblivost ovlivňují i další. Rychlost pohybu molekul DNA je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Při elektroforéze je možné přímo sledovat polohu jednotlivých fragmentů a tím stanovit jejich velikost. Základní silou, která definuje pohyb DNA je skutečnost, že součástí struktury DNA jsou zbytky kyseliny fosforečné, které dávají molekulě DNA celkový záporný náboj. Elektroforetická pohyblivost DNA je ovlivněna mimo výše uvedené i koncentrací agarózového gelu. Čím vyšší je jeho koncentrace, tím hustší je síť, kterou musí fragmenty DNA procházet. Existují různé komerčně dostupné druhy agaróz, ale obecně platí, že na běžném agarózovém gelu (používají se koncentrace 0,6 % až 3,0 %) lze úspěšně rozdělit fragmenty o velikostech 100 bp až 20 000 bp.

Amplicony jsou obarveny např. ethidium bromidem, méně rizikovou variantou je barvení PCR produktů pomocí látky Midori Green, která emituje zelenou fluorescenci. Podle velikosti amplifikovaného fragmentu, určené porovnáním s markerem, tj. velikostním standardem obsahujícím různě dlouhé fragmenty DNA, usuzujeme na přítomnosti specifického genu ve vzorku (BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P.; 2007; KLOUDA P., 2016).

4.7.3.3 Real-time PCR (qPCR)

Dnes velmi využívaným typem polymerázové řetězové reakce je real-time PCR (qPCR), která umožňuje přímou detekci a kvantifikaci PCR produktu „v reálném čase“ (v průběhu celé PCR reakce), nikoliv až po jeho skončení a byla také použita v rámci praktické části této práce. Při stanovení PCR produktů se využívá sledování fluorescenčního signálu. Jeho intenzita je permanentně snímána a analyzována speciálním přístrojem, ve kterém zároveň probíhá PCR. Tím je tato technika zjednodušena a urychlena. Využívá

se také pro studium exprese genů (zejména studium transkripce – zda je a v jaké míře daný gen přepisován z DNA do mRNA). Předností metody qPCR je zejména rychlost bez nutnosti detekce PCR produktu (výsledek do několika hodin), jednoduchost provedení, přesnost a citlivost. K detekci vznikajícího PCR produktu lze využít fluorescenční barviva, fluorescenčně značené hybridizační sondy nebo fluorescenčně značené primery. V prvním případě se používají barviva (např. SYBR Green I), která fluoreskují po vazbě na dsDNA. Fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu. Druhý způsob detekce ampliconů je prostřednictvím fluorescenčně značených hybridizačních sond (krátké oligonukleotidy), které se komplementárně vážou na vnitřní část amplifikované sekvence. Cyklus, ve kterém je již PCR produkt detekovatelný se nazývá jako prahový cyklus C_T (threshold cycle). A právě tato kvantifikace může být prováděna metodou qPCR, která zaznamenává vznik ampliconů v průběhu celé reakce (DEMNE-ROVÁ K., 2012).

4.7.3.4 Aplikace PCR metody v rostlinné patologii, detekce a diagnóza patogenů

Dostupnost nukleotidových sekvencí mnoha rostlinných patogenů umožnila rozvoj PCR metody pro detekci a diagnóza mnohých viroidů, virů a ostatních patogenů. Protože je vysoce citlivá, poskytuje PCR dobrou alternativu ostatním diagnostickým metodám a může zrychlit diagnózu, redukuje požadovanou velikost vzorku a často eliminuje nutnost radioaktivních prób. Detekce bakterií a plísní pomocí PCR měla velký dopad na diagnostickou praxi, epidemiologické studie. V r. 1990 se objevila zpráva o detekci viroidů v kutikule jablka z kompletního extraktu nukleových kyselin pomocí RT-PCR amplifikace. Ve stejném roce byla RT-PCR technika úspěšně použita pro detekci RNA rostlinných virů a virálních RNA satelitů z infikované tkáně.

Kombinace PCR amplifikace sekvence 16 S rRNA genu s RFLP analýzou amplifikovaného produktu byla poprvé použita už po roce 1990. Díky Amplifikaci houbové DNA sekvence pomocí PCR se lze vyhnout potřebě kultivovat houby za účelem identifikovat, detekovat či klasifikovat druh a izolát.

Amplifikace následovaná klonováním specifické DNA sekvence byla úspěšně použita pro konstrukci DNA prób použitelných k identifikaci a diferenciaci například Pseudomonád, Corynebakterií aj. již v osmdesátých letech 20. stol. (HADIDI A. et kol.; 1995).

Dnes se již používají miniaturizované a automatické PCR systémy, které mohou konstantně pracovat od extrakce vzorku až po real – time PCR (HIGGINS a kol., 2003; LEE a kol., 2006)

4.7.4 Stanovení sekvence DNA

Cílem je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Metody, které umožňují rychle a spolehlivě stanovit sekvenci nukleotidů hrají klíčovou roli v analýze genomů a umožňují lépe porozumět molekulární podstatě základních biologických procesů.

V současné době jsou k sekvenování DNA používány dvě odlišné metody s různými obměnami. První je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin a je proto označována jako chemická metoda nebo též dle jmen autorů jako **Maxamovo-Gilbertovo sekvenování**. Druhá metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA a je označována jako enzymová metoda nebo též podle jména autora **Sangerovo sekvenování**. (ŠMARDA J. a kol.; 2008).

I když se obě metody diametrálně liší, je v obou případech základním požadavkem pro zahájení sekvenování příprava molekul DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji používaným výchozím materiálem jsou proto restriční fragmenty, naklonované ve vhodném klonovacím vektoru, nebo fragmenty získané PCR. Dalším společným rysem obou metod je rovněž splnění několika technologických požadavků;

- definování jednoho z konců fragmentu DNA, u něhož sekvenci stanovujeme,
- vytvoření souboru jednořetězcových molekul DNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jedinou bázi,
- rozdělení tohoto souboru fragmentů elektroforézou s takovou rozlišovací schopností, která umožňuje navzájem oddělit řetězce DNA lišící se svou délkou o jedinou bázi.

Poslední fáze spočívá ve vyhodnocení získaných sekvencí s využitím počítačů a speciálních programů, o čemž bude pojednáno v další kapitole.

Významného pokroku ve stanovování sekvencí DNA enzymovou metodou bylo dosaženo po zavedení přístrojů pro automatické sekvenování DNA. Při něm se pro separaci reakčních produktů, detekci, shromáždění dat z reakce a analýzu pořadí bází používají plně automatizované aparatury. Tento přístup umožňuje stanovit a následně i zpracovat sekvence DNA mnohem rychleji než při standardních postupech.

V poslední době se do popředí dostává také pyrosekvenování a další metody, jež slibují zrychlení i zlevnění celého procesu. Získaná data poskytují velkou variabilitu výběru porovnávaných vlastností. Nicméně je tato metoda a především pak nové rychlé variace velmi drahá a tudíž nevhodná k rutinní typizaci bakterií. Do budoucna však metody celogenomové sekvenace budou představovat jedinou možnost, jak v krátkém čase zjistit o daném patogenu co nejvíce informací a tím zrychlit diagnostiku a typizaci při šetření hromadných výskytů (BURSOVÁ Š. a kol., 2014; CANTOR R.C., SMITH C.L., 1999; RACLAVSKÝ V., 2003).

Maximální diskriminační schopnost pak poskytuje celogenomové sekvenování. Tyto metody umožňují získání detailních informací o genetické stavbě bakterií, odpadá při tom tedy vybírání nejvhodnějších cílů analýz. Za účelem získat kompletní genomovou sekвени je nezbytné provést sekvenaci mnoho více párů bází, než jaká je totální délka genu. Proto existují hned dva důvody; jedna jsou DNA fragmenty sekvenovány náhodně, takže musí být mnoho fragmentů sekvenováno, abychom se ujistili, že všechny oblasti genu byly sekvenovány nejméně jednou. Druhým důvodem je determinace správného pořadí, ve kterém překrývající se sekvence musí být uspořádány tak, aby postupně shromáždily celý genom (CRAIG L. N. a kol., 2014).

4.7.4.1 Vyhledávání funkčních oblastí

Důležitou otázkou zůstává, jak lze detekovat kódující oblasti. Mezi klíčové prvky, které jsou vyhledávány počítačovými metodami, patří iniciační a terminační kodony, místa sestřihu, promotory a terminátory transkripce, polyadenylační místa, vazebná místa pro ribozómy (RBS), vazebná místa pro topoizomerázy typu II, místa štěpení pro topoizomerázy typu I a vazebná místa pro transkripční faktory. Takováto místa se nazývají signály. Vedle toho existují metody pro vyhledávání delších úseků genu s variabilní délkou jako např. exony, introny, repetice nebo geny pro funkční RNA, které tvoří obsahovou složku genu.

Predikce kódujících oblastí se liší podle druhu mikroorganismů. U prokaryot je možné lokalizovat většinu genů jednoduchým hledáním otevřených čtecích rámců doplněným např. hledáním signálů pro vazebná místa ribozómu. U eukaryot jsou používány pro rozlišení kódujících oblastí genu od nekódujících statistické modely frekvencí nukleotidů a závislostí přítomných ve struktuře kodonů (ŠMARDA J. a kol.; 2008).

Znalosti získané z vytváření bilionů DNA barkódů pro DNA-enkódované chemické databáze mohou poskytnout mnohem hodnotnější zkušenost pro dekodování obecně. Mimo jiné nám to umožní pracovat s informacemi efektivněji a informace mohou být psány a čteny s vysokou přesností (GOODNOW R. A., Jr., 2014).

Většina detekčních metod houbových patogenů založená na detekci DNA počítá s všudypřítomnými geny nebo distančními nukleotidy jako jsou **ITS – intergenic transcribed spacers**. S tím, jak je více genomů sekvencováno, volba nových genů se stává jednodušší. Je důležité mít dostatek polymorfizmu ve vybraných genech, aby došlo k zamezení křížové reakce a falešnému pozitivizmu – čím více polymorfizmu, tím lépe. Přítomnost inzertů nebo delecí vysoce napomáhá vytvoření specifických PCR primerů nebo hybridizacím oligonukleotidům. Je také velmi důležité mít sekvence těch úzce souvisejících druhů pro vytvoření vysoce specifického testu.

4.4 Bioinformatika

Jedná se o novou disciplínu na rozhraní počítačových věd, informačních technologií, matematiky a biologie a zahrnuje studium na praktické uchovávání, vyhledávání, zobrazování, manipulaci a modelování biologických dat. Vývoj vysoce výkonných technologií jako je např. automatické sekvenování, MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a NMR spektroskopie či proteinová krystalografie, umožňujících získání molekulárně biologických dat přispěl k jejich dramatickému nárůstu a tím současně zvýšil náročnost jejich zkoumání a hodnocení ve vztahu k biologickým otázkám.

4.4.1 Vyhledávání podobností sekvencí

Abychom stanovili podobnost v sekvencích nukleotidů v NK a aminokyselinách, použijeme proto nástroje pro seřazení („alignment“) těchto sekvencí. Po sekvenování nových genů je třeba určit, zda-li je nalezená sekvence podobná nebo shodná s již známou a vyskytuje se v současných databázích. Rovněž při sestavování sekvencí rozpracovaných genomů do ucelených „kontingů“, a v konečné fázi celých genomů, se využívá hledání shodných, překrývajících se úseků náhodných fragmentů sekvencí nukleových kyselin. Nejčastěji používané algoritmy pro případy takového seřazení sekvencí jsou velmi rychlé algoritmy programů BLAST nebo FASTA, které hledají úseky sekvencí vykazujících nejvyšší stupeň podobnosti. K posouzení významnosti shody nalezených úseků se používá numerická hodnota označovaná jako „skóre seřazení sekvencí“ (S), která popisuje

celkovou kvalitu seřazení sekvencí na základě porovnání pravděpodobnosti výskytu nalezených segmentů o určité sekvenční podobnosti s pravděpodobností, že se taková podobnost vyskytne mezi dvěma náhodnými sekvencemi. Pokud je toto číslo vyšší, znamená to i vyšší podobnost. Jak sada programů BLAST, tak FASTA umožňují i další možnosti srovnání nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí s údaji v databázích včetně porovnání translačních produktů všech čtecích rámců dotazované sekvence nebo celé databáze (ŠMARDA J. a kol., 2008).

5. ZPRACOVÁNÍ PAPRIKY A PEPŘE, MOŽNÉ VSTUPY MIKRO-ORGANISMŮ DO ŘETĚZCE

5.1 O Koření obecně

Pod pojem kořením rozumíme části rostlin jako kořeny, oddenky, kůra, listy, nať, květy, plody, semena, nebo jejich části, v nezbytné míře technologicky zpracované a užívané k ovlivnění chutě a vůně potravin. Koření se získává z různých druhů rostlin, z nichž většina má blahodárné účinky na lidský organismus a tak i koření může ovlivnit naše zdraví. Některé druhy koření obsahují látky s antimikrobiálními vlastnostmi - esenciální oleje - a další aktivní látky obsažené v koření napomáhají kontrolovat mikrobiální činnost. Jsou to především silice - působí hlavně na kvasinky a plísně, méně na bakterie. Vzhledem k menšímu množství koření užívaného k výrobě potravin není úplně možné, aby se projevily jejich antimikrobiální vlastnosti, do jisté míry se však mohou projevit při skladování většího množství koření.

Voňavé lodyhy, semena, květy, kořeny i další části rostlin se začaly v jídelníčku našich prapředků objevovat poměrně brzy. Objevy z pravěkých sídlištních vrstev dokládají, že se už v těchto dobách používal kmín, planá majoránka, ale i máta a petrželka. Obliba koření narůstala i ve starověku, nezmizela ani ve středověku a dnes můžeme s jistotou říci, že si bez něj neumíme přípravu jídel už ani představit (HNILICOVÁ J., 2009; PETER, 2004).

5.2 Paprika (*Capsicum*)

Archeologické nálezy potvrdily, že domovem paprik byla Jižní Amerika, kde se konzumovaly již v letech 7 500 př. n.l. Považují se za první zdomácnělou zeleninu v Americe. *Chilli*, *Capsicum frutescens* a *C. annum*, jsou pěstovány v Jižní Americe po posledních 5000 let. Poté Columbus rozšířil plody po celé Evropě a do každé části španělských a portugalských kolonií – západní Afriky, Indie, nejjižnější Asie, Indonésie, Filipín. Italové je dále prodávali Turkům, Turkové je rozšířili po celém Balkáně a z Persie se dostaly do severní Indie a Kašmíru. Chilli je přidáváno jako velmi výrazné koření a levná zelenina do celosvětového jídelníčku. Chilli má rádo teplo a pěstuje se velmi dobře v nadmořských

výškách okolo 2000 m. Obrovský počet různých druhů chilli je způsoben částečně stabilními hybridy produkovanými cizosprašnostmi a částečně kultivací. Čím menší chilli je a má tenčí dužinu, tím více je protáhnutý tvar do konce a chilli tím bude pálivější. Barva není žádný ukazatel, je-li chilli nezralé, zelené, červené nebo žluté či zralé do fialova, ovlivní to sice chuť, ale ne pálivost (NORMANN J., 1989; PAZDERA I., 2007).

Mletá kořeninová paprika jsou pak usušené a jemně umleté sladké lusky papriky roční. Její barva přechází podle druhu (paprika lahůdková, sladká nebo gulášová) od ohnivě červené, sytě červené až po hnědočervenou. Ani vůně a chuť tohoto oblíbeného koření nejsou vždy stejné. Objevují se v celé škále od intenzivní aromatické až po nevýrazně kořenou, chuť pak od sladké, nepatrně nahořklé či pálivé až po mírně pálivou (SMĚLÁ D., 2015).

Dělí se také na odrůdy zeleninové a kořeninové – ty jsou náročnější na pěstování. V případě kořeninové papriky se plody suší na vzduchu, pak se v sušárnách dosušejí a zpracovávají se na moučku. Takto zpracovaná paprika má různé typy chutí i barev, od oranžové po tmavě červenou (DIENSTBIER, VLČKOVÁ, 1998).

Zdrojem palčivosti pálivých paprik se stávají semena a přepážky lusku, zatímco dužnina dává každé odrůdě charakteristickou chuť a je to způsobeno pálivými složkami tvořenými především kapsaicinoidy. Barva zralých lusků může kolísat od tmavě až načernalé červené přes oranžově žlutou do žlutozelené stejně jako jejich velikost (10-120 mm, příčný průměr 4-50 mm). V mleté podobě jde o prášek velmi kolísavé barvy, od tmavě červené, přes oranžově žlutou do světle zelené (SMĚLÁ D., 2015).

Pokud jde o chemické složení, paprika má jen velmi málo esenciálních olejů. Oleoresiny jsou tmavě červené. Jejich barva je dána obsahem karotenoidů, jenž se pohybuje od 0.3–0.8% v plodu a sestávají se z 35–60% capsanthinu, 18% capsorbinu, 8–23% α a β karotenu, 8–10% zeaxanthinu, 3–5% cryptoxanthinu a 8–10% luteinu. Paprika obsahuje dále vitamin A, vitamin C, niacin a draslík, hořčík, sodík, fosfor a vápník (RAGHAVAN S., 2000).

Z rostlin papriky (konkrétně druhy *Capsicum fastigiatum* a *Capsicum frutescens*) se také získává chilli neboli kayenský pepř. Má světlejší barvu (žlutou až světle oranžovou) než klasická paprika a o mnoho ostřejší chuť (DIENSTBIER, VLČKOVÁ, 1998).

Nově zájem o papriky vzrostl nedávno i z toho důvodu, že se výtažky z nich mohou použít v kombinaci s další látkou i jako selektivní anestetikum. V oblasti konzumace i v oblasti lékařské vědy je rozhodující, jak velký obsah pálivých látek (kapsaicinoidů,

nejdůležitějším je kapsacin) papričky obsahují. Pálivost u chilli se měří ve Scovillových jednotkách, kde 1500 jednotek SHU odpovídá obsahu kapsaicinu 0,01%. Do rodu paprika (*Capsicum*) se zařazuje celkem 25 druhů a na světě se pěstuje přibližně kolem 3000 odrůd. V papričce Bhut Jolokia se v opakovaných testech naměřilo přes milion **SHU jednotek** – „Scoville heat units“.

Existuje ještě další parametr, podle něhož lze usuzovat na kvalitě papriky. Týká se barvy a je jím stupnice barvivosti podle **ASTA** (American Spice Trade Association - Americká asociace obchodu s kořením). Číslo ASTA vyjadřuje tzv. extraktivní barvivosť, tedy kolik barviva se z papriky uvolní do oleje. Výsledky se vyjadřují na škále od 30 do 180. Platí, že čím je číslo vyšší, tím jsou barvicí schopnosti koření lepší a spolu s tím stoupá i jeho cena. Tento parametr má význam pro papriku lahůdkovou a sladkou. Údaj ASTA nepatří mezi povinné informace na obalech (PAZDERA J., 2007).

5.2.1 Zpracování

Plody paprik se sklízí ručně. Plody jsou omyty, vizuálně kontrolovány a rozděleny podle barvy a velikosti. Poté jsou odstraněny stonkové části, jádro plodu, semena a ostatní nechtěné části. Dále se přidávají siričitaný pomocí spreje, slouží ke konzervaci a eliminaci mikrobiální kontaminace. Mimo jiné zabraňují i ztrátě barvy. Původní úprava plodů bylo sušení na slunci, dodnes se ještě na některých místech praktikuje. Takovým sušením se vlhkost sníží až na 10 %.

Pomocí novějších metod se dosahuje vlhkosti 5 %. V současné době bylo sušení na vzduchu nahrazeno sušením mrazem nebo v horkovzdušných sušárnách. Papriky se nejčastěji suší v horkovzdušných sušárnách. Pokud jsou plody větší či dužnatější, je možné je nakrájet na plátky. Některé papriky jsou však sušeny vcelku i se semeny. Počáteční teplota sušení by měla být okolo 80 °C, preferovanější je mezi 70–60 °C, při této teplotě vykazuje koření nejlepší zachování barvy. Čím je sušení kratší, tím si výsledný produkt zachovává lepší chuť a barvu.

Z moderních metod bych ještě zmínila použití kryogenních podmínek, kterých se využívá při mletí. Mletí zahrnuje mlýny založené na principech fyzikálních procesů. Moderní mlýny na koření jsou schopné zvládnout velké objemy, bylo u nich optimalizováno dodávání materiálu a zároveň snížena produkce prachu. Pro mleté vzorky je důležité zvolit správný typ balení, aby byla zachována jeho kvalita a funkční vlastnosti během skladování (polyethylenové sáčky). Musí být zabráněno negativním efektům při absorpci

vlhkosti, světelných efektů, oxidaci na vzduchu a vlivům teplot (PRAKASH V., EIPE-SON W.E., 2003).

Vůně celých lusků i mletých forem musí být silná, s výrazně palčivým podtónem, dráždicím nos, chuť pak zvláště ostře pálivá. Sušenou papriku je nutné uchovávat v dobře uzavřených nádobách na suchém, chladném a tmavém místě. Jen to zaručí stálost její vůně i chuti. Příliš dlouhým skladováním (po 6-10 měsících) ovšem mletá paprika rychle ztrácí svou chuť i vůni, hnědne a získává zatuchlou příchut'. Proto se nevyplatí nakupovat větší množství do zásoby. Známkou čerstvosti plodů je pružnost, větší lusky si ji zachovávají déle než menší. Někdy mohou být zaprášené, což ale není způsobeno jejich stářím, ale prašným prostředím balírny. (SMĚLÁ D., 2015)

5.3 Pepř (*Piper sp.*)

Pepř černý (*Piper nigrum*) je z tropické rodiny trvalek, které pochází z východního pobřeží Indie. V Indii se také dodnes pěstuje. Už za starověkého Říma se rozšířil po celé Evropě. Další hlavní pěstitelské oblasti jsou Indonésie, Srí Lanka, Thajsko aj. Jedná se o popínavý keř s 6-7 m dlouhými větvemi. Koření se vyrábí z nevyzrálých plodů, které začínají červenat. Suší se vcelku i s dužinou a k urychlení se mohou ponořit do horké vody nebo se spaří. Kromě černého pepře je znám také zelený a bílý. (DIENTSBIER, VLČKOVÁ, 1998; NORMANN J., 1989).

Pepř má obvykle bezbarvé či světle zelené esenciální oleje. Černý pepř obecně obsahuje 1–2.6% esenciálního oleje, maximálně až 5%, bílý pepř méně než 1.0%. Skládá se primárně z monoterpenů (80%), jako je sabinen, α -pinen, β -pinen, limonen a 1,8-cineol, všechny tyto složky jsou zodpovědné za jeho typické aroma. Během skladování ztrácí černý pepř spoustu monoterpenů. Sesquiterpeny tvoří dalších 20% (beta-caryophyllen, humulen). Hořkost a aroma v černém a bílém pepři je primárně dána obsahem netěkavých alkaloidů, piperinu a chavicinu. Odlišné poměry těchto složek dávají za vznik právě odlišným aroma. Množství piperinu je okolo 98 % ze všech alkaloidů v obou druzích pepře, ostatní tvoří piperitin a piperylin (RAGHAVAN S., 2000).

5.3.1 Zpracování

Černý pepř se sklízí těsně před dosažení zralosti. Nejčastěji, když první kulička v hroznu začne červenat. Poté se nechají jeden den při pokojové teplotě, aby proběhla fermentace

podobně jako u čaje, kávy, nebo kakaových bobů. Fermentace je oxidace tříslovin a dalších látek v obalu plodu a zapříčiní zčernání povrchu pepře. Druhý den začíná sušení na slunci a závěrečné čištění a zbavení nežádoucích příměsí. Suší se vcelku i s dužinou a k urychlení se mohou ponořit do horké vody nebo se spaří.

Naproti tomu k získání bílého pepře se používají již vyzrálé červené plody. Ty se namáčejí buď v mořské vodě, nebo ve vápenném mléce, případně se nechají několik dní fermentovat, a to z důvodu odstranění dužiny. Následně se pepř suší. Pod pojmem zelený pepř se označují nezralé bobulky, které se nakládají do soli či octa (DIENTSBIER, VLČKOVÁ; 1989; JURMAN O., 1991)

5.4 Ošetření a skladování koření

Způsobů ošetření koření je hned několik. Jedním z nich může být **pascalizace**, což je technologie využívající vysokého tlaku v rozmezí hodnot 100 - 1000 MPa. Prodlužuje trvanlivost výrobků, uchovává čerstvost a nutriční a biologické hodnoty. Zůstávají zachovány i sensorické vlastnosti.

Ozařování ionizujícím zářením je upraveno vyhláškou MZd č. 133/2004 Sb. o podmínkách ozařování potravin. Ionizujícím zářením rozumíme záření, jenž je tvořené částicemi nabitými, nenabitými nebo obojími, schopnými přímo nebo nepřímo ionizovat. K ošetření potravin ionizujícím zářením lze použít tyto druhy ionizujícího záření: záření radionuklidů ^{60}Co a ^{137}Cs , rentgenové záření o energii nepřevyšující 5 MeV a v neposlední řadě urychlené elektrony o energii nepřevyšující 10 MeV. Ozáření ultrafialovým zářením vymezuje tatáž vyhláška. Pro účely této vyhlášky se rozumí ultrafialovým zářením záření o vlnové délce 250 – 270 nm a dávce 250 – 300 Jm. UV záření ničí mikroorganismy na povrchu koření, ale neničí je v jeho záhybech, kam nepronikne.

Ošetření vodní párou o teplotě 100 – 140 °C patří také mezi novější metody. Následně je koření sušeno v kontinuální sušící jednotce s prouděním vzduchu. Účinek parní sterilace se projeví nejen ve snížení četnosti mikrobů, ale také ve snížené aktivitě enzymů v koření. Další možností by bylo ošetření koření **vysokým tlakem** (100 - 1000 MPa). Dosáhne se tím účinku podobného sterilaci bez nutnosti potravinu zahřívát nebo v kombinaci s velmi šetrným záhřevem.

Alternativou finančně náročných metod používaných k odstranění kontaminující mikroflóry koření by se mohla stát aplikace extraktů nebo silic s antimikrobiálním účinkem

z vybraných rostlin (eugenol, tymol, anetol, o-metoxycinamaldehyd jsou látky s inhibičním účinkem) (KALHOTKA L., 2014; KOPÁČOVÁ O., 2002).

5.5 Kontaminace koření

Již při vyvíjení rostliny ze semínka mohou být ohroženy během klíčení nástupem vlhnutí. Orosení, mokvání a následné zaplísnění je způsobeno komplexem původně půdních nespecializovaných saprofytických hub *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Phoma* spp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* spp. a oomycety *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. Tyto druhy ovlivňují kořenové a stonkové báze klíčících rostlin a způsobují nasáknutí vodou, tmavnutí a srašštění vláken stonku na povrch země, takže horní části rostlin ztrácí svoji stabilitu a ocitají se na povrchu zeminy a umírají.

Na rostlinných zbytcích se také mohou vyskytovat oportunní patogeny, které jsou známy produkcí mykotoxinů (zjm. *Aspergillus flavus*).

Už ze svého stanoviště, ať už v přírodě nebo na poli, si přinášejí rostliny více či méně rozsáhlou sbírku mikroorganismů, které se za příznivých podmínek mohou snadno pomnožit. Nadzemní části rostlin jsou osídleny fylosférní (epifitní) mikroflórou (zdrojem je především půda). Z hygienického hlediska je mimořádně kritické hnojení rostlin fekáliemi a jejich nechráněné sušení na volném vzduchu. Fylosférní mikroflóra je po kvantitativní stránce bohatá. Dominantní jsou zde bakterie, zastoupeny však i mikromycety, kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy, jejich počet se zvyšuje nevhodným skladováním (PETRŽELOVÁ I., 2014; ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., 2009).

Počet mikroorganismů kontaminujících koření je proměnlivé (od desítek do cca 10^9 /g). Z mikroorganismů bývají v koření významně zastoupeny sporulující bakterie, zejména bacily skupiny *subtilis – mesentericus*, dále sporulující anaeroby, zejména termofilní, mikrokoky, pseudomonády, flavobakterie a streptokoky. Z patogenů je častější i přítomnost salmonel. *Staphylococcus aureus* se vyskytuje málokdy, častější bývá přítomnost *Clostridium perfringens* a *Bacillus cereus*.

Velký vliv na skladbu a počet mikrobů (včetně plísní) má pochopitelně také vliv jeho posklizňové úpravy, způsob zpracování a podmínky skladování, tj: použité způsoby stabilizace (teplem, odvodněním, zmrazením) a sušení (přímým teplem ve stínu, či v sušárnách). Sušení musí ovšem probíhat tak, aby neutrpěla jakost suroviny, teplota sušení se proto pohybuje do 40 °C. Dalšími kroky (mletí aj.) je dále ovlivňováno jak složení obsahových látek tak mikroorganismů. Nejen, že se při **špatném skladování** ztrácí koření

aromaticky důležité látky a také svou určující barvu, tuky v něm obsažené mohou žluknout, může také přejímat nežádoucí pachy a v neposlední řadě také dochází k **pomnožení mikroorganismů** v koření, ať již jde o bakterie nebo o mikromycety, následně pak může být koření napadeno některými skladištními škůdci (KALHOTKA L., 2014; KOPÁČOVÁ O., 2002).

Některá koření mohou významně ovlivnit mikroflóru (zejména proteolytickou) potraviny, do které byla přidána. Pokud jde o plísně, jejich počty mohou v přepočtu na 1 g koření dosáhnout hodnot od 1 až do 10^6 . Například počty $10^2 - 10^4$ /g jsou uváděny pro koriandr, kmín, bobkový list, muškátový květ, majoránku, nové koření, černý i bílý pepř a tymián a 10^2 /g pro bazalku, estragon, zázvor a hřebíček. Plísně jsou na rozdíl od bakterií všeobecně přizpůsobivější na určité extrémní podmínky prostředí, lépe snáší nižší hodnoty pH, nižší obsah využitelné vody a nižší teploty. Nejčastěji se vyskytujícími rody plísní na koření jsou *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Culvularia* a *Rhizopus*.

Jak již bylo pojednáno v kapitole o mykotoxinech a jejich producentech, ze zdravotního hlediska jsou nejnebezpečnější mykotoxiny produkované druhy *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*, trichoteceny a zearalenon, produkované některými druhy rodu *Fusarium* respektive některými penicilii a aspergily. Mykotoxiny produkují i zástupci rodů *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria* a *Cladosporium*. Většina z nich bývá často přítomna také v koření. Z výše uvedeného vyplývá, že koření, jako surovina používaná v potravinářství a ve farmacii, je významným vehikulem mikroorganismů (popř. jejich metabolitů), které mohou negativně ovlivnit kvalitu výrobků.

Koření je také častým zdrojem kontaminace masných výrobků. V tomto případě jde o kontaminaci sekundární, kdy dochází ke kontaminaci výrobků například při nevhodném uchovávání ingrediencí nebo přípravě pokrmů při přidávání koření do již hotového a dále již tepelně neopracovaného pokrmu.

Zákon ukládá prodejcům nabízet pouze koření bez přítomnosti škůdců a nežádoucích příměsí. Má být suché, s typickou vůní podle druhu. Koření se musí správně skladovat už v prodejně, tedy v suchu a temnějších koutech. (KALHOTKA L., 2014; HNILICOVÁ J., 2009; STEINHAUSER L., 1995).

Mletá paprika, pepř a ostatní koření byly také blíže sledovány SZPI v minulém roce. U 39 vzorků se stanovily aflatoxiny, paprika a pepř byly jedním z nich. U 5 vzorků pak byla dokonce potvrzena přítomnost ochratoxinu A. Naměřená množství se pohybovala

v rozmezí 6,46 do 13,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Limit 15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ podle nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách překročen nebyl. (SCHNEEWEISS, 2016).

6. MATERIÁL A METODIKA

Vzorky pro praktickou část byly poskytnuty firmou TRUMF International s. r. o., jednalo se o vzorky papriky mleté a pepře černého (viz příloha č. 1). Původ a zdravotní nezávadnost tohoto koření byla deklarována průvodními bezpečnostními listy. Pro ukázkou je opět uvádím v přílohách (viz příloha č. 2 - 11). Vzorky byly dále použity pro izolaci DNA. Navážka u každého činila 50 mg, což se ukázalo jako optimální váha, aby se zbytečně nepřetěžoval používaný kit. Pepř byl ještě před navážkou homogenizován do příslušného práškovitého stavu. Izolace DNA byla provedena s využitím komerčně dodávaného DNeasy Plant mini kitu vyráběného firmou Qiagen (QUIAGEN, 2012).

6.1 Izolace DNA

Pro izolaci DNA z různých biologických vzorků jsou používány odlišné postupy (z důvodu odlišného složení, např. živočišných tkání či rostlinných pletiv). Vzorek izolované DNA v našem případě obsahuje komplexní směs DNA nejen vzorku koření, ale i stopy DNA dalších organismů obsažených ve vzorku. Použitá souprava je uzpůsobena pro izolaci DNA rostlin, taktéž se ale ukázal jako vhodný kit pro izolaci mikrobiální plísňové DNA. Poskytuje rychlou a snadnou purifikaci DNA na silikátovém podkladě.

DNA byla izolována přímo ze vzorku. Celý postup byl dán již v DNeasy Plant Handbook. Získaná DNA byla dále podrobena zkoušce kvantity a kvality, a to pomocí přístroje Picodrop. Jedná se o UV – spektrofotometr s automatickou pipetou. Používaly se vzorky o objemu 2 μ l. Měření probíhalo při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Vyhodnocení probíhá metodou kalibrační křivky proti slepému pokusu. Vzorky byly do dalšího zpracování uchovávány v mrazáku o přibližné teplotě -18 °C, aby bylo zabráněno případné nežádoucí degradaci DNA.

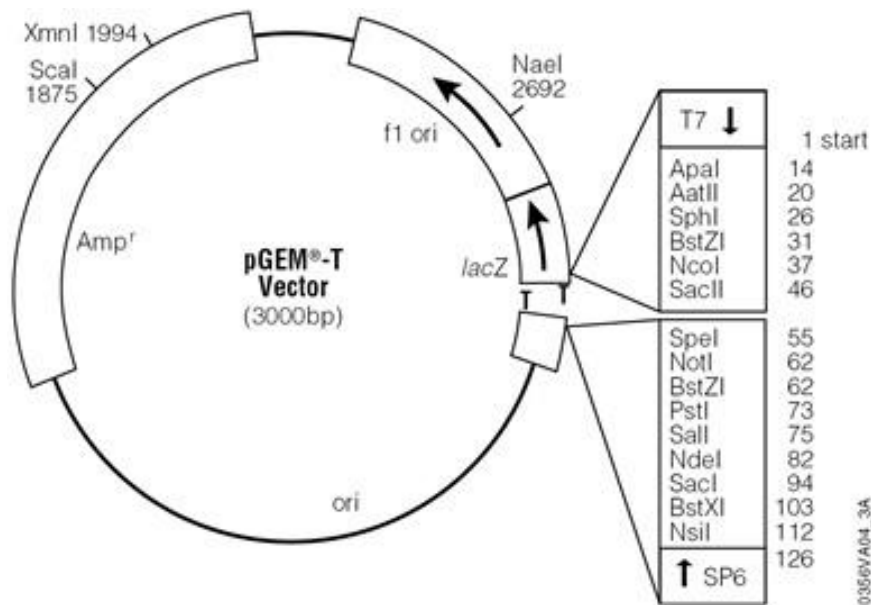
6.2 PCR amplifikace a klonování DNA

Pro PCR amplifikaci byla použita reakční směs deionizované vody, pufru, dNTP, primeru F a R a *Taq* polymerázy, teploty pro reakci byly převzaty z dřívější práce TROJAN V., 2009.

Pro PCR amplifikaci byly použity primery pro ITS (Internal Transcribed Spacer) oblasti. ITS oblasti jsou doporučovány jako univerzální sekvence pro mikroskopické houby, zároveň však vykazují vysokou variabilitu u jednotlivých druhů.

PCR amplifikace byla vyhodnocována pomocí gelové elektroforézy na 1 % a 2 % na agarzovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem.

V následujícím kroku proběhlo klonování amplifikované DNA. Pro tento účel byl využit pGEM – T vektor.



Obr. 1: pGEM-T vektor (PROMEGA, 2012)

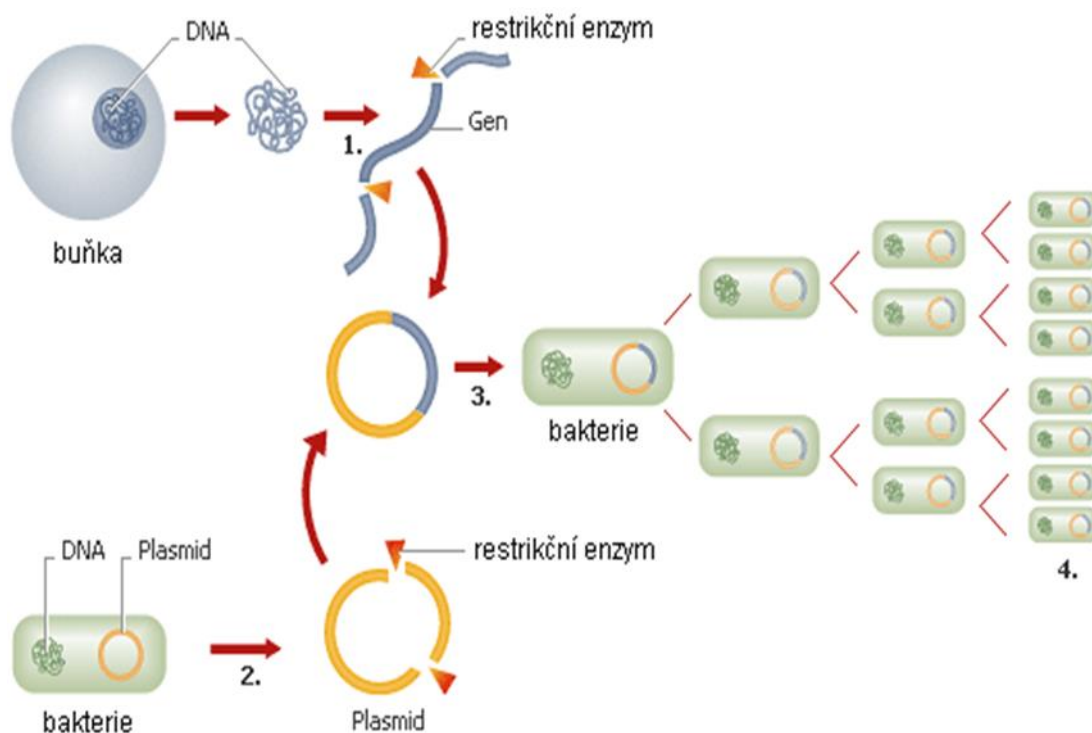
Před ligací proběhla ještě purifikace DNA. K objemu vzorku, který byl 10 µl, se přidal „Binding Buffer“. Po centrifugaci se aplikovalo ještě 10 µl ultračisté vody a provedla se ještě další centrifugace. Pro kontrolu byly vzorky ještě opět podrobeny gelové elektroforéze. Při snímání gelu se kontroluje oproti velikostnímu markeru přítomnost bandů o velikosti 600 bp, což je velikost ITS oblastí u hub.

Dále následovala samotná ligace s pGEM-T vektorem (PROMEGA, 2012). Pro ligaci bylo použito 5 µl vzorku. Poměr inzertu a vektoru se počítá podle vzorečku:

$$\frac{\text{hmnotnost vektoru (ng)} \times \text{velikost inzertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (ng)}} \times \frac{1}{3} = \text{hmnotnost inzertu (ng)}$$

Optimální poměr vektoru a inzertu pro ligační reakci je 1:3. Vektor má v našem případě 3 kb a do reakce ho bylo přidáno 25 ng.

Amplifikovaná DNA hub obsahuje směs jednotlivých druhů nacházejících se ve vzorku. Při přímé sekvenaci by byla DNA nečitelná v důsledku překrývání (DNA odlišných druhů se liší). Při použití klonování jsou čteny jen jednotlivé úseky a dojde k „vytřídění“ jednotlivých druhů. Ke klonování se používají živé buňky bakterie *Escherichia coli*.



Obr. 2: Využití plazmidu pro klonování (iBiotech; 2012).

Introdukce požadované sekvence DNA do plazmidu *E. coli* probíhá pomocí elektroporace. Vzorky - mix amplikonů a ligační směsi - byly pomocí mikropipety přeneseny do sterilní kyvety. Kyveta byla umístěna do eletroporátoru a reakce proběhla při 12,5 Kv/cm, 25 μ F a 400 Ω . Poté bylo ke vzorku přidáno 1 ml SOC média a byl přenesen do sterilní mikrozkušavky. SOC médium obsahuje glukózu a chlorid hořečnatý. Tyto kroky byly opakovány pro všechny vzorky. Mikrozkušavky pak byly kultivovány 30 minut pro regeneraci a přeneseny na orbitální třepačku při 60 rpm a 37°C .

6.3 Kultivace bakterií

Pro kultivaci bakterií bylo použito médium LB s kvasničním extraktem a selekcí pro ampicilin (100 µg/ml) a komponenty pro modro-bílé (blue/white) zabarvení bakterií (Xgal – 20 µg/ml, IPTG 0,1 mM). Na medium v Petriho miskách bylo nanášeno po 100 µl bakteriální kultury. Suspenze bakterií byla rozetřena skleněnou tyčinkou. Misky byly uzavřeny, zapáskovány a následně kultivovány přes noc při 37 °C dnem vzhůru.

Po tomto kroku jsou selektovány rekombinantní kolonie. Tyto rekombinantní kolonie obsahují vždy jen jednu kopii houbové DNA a slouží jako templát pro sekvenční reakci. Výsledkem je potom přečtená primární sekvence klonovaných úseků.

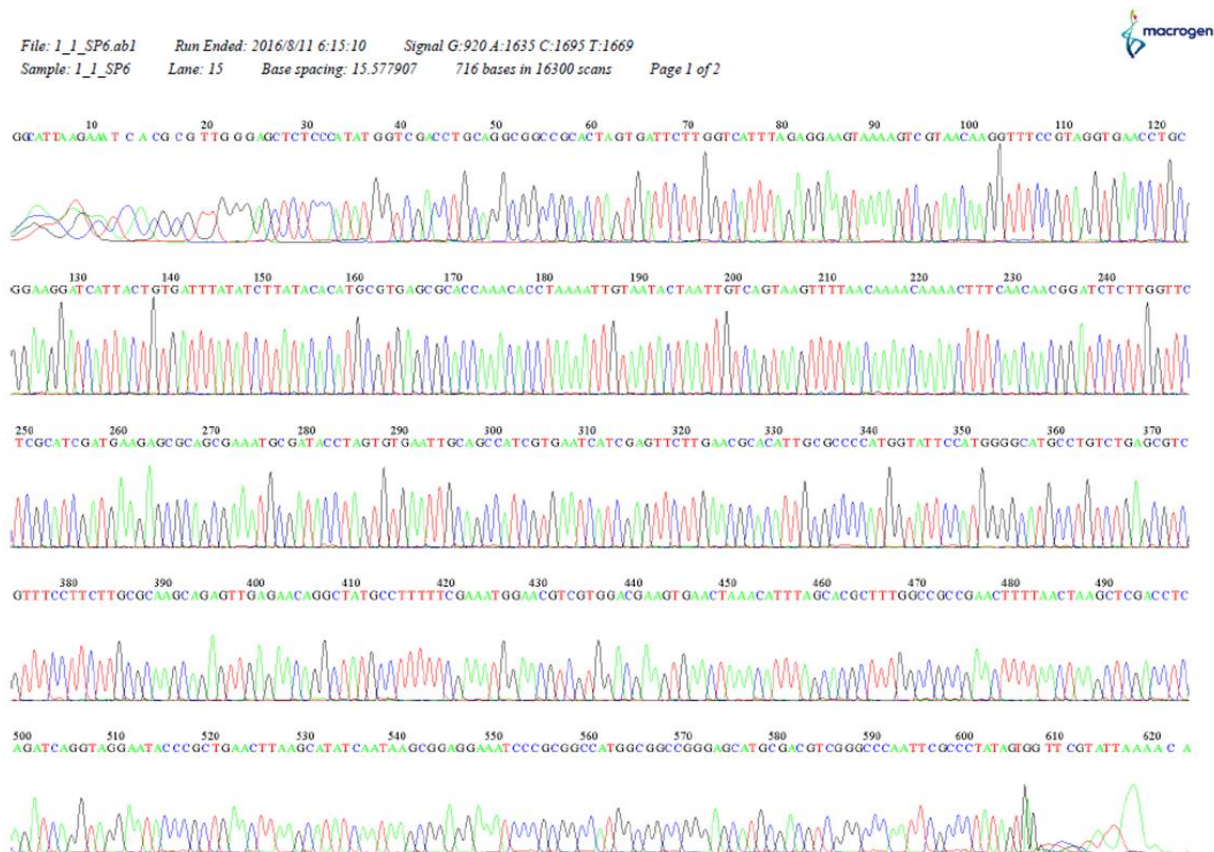


Obr 3.: Bakterie po kultivaci na Petriho misce

Následujícího dne pak byly jehlou ve sterilních podmínkách „vypíchávány“ pouze bílé kolonie, ve kterých došlo k ligaci. Kolonie byly přeneseny do mikrotitrační destičky s předpřipravenou směsí pro PCR. Amplifikované požadované produkty z těchto kolonií byly odeslány na sekvenaci do firmy MacroGen Europe (Nizozemí). Pro vlastní sekvenaci je zde používána kapilární elektroforéza.

6.4 Vyhodnocení

Pro postup vyhodnocení uvádím názorný příklad. Nejdříve je třeba zhodnotit, zda je sekvence vůbec čitelná. To lze vidět na následujícím obrázku. Počáteční a koncové sekvence jsou nekódující a není s nimi pracováno.



Obr. 4.: Výstup ze sekvenace

Pokud je sekvence dobře čitelná, můžeme ji rovnou vyhodnotit. V sekvenci si najdeme počáteční a koncovou sekvensi vektoru pGEM-T (ta by měla být vždy stejná – kromě nečitelných částí na začátku a konci). Klonovaná sekvence je ohraničená primery použitými pro amplifikaci insertu. Naklonovaný insert může být v „sense“ nebo „antisense“ orientaci. Pokud máme sekvenci v antisense orientaci (začíná „reverse primerem“, je vhodné ji převést do sense orientace (HANÁČEK P., 2016, ústní sdělení). Pro ukázkou vkládám vyhodnocení prvního vzorku.

GGCATTAAAGAAATCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTTCGACCT-
GCAGGCGGCCGCACTAGTGATTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCG-
TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATT-
TATATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAAACACCTAAAATTG-
TAATACTAATTGTCAGTAAGTTTTAACAAAACAAAACCTTTCAACAACGGAT-
CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGT-
GAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATT-
GCGCCCCATGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTT-
GCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTTCGAAATGGAACGTCGT-
GGACGAAGTGAACATAACATTTAGCACGCTTTGGCCGCCGAACCTT-
TAACTAAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT-
TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAATCCCGCGGCCAT-
GGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGGTTTCG-
TATTAAAACATGATCCCAATGAAACATCCCCTCGAT-
GGCCGCCGGGAGGCGGTGATGGCGGGCCGGGAGCACGCTATGGCCTGAT-
CCAATAAAAAAAGGGCCT

Počáteční hraniční sekvence při sekvenování primerem SP6 je označena fialovou barvou. Za touto sekvencí začíná jeden z primerů pro amplifikaci insertu - „forward primer“ insertu ITS1- F je v tomto případě označen zeleným písmem. Koncová sekvence je označena žlutě. Před ní je jeden z primerů pro amplifikaci insertu – „reverse complement“.

Sekvence insertu je následně porovnána s databází GenBank pomocí algoritmu funkce BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Výstupem jsou nalezené sekvence v databázi s určitou mírou identity a pak i textový výstup, znázorňující lokální seřazení sekvencí s identickými bázemi nad sebou, vloženými mezerami a maskovanými místy s nízkou komplexitou (n). Fragmenty o kratších velikostech indikují podobnost spíše s kvasinkami, delší fragmenty pak spíše s houbami. Při identifikaci po výstupu z BLAST je někdy potřeba zahrnout do bioinformatické analýzy i ten výsledek, který nemá s daným vzorkem příliš velkou podobnost. Je to z toho důvodu, že vzorky byly směsné, byla zde přítomná také DNA papriky/pepře (VYHNÁNEK T., 2017, ústní sdělení.)

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

Po izolaci DNA byla stanovena průměrná koncentrace papriky 27,09 ng/μL o čistotě 1,349 a pepře 10,8 ng/μL o čistotě 0,666. Pokud by byla koncentrace příliš nízká, musela by se následná amplifikace pomocí PCR metody upravit jak v počtu cyklů, tak i v teplotním profilu (BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007). Výtěžnost nelze porovnat, protože použitá souprava je optimalizována pro rostliny a pro izolaci z mladých listů. Pro DNA mikroorganismů v DNeasy Plant Handbook (QIAGEN, 2012) nejsou uvedeny koncentrace. Tímto krokem však nemůžeme určit poměr plísňové DNA a DNA papriky. Zároveň nemůžeme určit, zda se u plísňové DNA jedná o NK životaschopnou či ne.

Při následné PCR amplifikaci, na kterou navazovala gelová elektroforéza, byly detekovány produkty houbové DNA o požadované velikosti 600 bp. Kontaminanty jsou tak identifikovány na základě porovnání fragmentů, velikost 600 bp je typická právě pro oblast ITS. Pro identifikaci se použila oblast ITS1-2 organizátoru jádérka (NOR - Nucleolar Organizer Region), která se standardně používá pro DNA barcoding u hub. Oblast ITS1-2 se vyskytuje u všech eukaryotních organismů, tedy živočichů, hub i rostlin. Pro amplifikaci DNA byly použity primery specifické pouze pro houbovou DNA.

Ke klonování byl použit pGEM-T plazmidový vektor. Ten byl zaveden pomocí elektroporace do bakterie *E. coli*. Následovala kultivace bakterií. Jejím výsledkem byl nárůst bílých, modrých a modrobílých kolonií. Úspěšné vložení do vektoru se projevilo nárůstem kolonie bílé barvy. Tam, kde spojení nebylo zcela úspěšné se objevila kolonie modrobílá a celkově neúspěšné kolonie pak indikovala barva modrá. Z každé Petriho misky byly odebrány vzorky bílých kolonií, namnožily se pomocí PCR a požadovaná DNA byla odeslána na sekvenaci do firmy Macrogen Europe v Nizozemí. U některých vzorků nebyl dostatečný nárůst kolonií, mohlo se jednat o subletální poškození bakteriálních buněk při elektroporaci a taktéž lidské zavinění.

Po přijetí sekvencí bylo vidět, že v každém vzorku koření bylo nalezeno několik druhů hub a spektrum mikroorganismů bylo skutečně pestré. Pro přehled uvádím tabulku nalezených druhů mikroorganismů. U každého vzorku se pro vyhodnocení vybrala z databáze NCBI ta sekvence, která vykazovala nejvyšší stupeň shody. Pokud byla již jednou

sekvence uvedena u jednoho vzorku, u dalšího pak byla vybrána ta sekvence, která měla podobnost jako druhá v pořadí.

Pořadí	Označení vzorku (šarže)	Popis vzorku	Podobnost (%)	Patogenní organismus (rod)	Významný zástupce
1	P1182	Paprika sladká	100-99	<i>Pichia, Galactomyces, Cladosporium, Alternaria, Fusarium, Geotrichum</i>	<i>Alternaria, Fusarium, Pichia Cladosporium, Alternaria, Fusarium</i>
2	P1183	Paprika sladká	99	<i>Symmetrospora, Sporobolomyces, Galactomyces, Pichia, Candida, Cryptococcus, Cladosporium, Geotrichum, Botryotinia, Botrytis, Sclerotinia</i>	<i>Pichia, Candida Sclerotinia, Botrytis</i>
3	P1184	Paprika sladká	99	<i>Botryotinia, Botrytis, Penicillium, Pichia, Tilletia, Candida, Galactomyces, Eurotium, Aspergillus, Sclerotinia</i>	<i>Pichia, Candida, Eurotium, Aspergillus, Penicillium Sclerotinia, Botrytis, Tilletia</i>
4	P1185	Paprika sladká	99-100	<i>Galactomyces, Geotrichum, Botryotinia, Botrytis, Pichia, Sclerotinia, (84% Malassezia)</i>	<i>Pichia, Malassezia, Sclerotinia, Botrytis</i>
5	P1830	Paprika pálivá	99-100	<i>Cryptococcus, Pichia, Candida, Galactomyces, Geotrichum,</i>	<i>Pichia, Candida</i>
6	P1831	Paprika sladká	99-100	<i>Pichia, Cryptococcus, Galactomyces, Cladosporium, Geotrichum</i>	<i>Pichia Cladosporium</i>
7	201605031-1	Paprika	99-100	<i>Penicillium, Alternaria, Scopulariopsis</i>	<i>Penicillium, Alternaria Alternaria</i>
8	201605031-2	Paprika	99-100	<i>Alternaria, Cryptococcus, Cladosporium</i>	<i>Alternaria, Cladosporium</i>
9	037CD-SR	Pepř černý celý	99	<i>Colleotrichum, Malassezia, Candida, Issatchenkia, Cryptococcus, Beauveria, Bjerkandera, Thanatephorus, Ganoderma</i>	<i>Candida, Issatchenkia, Malassezia Colletotrichum, Cladosporium, Beauveria, Thanatephorus</i>
10	I1BPWONT150118	Pepř černý celý	99-100	<i>Aspergillus, Cyberlindbera, Pichia, (87% Wallemia)</i>	<i>Aspergillus, Wallemia</i>

Tabulka 1.: Detekce patogenních mikroorganismů – bioinformatická analýza

Červenou barvou jsou vyznačeni potenciální producenti mykotoxinů. Ty nejvýznamnější budou popsány níže. Modrou barvou jsou zvýrazněny patogenní organismy, které sice byly pomocí BLAST také identifikovány, nevykazují ale takovou podobnost a jejich určení může být spíše důsledkem chyby lidského faktoru. Například *Malassezia* je mikroorganismus související s lidskými chorobami kůže, způsobuje třeba i seberhoeickou dermatitidu (ANGELIS DE Y.M., a kol., 2007). Na vzorky se mohl dostat z rukou pracovníka při manipulaci. Naproti tomu *Wallemia* náleží do *Basidiomycet* a často se vyskytuje také v půdě, odtud je cesta na koření už velmi snadná (ZALAR P. a kol, 2005).

Často identifikován byl rod *Pichia*, který patří ke křísotvorným kvasinkám. Produkuje různé estery, které jsou v potravinách zdrojem cizích pachů. K tvorbě pachových produktů také přispívá vlastní rozklad kvasinkových buněk. Tím dochází k znehodnocení potravin nebo výrobku po sensorické stránce.

Z kvasinek byl dále také identifikován rozsáhlý rod – *Candida* - s mnoha druhy. Zahrnuje druhy výhradně saprofytické i potenciálně patogenní, které mohou způsobit mykotická onemocnění člověka a zvířat. Na prvním místě je nutné uvést druh *Candida albicans*, jenž je fakultativním patogenem a za určitých podmínek je schopen vyvolat onemocnění.

Plísňe rodu *Cladosporium* se hojně vyskytují v půdě, objevují se také na potravinách, skladované zelenině nebo obilí, rovněž parazitují na mnoha rostlinách. U druhů rodu *Cladosporium* nebyla prokázána produkce mykotoxinů (KLABAN V., 2011).

Významným identifikovaným rodem je rod *Alternaria*. Rod tvoří charakteristické vícebuněčné spory s podélnými i příčnými přepážkami. Některé druhy tohoto rodu jsou parazitické na rostlinách, jiné na nich parazitují pouze příležitostně nebo žijí epifyticky na povrchu listů, stonků a plodů různých rostlin. Spory rodu *Alternaria* se vyskytují často v ovzduší i v potravinářských provozovnách, mlékárnách, sklepích, ve skladištích ovoce nebo zeleniny. Co se týká koření, některé druhy mohou způsobovat i skvrnitost paprik. Druhy rodu *Alternaria* (nebo *Bipolaris*, konkrétněji *Helminthosporium*) produkují jedno z největších množství fytopatogenních toxinů. Fytopatogenní toxiny, které jsou produkovány rostlinnými patogeny, jsou klasifikovány do dvou typů; nespecifické, které tak ovlivňují větší množství rostlinných druhů než patogen, který je produkuje a specifické, které tak ovlivní pouze stejného hostitele, jako je patogen. (LUKE H. H., BIGGS R. H.; 1976; NASEHI et al., 2014).

Z plísni byl dále identifikován rod *Fusarium*. Plísně tohoto rodu jsou značně rozšířené v přírodě, zejména v půdě, ale také ve vodě a v ovzduší. Druhy rodu *Fusarium* způsobují vadnutí a padání mladých rostlin v množnách, tracheomykózy dospělých rostlin projevující se jejich žloutnutím a odumíráním i skladištní hniloby uložených plodů. Produkují i značně nebezpečné mykotoxiny. Dříve byl rod *Fusarium* považován za nepatogenní pro člověka, v současné době jsou však popsány případy mykotických onemocnění osob se sníženou imunitou nebo jinak oslabených. Tyto infekce mají často velmi závažný průběh a odolávají léčbě běžně aplikovaných antimykotických preparátů. Podobně i některé další saprofytické plísně mohou v současné době způsobovat poměrně těžká onemocnění. Je zde patrný posun od saprotrofie k potenciální patogenitě.

Rod *Eurotium amstelodami* (dřívější název *Aspergillus amstelodami* je již neplatný) je jméno plísně, které se v současné době odvozuje od jejího askosporového stadia *Eurotium amstelodami*. Vyskytuje se v půdě, ale také např. na skladovaném obilí (KLABAN V., 2011). Některé druhy rodu *Eurotium* produkují velmi nebezpečné mykotoxiny. (SAMSON et al., 2004).

Z výše uvedených mikroorganismů byly jako producenti mykotoxinů identifikovány po ústní konzultaci s doc. Šafránkovou (2016) tyto:

- *Alternaria alternata*
- *Aspergillus glaucus*
- *Aspergillus ruber*
- *Beauveria bassiana*
- *Fusarium equiseti*
- *Penicillium camemberti*
- *Penicillium commune*
- *Penicillium solitum*
- *Wallemia muriae*

Nalezené mikroorganismy byly také rozděleny do skupin na základě jejich možného pří-
stupu ke koření;

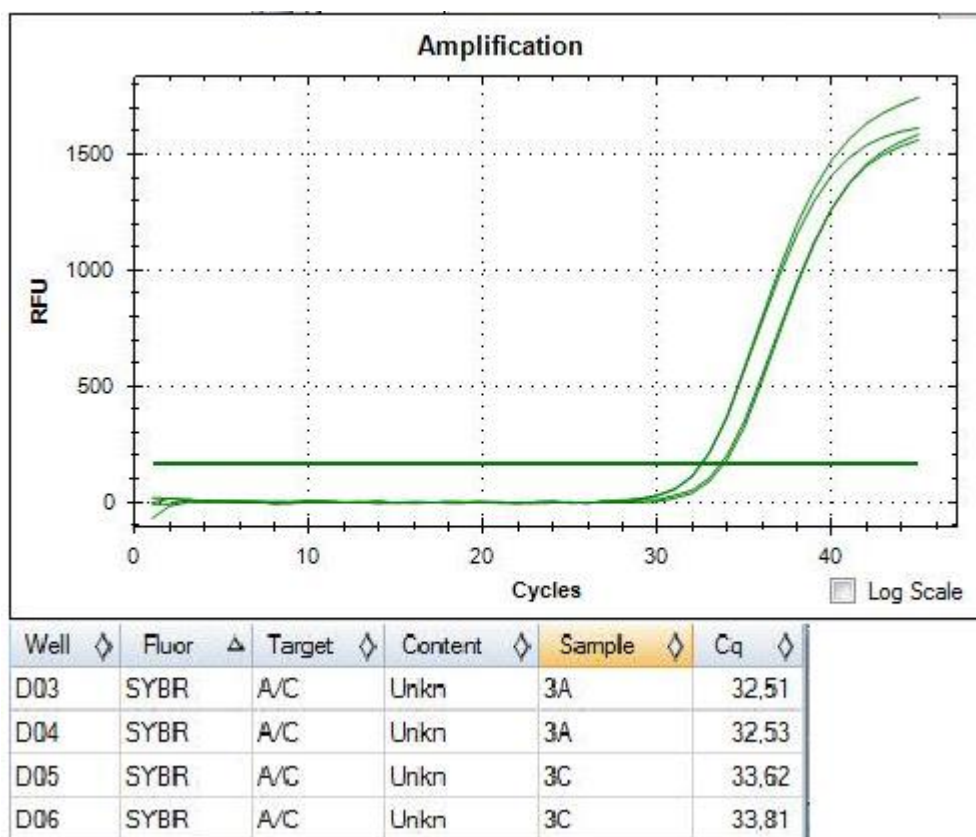
Pravděpodobná doba kontaminace identifikovanými mikroorganismy			
Během vegetace	Během sklado- vání	V průběhu dalších manipu- lací	Bliže neidentifi- kovatelné
<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.
<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Botrytis</i> spp.
<i>Beauveria</i> spp.	<i>Botrytis</i> spp.	<i>Malassezia</i>	<i>Bjerkandera</i> sp.
<i>Botryotinia</i> sp.	<i>Candida</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Cryptococcus</i> spp.
<i>Botrytis</i> spp.	<i>Cladophialophora</i> sp.	<i>Pichia</i> spp.	<i>Ganoderma</i> sp.
<i>Candida</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Wallemia</i> spp.	<i>Symmetrospora</i> sp.
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Eurotium</i> spp.	<i>Monilia</i> sp.	
<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Malassezia</i> spp.	<i>Tilletia</i> sp.	
<i>Cordyceps</i> sp.	<i>Cyberlindnera</i> sp.		
<i>Cryptococcus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.		
<i>Cyberlindnera</i> sp.	<i>Pichia</i> spp.		
<i>Eurotium</i> spp.			
<i>Fusarium</i> sp.			
<i>Galactomyces</i> spp.			
<i>Geotrichum</i> sp.			
<i>Issatchenkia</i> sp.			
<i>Malassezia</i> spp.			
<i>Penicillium</i> spp.			
<i>Sclerotinia</i> sp.			
<i>Scopulariopsis</i> spp.			
<i>Sporobolomyces</i> spp.			
<i>Thanatephorus</i> sp.			
<i>Tilletia</i> sp.			
<i>Wallemia</i> spp.			

Tabulka 2.: Pravděpodobná doba kontaminace identifikovanými mikroorganismy

Ke vzorkům koření byly firmou TRUMF International s.r.o., poskytnuty protokoly o zdravotní nezávadnosti, kde se uvádí, že vzorky nejsou nebezpečné pro člověka. Parametrem KTJ (CFU) je stanoven v 1 gramu vzorku obsah MO méně než 10^3 KTJ. V laboratoři však nebyla použita stejná metodika jako pro stanovení mikroorganismů v rámci praktické části této práce, tedy určování mikroorganismů na základě jejich DNA. Nicméně, ani tato metoda není schopna zhodnotit, zda je nalezená DNA ve vzorcích životaschopná, tedy i schopná produkce mykotoxinů. Můžeme tedy pouze kvalitativně vyhodnotit, zda je přítomná DNA schopná produkce mykotoxinů.

Ve směsných kulturách, tedy například i na koření, produkují mikromycety méně mykotoxinů než jako čisté kultury. Proto samotná přítomnost toxigenních druhů plísní v potravinách ještě neznamená přítomnost mykotoxinů. Pokud je ovšem mykotoxin v potravě již vyprodukován, může v potravinové matrici přetrvávat ještě dlouho poté, co jeho producent zde už dávno není přítomen. V průběhu sušení a ostatního ošetření koření (viz kapitola 5.4 Ošetření a skladování koření) se totiž větší část MO odstraňuje. Možností, jak zjistit, zda je nalezená DNA (tedy i mikroorganismus) životaschopná, je použití živných půd (identifikace pak probíhá na základě porovnání s axenickou kulturou) a sledování nárůstu kolonií nebo aplikace molekulárně biologické metody, na kterou by navazovala RT-PCR.

V současné době se na Ústavu biologie rostlin zatím testuje metoda, která byla také aplikována na vzorky z praktické části této práce. Využívá metodiky, kdy se za použití speciální assay pro identifikaci DNA dá určit, zda je nalezená NK životaschopná. Assay je však dělaná jen na konkrétní patogeny. Nejčastěji se vyskytujícími rody plísní na koření jsou *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Culvularia* a *Rhizopus*. Nejnebezpečnější mykotoxiny produkují druhy *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*, trichoteceny a zearalenon, produkované některými druhy rodu *Fusarium* respektive některými penicilii a aspergily se řadí ze zdravotního hlediska mezi jedny z nejzávažnějších mykotoxinů (KALHOTKA L., 2014). Testovaná metoda byla tedy použita právě pro stanovení životaschopné DNA rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Assay (q PCR assay) se spolu s mikrobiální DNA nechá podrobit real-time PCR reakci. Reakce je zahájena primery přítomnými ve směsi. Výstupem jsou grafy, na základě nichž lze určit přítomnost životaschopné DNA, a to díky speciálně vyvinutému barvení.

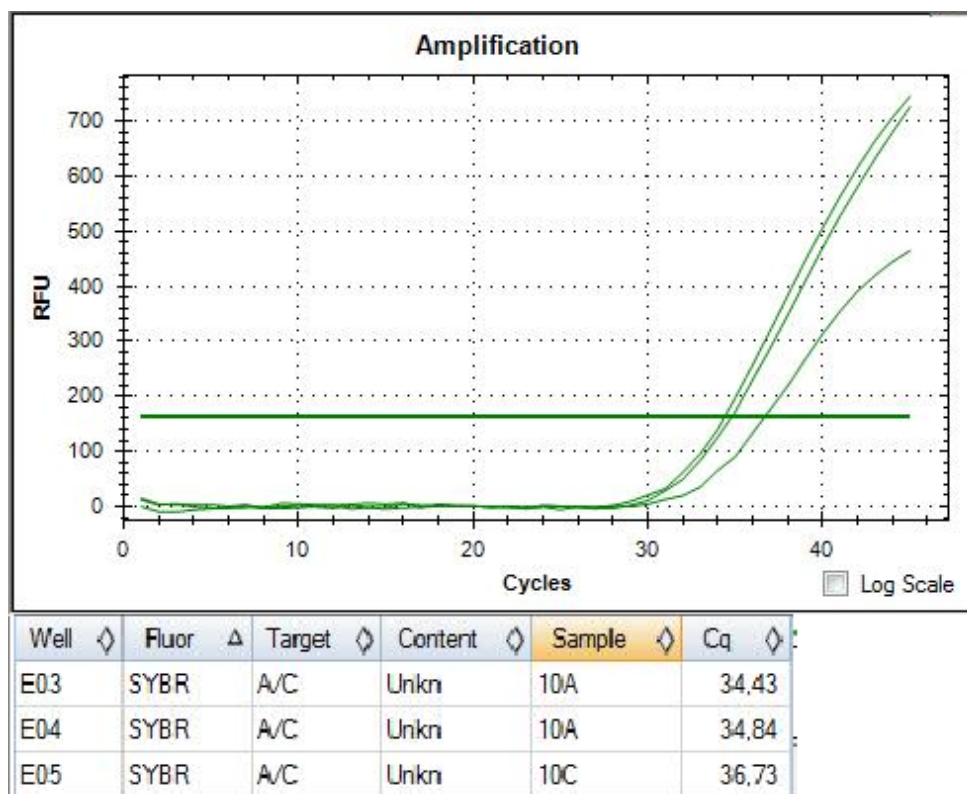


Obr. 5.: Výstup z RT-PCR, paprika

Na grafu výše se jedná o vzorky papriky sladké s hodnotou ASTA 100, označené v bezpečnostním listu kódem P184. Tento vzorek byl vybrán záměrně z toho důvodu, že předchozí bioinformatickou analýzou byla zjištěna přítomnost patogenu rodu *Penicillium* (viz tabulka 1.: Detekce patogenních mikroorganismů – bioinformatická analýza). Důležitým identifikačním bodem je tzv. „cross point“ – jedná se o nastavený parametr, který vypovídá o schopnosti reakce. (cross point je terminologie firmy, která poskytla vybavení. Ekvivalentem je „cycle treshold C_T “). Vzorky jsou udělány tak, aby vstupovalo do reakce vždy stejné množství z důvodu porovnání – pokud vím, že do reakce bylo vloženo 30 ng (100 %), mohu kvantifikovat usmrcenou a životaschopnou DNA (RT-PCR samo o sobě nevypovídá, jetli je DNA životaschopná. To lze zjistit pouze pomocí aditivních látek a unikátního barvení) V místě, kde mi C_T linie protíná vzrůstající křivky, lze z rozdílu mezi dvěma křivkami vypočítat koncentraci životaschopné DNA.

Před samotnou reakcí jsou vzorky speciálně upravovány podle protokolu QUIAGEN, 2015. Podle protokolu vstupují do reakce varianty vzorku s neusmrcenou a usmrcenou

DNA. Neusmrcená je v tomto případě označena písmenem A, usmrcená pak C. V posledním sloupečku (a na ose x v grafu) je počet cyklů reakce. Rozdílem mezi křivkami v grafu mohou určit životaschopnou DNA.



Obr. 6.: Výstup z RT-PCR, pepř

Zde se jedná o vzorek pepře s označením R 10715 I 1B WONT 150118. V tabulce s nalezenými mikroorganismy si můžeme povšimnout, že jedním z přítomných patogenů byl i zástupce rodu *Aspergillus*. Z tohoto důvodu byl opět vybrán tento vzorek pro reakci s kitem vytvořeným na kombinaci *Asp/Pen*.

8. ZÁVĚR

Houby jsou nejčastějšími původci chorob rostlin ze skupiny LAKR (KALHOTKA L., 2014). Ty tvoří pestrskou skupinu heterotrofních eukaryotních organismů. Z fytopatologického úhlu pohledu mají parazitické druhy velký význam, nicméně, dokonce spousta saprofytů může způsobit za určitých podmínek chorobu člověka.

Různé druhy bakterií, patogenní i nepatogenní, si mohou být podobné velikostí, tvarem a schopností se obarvit. Mikroskopické a kultivační vyšetření má malou citlivost i specifčnost. Proto se musí bakterie z odebraného vzorku izolovat, případně provést primární pomnožení a teprve pak se jimi naočkuje agarová plotna. Po inkubaci se z každé odlišné kolonie odebere vzorek, ten se obarví a pozoruje se v mikroskopu. Tím se určení již zúží na konkrétnější skupiny – třeba na grampozitivní koky, nebo grampozitivní tyčinky. K přesnému určení izolovaného mikroba je pak nutno ještě zjistit jeho fyziologické parametry, nejčastěji jeho biochemickou aktivitu. Po další inkubaci, která trvá zhruba jeden den, lze již většinou druh bakterie rozpoznat a odeslat jen předběžný výsledek. Další den trvá vyšetření citlivosti na antibiotika. Zkráceně řečeno – ač stále jedna z nejběžnějších metod, je pořád velmi časově náročná a z hlediska možných chyb při vyhodnocování člověk snad i ne zcela spolehlivá. Kromě toho, klasickým rozbohem CPM se nestanoví všechny metabolicky aktivní buňky, tedy buňky schopny produkce toxinů. Není se tak čemu divit, že úsilí vyvinout spolehlivou a rychlou metodu neklesá. Metody moderní mikrobiologie využívají princip biochemie, biofyziky, imunochemie i molekulární biologie a umožňují rychlejší stanovení mikroorganismů ve srovnání s klasickými kultivačními metodami. Zavedení těchto technik do mezinárodních ISO norem doporučovaných legislativou pro mikrobiologickou kontrolu potravin je zdlouhavá práce a závisí na výsledcích řady validačních studií potvrzujících spolehlivost naměřených výsledků. Metoda použitá této v práci využívá identifikaci mikroorganismů na základě znalosti jejich genomu, konkrétně znalosti oblasti ITS. Po naklonování pomocí *E. coli* z důvodu nedostačujících výsledků po PCR amplifikaci byly produkty sekvenovány a získané sekvence vyhodnoceny pomocí databáze NCBI a funkce BLAST. Výstupem je identifikace druhů a rodů mikrobiálních hub, jejich rozdělení na skupiny podle vstupu do řetězce a vyznačení producentů mykotoxinů, kteří se nacházeli mezi jinak neškodnými druhy. Jak bylo již zmíněno v kapitole 7. Výsledky a Diskuze, použitá metoda nemůže přesně určit množství ani života-

schopnost nalezených mikroorganismů. Způsob, jak to lze určit, jsou buď axenické kultury (umístění vzorků na Petriho misky s živnou půdou) nebo aplikace metody molekulární biologie se systémem QUIAGEN, 2015 založené na použití RT-PCR a speciální technologie. V budoucnu by se tato metoda mohla oficiálně uznat Veterinární správou jako nová metodika pro kontrolu mikrobiologické kvality a zdravotní nezávadnosti potravin, neboť dosavadní výsledky jsou velice slibné.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ANGELIS DE Y.M., SAUNDERS C.W., JOHNSTONE K.R., 2007, *Isolation and expression of a Malassezia globosa lipase gene, LIP1. J. Invest. Dermatol.* 127 (9): 2138–46. DOI:[10.1038/sj.jid.5700844](https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700844).
2. BÁRTOVÁ E., ROUBALOVÁ E., 2009, *Handbook for biology and genetics practical courses*. Brno. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Biology and Wildlife Diseases. 119 s., ISBN 978-80-7305-074-0.
3. BILODEAU, G.J., LÉVESQUE, C.A., DE COCK, A.W.A.M., DUCHAINE, C., BRIÉRE, S., URIBE, P., MARTIN, F.N. a HAMELIN, R.C.; 2007, *Molecular detection of Phytophthora ramorum by Real-Time Polymerase Chain Reaction using TaqMan, SYBRGreen and Molecular Beacons*. *Phytopathology* 97, s. 632–642.
4. BEDNÁŘ, M., 2012, *Příručka mikrobiologie pro bakaláře 3.LF UK* [online]. Ústav mikrobiologie 3. Zdroj: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/>
5. BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007, *Mikrobiologická analýza potravin*, Brno, Mendelova univerzita, 238 s., ISBN 978-80-7375-116-6.
6. BURSOVÁ Š., DUŠKOVÁ M., NECIDOVÁ L., KARPÍŠKOVÁ R., *Mikrobiologické laboratorní metody* [online]. Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Brno: VFU, 2014, s. 84 [cit. 2016-10-31]
7. BURSOVÁ Š., NECIDOVÁ L., DUŠKOVÁ M., 2014, *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie*. Brno, VFU, 114 s., ISBN 978-80-7305-741-1.
8. CRAIG L.N., COHEN-FIX O., GREEN R., GREIDER C., STORZ G., WOLBERGER C., 2014. *Molecular Biology. Principles of Genome Function*. 2. vydání. Oxford, UK. Oxford University Press. 912 s. ISBN 978-0-19-870597-0.
9. DEMNEROVÁ K., 2012, *Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu*. In: ZÁMOSTNÝ P., *Chemické Listy* 106, s. 920 – 925. ISSN 1213-7103.
10. DIENSTBIER J., VLČKOVÁ A., 1998: *Lexikon koření*. Ivo Železný, Praha, 134 s., ISBN 80-240-0620-0

11. DNeasy Plant Mini Kit. Qiagen [online]. 2016 [cit. 2016-10-23]. Dostupné z: www.qiagen.com
12. DOLEŽAL M., 2012, *Chemie potravin*. Praha: VŠCHT, 2012 [cit. 2016-10-31]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~dolezala/CHPP/>
13. ERCOLINI D., BLAIOTTA G., FUSCO V., COPPOLA S.; 2004. : *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 95, s. 1090.
14. GOODNOW R. A., Jr. (ed.), 2014, *A Handbook for DNA-encoded Chemistry*. New Jersey, Wiley. 451 s. ISBN-13:978-1-118-48768-6.
15. HADIDI A., LEVY L., PODLECKIS E.V., 1995, *Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology*, s 166-187. RUDRA P. S., UMA S. S., 1995, *Molecular methods in plant pathology*, Lewis Publishers, 523 s., ISBN 0-87371-877-1.
16. HAYDEN, K.J., RIZZO, D., TSE, J. a GARBELOTTO, M., 2004, *Detection of Phytophthora ramorum from California forests using a real time polymerase chain reaction assay*. *Phytopathology* 94, 1075–1083.
17. HIGGINS, J.A., NASARABADI, S., KARNS, J.S., SHELTON, D.R., COOPER, M., GBAKIMA, A., KOOPMAN, R.P. ,2003, *A handheld real time thermal cyclers for bacterial pathogen detection*. *Biosensors and Bioelectronics* 18, 1115–1123.
18. HNILICOVÁ J.,2009, *Koření pro chuť i zdraví*. Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. 2009 [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/>
19. CANTOR R. Ch., SMITH C.L., 1999. *Genomics: The Science and Technology Behind the Human Genome Project*. [s.l.] : John Wiley & Sons, Inc., ISBN 0-471-59908-5.
20. iBiotech; 2012. cit. [cit. 2017-04-20]. *Klonovací brožura*. Dostupné z: [www. Ibiotech.sk](http://www.Ibiotech.sk)
21. JEŽKOVÁ A, ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J., DOHNAL V., POLIŠENSKÁ I.; *Vývoj metodiky extrakce na tuhé fázi a HPLC-MS pro stanovení deoxynivalenolu v ječmeni a sladu*. *Chemické listy*. 2009,**103**, 679-683.
22. JURMAN O., et al., 1991: *Všechno o koření - část II.*. Atelier, Praha, 32 s., ISBN 80- 900961-2-3

23. KALHOTKA L., 2014, *Potravinářská mikrobiologie pro zahradnickou fakultu*, Díl 2. Speciální část, Brno, Mendelova univerzita, 164 s, ISBN 978-80-7509-016-4.
24. KALHOTKA L., TESAŘOVÁ M., 2014, *Potravinářská mikrobiologie pro zahradnickou fakultu*, Díl 1. Obecná část, Brno, Mendelova univerzita, 116 s., ISBN 978-80-7509-015-7.
25. KARAMONOVA L., BLAZKOVA M., FUKAL L., RAUCH P., GREIFOVA M., HORAKOVA K., TOMASKA M., ROUBAL P., BRETT G. M., WYATT G. M., 2003; *Food Agric. Immunology*. Vol 15, s. 167.
26. KLABAN V., 2011, *Ekologie mikroorganismů. Ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. Praha, Galén, 549 s, ISBN 978-80-7262-770-7.
27. KLOUDA P., 2016, *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava, nakl. Pavko. 176 s., ISBN 978-80-86369-22-8.
28. KOMPRDA T., 2004, *Obecná hygiena potravin*. Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 148 s., ISBN: 978-80-7157-757-7
29. KOPÁČOVÁ O., 2002, *Pascalizace – ošetření potravin vysokým tlakem*. In: Agronavigátor. [online]. [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: www.agronavigator.cz.
30. LEE, J.G., CHEONG, K.H., HUH, N., KIM, S., CHOI, J.W. a KO, C., 2006, *Microchip-based one step DNA extraction and real-time PCR in one chamber for rapid pathogen identification*. Lab Chip 6, 886–895.
31. LÉVESQUE C. A., 2007; *Molecular Diagnostic of Soilborn Fungal Pathogens*. In: (ed.) PUNJA Z. K., BOER S. H. DE, SAUFACON H., 2007; *Biotechnology and plant disease management*. Canadian Food Inspection Agency, Canada. 580 s., ISBN 9781845932886.
32. LUKE H. H., BIGGS R. H., 1976, *Phytopathogenic Toxins from Fungi: An Overview*, s. 296-317. In: RODRICKS J. V., *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*; Washington, D.C., American Chemical Society, 409 s., ISBN 0-8412-0222-2.
33. Martin, F.N., Tooley, P.W. and Blomquist, C. (2004) Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94, 621–631.

34. MODRÁ, H; SVOBODOVÁ, Z. (2009). SPECIÁLNÍ VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE. Brno : [s.n.], 2009. ISBN 978-80-7399-882-0.
35. NIKOLAEVA V. O., 1995, *Nucleic Acid Hybridization Methods in Diagnosis of Plant Viruses and Viroids*, s.133-165, RUDRA P. S, UMA S. S., 1995, *Molecular methods in plant pathology*, Lewis Publishers, 523 s., ISBN 0-87371-877-1.
36. NASEHI A., KADIR J. B., ASHTIANI F. A., NASR-ESFAHANI M., WONG M.Y., RAMBE S.K., GOLKHANDAN E., 2014. *Alternaria capsicicola* sp. nov., a new species causing leaf spot of pepper (*Capsicum annuum*) in Malaysia. *Mycological Progress*, 13(4), 1041-1048. ISSN: 1617-416X
37. NORMAN J., 1989, *Spices: roots and fruits*; The Bantam Library of Culinary Arts, Honk Kong, ISBN 0-553-05379-5
38. OLEJKOVÁ D., 2001, *Evropské země sjednocují legislativu při kontrole mykotoxinů v potravinách*. Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: www.szpi.gov.cz
39. PAZDERA, J., *Nejpálivější paprička na světě. Osel* [online]. 2007 [cit. 2016-10-23]. Dostupné z: <http://www.osel.cz>
40. PEPPERŇY K., 2015, *Rezidua pesticidů v potravinách – zdravotní rizika a aktuální stav*. In: XX. česká a slovenská konference o ochraně rostlin pořádanou ČZU (FAPPZ), září 2015, Praha. [cit. 07.04.2017]. Dostupné z: [/www.szu.cz](http://www.szu.cz)
41. PETRŽELOVÁ I., *Diseases and pests of the most important medicinal, aromatic and culinary plants (MAPs)*. FOLIA: Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 2014, **VII**(5), 72-83. ISSN 1803-2109.
42. PETER K. V., 2004: *Handbook of herbs and spices: Volume 2*. CRC Press, Boca Raton, 360 s., ISBN 0-8493-2535-8
43. POHANKA M., 2009, *Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens. Studijní pomůcka*. Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové. 56 s., ISBN 978-80-7231-336-5.
44. PRAKASH V., EIPESON W.E., 2003. *Post-Harvest handling and processing of Capsicum*. In: KRISHNA A. DE, ed., 2003, *Capsicum. The genus Capsicum*. Taylor & Francis, London. ISBN 0-203-38115-7.
45. PROMEGA, 2012. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical manual, Databáze online [cit. 2017-04-25], Dostupné na: <https://worldwide.promega.com>

46. QUIAGEN, 2015, Microbial DNA qPCR Handbook.
47. RACLAVSKÝ V., 2003. *Metody molekulární genetiky* [online]. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, [cit. 2017-04-20]. Kapitola 8. Sekvenování DNA.
48. RAGHAVAN, S., 2000, *Handbook of spices, seasonings, & flavorings*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. ISBN 978-1-4200-1255-2.
51. RUDRA P. S., UMA S. S., 1995, *Molecular methods in plant pathology*, Lewis Publishers, 523 s., ISBN 0-87371-877-1.
52. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., 2009, *Zajištění zdravotně nezávadné a bezpečné pitné vody v distribuční síti*. Chemické listy. 2009, (103), 1041-1046.
53. SAMARAJEEWA U., WEI C.I., HUANG T.S., MARSHALL M.R., 1991, *Application for Immunoassay food industry*, Crit. Rev. Food Science Nutrition, 29(6): s. 403-34. DOI: 10.1080/10408399109527535.
54. SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C., 2004. *Introduction to Food-Borne Fungi* [online], Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, [cit. 2017-02-03] Dostupné na: www.google.cz
55. SALAČOVÁ, L., FALTUSOVÁ Z., OVESNÁ J., 2015, *Jaké mechanismy využívají rostliny jako obranu proti houbovým patogenům*. Chemické listy. 2015, **109**, 613-618.
56. SCHINDLER J., 2008, *Ze života bakterií*, Praha, Nakladatelství Academia, 143 s., ISBN 978-80-200-1666-9.
57. SCHNEEWEISS, P., 2016, *Zpráva o výsledcích plánované kontroly cizorodých látek v potravinách v roce 2015*, Státní zemědělská a potravinářská inspekce: [online]. 2016 [cit. 2016-10-22]. Dostupné z: www.szpi.gov.cz
58. SMĚLÁ, D., 2015, *Sladká, ostrá, vcelku i mletá*. Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. 2015 [cit. 2016-10-23]. Dostupné z: www.szpi.gov.cz
59. STEINHAUSER, L., 1995, *Hygiena a produkce masa*, Brno LAST, 744 s. ISBN 80-900260-4-4.
60. ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J.: 2008, *Metody molekulární biologie*. Brno, Masarykova univerzita. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
61. TROJAN, V., 2009, *Sledování mikrobiálních kontaminací pomocí molekulárně biologických metod ve vybraných surovinách pro výrobu koření*, Diplomová práce

(nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin. Vedoucí práce prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.

62. TSUNG-CHE, TSENG, 1995, *Immunochemical Methods for Detection of Toxins and Pesticides*. In: RUDRA P. S., UMA S. S., 1995, *Molecular methods in plant pathology*, Lewis Publishers, 523 s., ISBN 0- 87371-877-1.
63. VANÍČEK J., CWIKOVÁ O., HOUDKOVÁ M.; 2010, *Systémy řízení jakosti a zdravotní nezávadnosti*. Učební text – rukopis verze 1. 92 s.
64. VOLDRICH M., 1999, *Také koření se falšuje*, In: Agrární noviny (Agroweb). ISSN: 1804-1930 online: www.agris.cz/
65. WALKER J. M. (ed.), 1984, *Methods in Molecular Biology: Volume 2, Nucleic Acids*. New Jersey, Humana Press. 375 s., ISBN 0-89603-064-4.
66. ZALAR, P; HOOG DE SYBREN G.; SCHROERS H.J.; FRANK J.M.; GUNDE-CIMMERMAN N., 2005, Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales.. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87 (4): 311–28. doi:10.1007/s10482-004-6783-x
67. ZAPLETAL O., RUPRICH J., DVOŘÁČKOVÁ D., NEPEJCHALOVÁ L., VRÁNOVÁ E., 2001, *Speciální veterinární toxikologie*. Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie. 148 s. 8073054035
68. WIESER A., SCHNEIDER L., JUNG J., SCHUBERT S.; 2012; *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review)*. In: Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 93: s. 965 – 974. DOI:10.1007/s00253-011-3783-4.

10. SEZNAM ZKRATEK

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

DON - deoxynivalenol

ELISA – enzyme linked immunosorbent assay

FASTA – Fast Alignment

GI – genetická informace

ITS – internal transcribed spacer

LAKR – léčivé, aromatické a kořeninové rostliny

MLR – maximální limit reziduí

MPN – most probable number

NMR – nuclear magnetix resonance (spektroskopy)

OTA - ochratoxin

PCR – polymerase chain reaction

RFLP – restriction fragment length polymorphism

RIA – radioimunologická analýza

ROS – reactive oxygen species

RT – PCR – real time polymerase chain reaction

T – 2 (TOXIN) – trichothecenový 2 (toxin)

11. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Vzoroký kořený papriky mleté a pepře černého

Příloha č. 2 – 12: Bezpečnostní listy kořený

Příloha č. 1





RUBIN
Spice Paprika Processing Szeged Ltd

Szerb str. 173., Szeged-Szoreg, 6771
Phone: (36) 62 558-390
Fax: (36) 62 405-120
E-mail: sales@rubinpaprika.hu
Web: www.rubinpaprika.hu

Quality Certificate

Pages: 1/1

Product information

Product:	40 ASTA spice paprika powder sweet		
Origin:	Hungary		
Date of production:	30.05.2016		
Best before:	08.12.2016		
Article No.:	PKA2K1105	Lot No.:	P1182

Delivery information

Buyer:	TRUMF International s.r.o.		
Quantity:	500 kg	Delivery note:	00924/16-SZ

Physical and chemical characteristics

(Results at the date of production)

Moisture content (%)	7,05
Colour content (ASTA)	49
Particle size(mm)	0,5

Microbiology characteristics

Salmonella/25g:	negativ
E.coli/g:	<10
Enterobacter./g:	<1000
Molulds/g:	<1000
Total plate count/g:	<100000

Sensory test:

The sensory characteristics meet the product features.

Storage conditions:

in dark, cool places protected from light, in closed packaging

Declarations:

The product is free from GMO and allergen materials

The product is free from additive colourings and free from the following foreign dyes: Sudan group (I, II, III, IV, red B -7B and G, orange B, black B), Bixin, Rhodamine B, Orange II, Toluidine red, Acid yellow, oil orange SS, 4-(dimethylamino) azobenzene, Auramine, p-Nitroaniline fast garnet GBC.


This product meets the requirements of the European Union Directives and regulations relating to pathogenic micro-organism, heavy metals, contaminants and pesticides.

The product is not treated by irradiation. The product is suitable for vegetarians.

In the case of authority sampling we lay claim to duplicate sample. Without authority duplicate sample all the responsibility lies with the Buyer.

09.06.2016

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szoreg, Szerb u. 173-175.
... E.U. VAT No. HU-081942-...
Budapesti Raktár Vrt.:
IBAN: HU07 1040 0501 0960 9900 01003300
SWIFT: BUDAHUHB

	RUBIN Spice Paprika Processing Szeged Ltd	Szerb str. 173., Szeged-Szoreg, 6771 Phone: (36) 62 558-390 Fax: (36) 62 405-120 E-mail: sales@rubinpaprika.hu Web: www.rubinpaprika.hu
	Quality Certificate	
Pages: 1/1		
Product information		
Product:	60 ASTA spice paprika powder sweet	
Date of production:	30.05.2016	
Best before:	08.12.2016	
Article No.:	PKA2K1107	Lot No.: P1183
Delivery information		
Buyer:	TRUMF International s.r.o.	
Quantity:	1000 kg	Delivery note: 00924/16-SZ
Physical and chemical characteristics		Microbiology characteristics
<i>(Results at the date of production)</i>		
Moisture content (%)	8,61	Salmonella/25g:
Colour content (ASTA)	68	E.coli/g:
Particle size(mm)	0,5	Enterobacter./g:
		Molulds/g:
		Total plate count/g:
		negativ
		<10
		<1000
		<1000
		<100000
Sensory test:		
	The sensory characteristics meet the product features.	
Storage conditions:		
	in dark, cool places protected from light, in closed packaging	
Declarations:		
	The product is free from GMO and allergen materials	
	The product is free from additive colourings and free from the following foreign dyes: Sudan group (I, II, III, IV, red B -7B and G, orange B, black B), Bixin, Rhodamine B, Orangè II, Toluidine red, Acid yellow, oil orange SS, 4-(dimethylamino) azobenzene, Auramine, p-Nitroaniline fast garnet GBC.	
	This product meets the requirements of the European Union Directives and regulations relating to pathogenic micro-organism, heavy metals, contaminants and pesticides.	
	The product is not treated by irradiation. The product is suitable for vegetarians.	
In the case of authority sampling we lay claim to duplicate sample. Without authority duplicate sample all the responsibility lies with the Buyer.		
09.06.2016	RUBIN Szegedi Paprikafeldolgozó Kft. H-6771 Szeged-Szoreg, Szerb u. 173-175. EU ID No. 1081942 Budapest Bank Nyrt.: IBAN: HU07 1010 0000 01003300 SWIFT: BUDAHUHB	



RUBIN
Spice Paprika Processing Szeged Ltd

Szerb str. 173., Szeged-Szoreg, 6771
Phone: (36) 62 558-390
Fax: (36) 62 405-120
E-mail: sales@rubinpaprika.hu
Web: www.rubinpaprika.hu

Quality Certificate

Pages: 1/1

Product information

Product: 100 ASTA spice paprika powder sweet
Origin: Hungary
Date of production: 08.06.2016
Best before: 08.12.2016
Article No.: PKC2K1121 Lot No.: P1184

Delivery information

Buyer: TRUMF International s.r.o.
Quantity: 2000 kg Delivery note: 00924/16-SZ

Physical and chemical characteristics

(Results at the date of production)

Moisture content (%) 9,33
Colour content (ASTA) 108
Particle size(mm) 0,5

Microbiology characteristics

Salmonella/25g: negativ
E.coli/g: <10
Enterobacter./g: <1000
Molulds/g: <1000
Total plate count/g: <100000

Sensory test:

The sensory characteristics meet the product features.

Storage conditions:

in dark, cool places protected from light, in closed packaging

Declarations:

The product is free from GMO and allergen materials
The product is free from additive colourings and free from the following foreign dyes: Sudan group (I, II, III, IV, red B -7B and G, orange B, black B), Bixin, Rhodamine B, Orange II, Toluidine red, Acid yellow, oil orange SS, 4-(dimethylamino) azobenzene, Auramine, p-Nitroaniline fast garnet GBC.
This product meets the requirements of the European Union Directives and regulations relating to pathogenic micro-organism, heavy metals, contaminants and pesticides.
The product is not treated by irradiation. The product is suitable for vegetarians.

In the case of authority sampling we lay claim to duplicate sample. Without authority duplicate sample all the responsibility lies with the Buyer.

09.06.2016

RUBIN
Szegei Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szoreg, Szerb u. 173-175.
EU ID No. 71081942
Budapesti Bank Nyrt.
IBAN: HU07 1010 2140 0000 0000 01003300
SWIFT: BUDAHUHB



RUBIN
Spice Paprika Processing Szeged Ltd

Szerb str. 173., Szeged-Szoreg, 6771
Phone: (36) 62 558-390
Fax: (36) 62 405-120
E-mail: sales@rubinpaprika.hu
Web: www.rubinpaprika.hu

Quality Certificate

Pages: 1/1

Product information

Product:	140 ASTA spice paprika powder sweet		
Origin:	Hungary		
Date of production:	08.06.2016		
Best before:	08.12.2016		
Article No.:	PKE2K1112	Lot No.:	P1185

Delivery information

Buyer:	TRUMF International s.r.o.		
Quantity:	1000 kg	Delivery note:	00924/16-SZ

Physical and chemical characteristics

(Results at the date of production)

Moisture content (%)	9,51
Colour content (ASTA)	141
Particle size(mm)	0,5

Microbiology characteristics

Salmonella/25g:	negativ
E.coli/g:	<10
Enterobacter./g:	<1000
Moulds/g:	<1000
Total plate count/g:	<100000

Sensory test:

The sensory characteristics meet the product features.

Storage conditions:

in dark, cool places protected from light, in closed packaging

Declarations:

The product is free from GMO and allergen materials

The product is free from additive colourings and free from the following foreign dyes: Sudan group (I, II, III, IV, red B -7B and G, orange B, black B), Bixin, Rhodamine B, Orange II, Toluidine red, Acid yellow, oil orange SS, 4-(dimethylamino) azobenzene, Auramine, p-Nitroaniline fast garnet GBC.

This product meets the requirements of the European Union Directives and regulations relating to pathogenic micro-organism, heavy metals, contaminants and pesticides.

The product is not treated by irradiation. The product is suitable for vegetarians.

In the case of authority sampling we lay claim to duplicate sample. Without authority duplicate sample all the responsibility lies with the Buyer.

09.06.2016

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged, Szerb u. 173-175.
ELŐKÖ: 11081942
..... Budapest Bank Nyrt.
IBAN: HU07 6010 2841 0960 9900 01003300
SWIFT: BUDAHUHB
Signature



RUBIN
Spice Paprika Processing Szeged Ltd

Szerb str. 173., Szeged-Szoreg, 6771
Phone: (36) 62 558-390
Fax: (36) 62 405-120
E-mail: sales@rubinpaprika.hu
Web: www.rubinpaprika.hu

Quality Certificate

Pages: 1/1

Product information

Product:	100 ASTA spice paprika powder Hot		
Origin:	Hungary		
Date of production:	23.06.2016		
Best before:	23.12.2016		
Article No.:	PKC4K1111	Lot No.:	P1830

Delivery information

Buyer:	TRUMF International s.r.o.		
Quantity:	2000 kg	Delivery note:	01023/16-SZ

Physical and chemical characteristics

(Results at the date of production)

Moisture content (%)	8,94
Colour content (ASTA)	101
Particle size(mm)	0,5

Microbiology characteristics

Salmonella/25g:	negativ
E.coli/g:	<10
Enterobacter./g:	<1000
Molulds/g:	<1000
Total plate count/g:	<100000

Sensory test:

The sensory characteristics meet the product features.

Storage conditions:

in dark, cool places protected from light, in closed packaging

Declarations:

The product is free from GMO and allergen materials

The product is free from additive colourings and free from the following foreign dyes: Sudan group (I, II, III, IV, red B -7B and G, orange B, black B), Bixin, Rhodamine B, Orange II, Toluidine red, Acid yellow, oil orange SS, 4-(dimethylamino) azobenzene, Auramine, p-Nitroaniline fast garnet GBC.

This product meets the requirements of the European Union Directives and regulations relating to pathogenic micro-organism, heavy metals, contaminants and pesticides.

The product is not treated by irradiation. The product is suitable for vegetarians.

In the case of authority sampling we lay claim to duplicate sample. Without authority duplicate sample all the responsibility lies with the Buyer.

23.06.2016

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged, Szerb u. 173-175.
EL ID: 118042
Budapest Bank Nyrt.:
IBAN: HU07 1010 2842 09609900 01003300
SWIFT: BUDAHUHB



RUBIN
Spice Paprika Processing Szeged Ltd

Szerb str. 173., Szeged-Szoreg, 6771
Phone: (36) 62 558-390
Fax: (36) 62 405-120
E-mail: sales@rubinpaprika.hu
Web: www.rubinpaprika.hu

Quality Certificate

Pages: 1/1

Product information

Product:	140 ASTA spice paprika powder sweet		
Origin:	Hungary		
Date of production:	23.06.2016		
Best before:	23.12.2016		
Article No.:	PKE2K1112	Lot No.:	P1831

Delivery information

Buyer:	TRUMF International s.r.o.		
Quantity:	3000 kg	Delivery note:	01023/16-SZ

Physical and chemical characteristics

(Results at the date of production)

Moisture content (%)	8,96
Colour content (ASTA)	142
Particle size(mm)	0,5

Microbiology characteristics

Salmonella/25g:	negativ
E.coli/g:	<10
Enterobacter./g:	<1000
Molulds/g:	<1000
Total plate count/g:	<100000

Sensory test:

The sensory characteristics meet the product features.

Storage conditions:

in dark, cool places protected from light, in closed packaging

Declarations:

The product is free from GMO and allergen materials

The product is free from additive colourings and free from the following foreign dyes: Sudan group (I, II, III, IV, red B -7B and G, orange B, black B), Bixin, Rhodamine B, Orange II, Toluidine red, Acid yellow, oil orange SS, 4-(dimethylamino) azobenzene, Auramine, p-Nitroaniline fast garnet GBC.

This product meets the requirements of the European Union Directives and regulations relating to pathogenic micro-organism, heavy metals, contaminants and pesticides.

The product is not treated by irradiation. The product is suitable for vegetarians.

In the case of authority sampling we lay claim to duplicate sample. Without authority duplicate sample all the responsibility lies with the Buyer.

23.06.2016

RUBIN
Szegedi Paprikafeldolgozó Kft.
H-6771 Szeged-Szoreg, Szerb u. 173-175.
EU ID NO: HUN
Signature
Budapest Bank Nyrt.:
IBAN: HU07 1010 2842 09609900 01003300
SWIFT: BUDAHUHB

Příloha č. 6



Certificate and declarations for black pepper Steam treated, delivered in container TEMU3380297/
 Certyfikaty i deklaracje dot. Pieprzu czarnego ziarno st., dostarczonego w kontenerze TEMU3380297
 Country of origin/Kraj Pochodzenia : Vietnam
 Lot number/ Nr Lotu: 037 CD-SR
 Polish health official protocol/Numer atestu Sanepidu: n/dot.. not applicable custom clearance in
 Germany

Appearance / Cechy wizualne	brown to black berries / Czarny – czarno brązowe ziarna	
Quality description / Jakość	Should not contain foreign admixtures nor mass increasing media/ bez zanieczyszczeń lub dodatków sztucznych . Wolny od t.zw. "Spent pepper" lub "pepper waste"	
Analysis at loading / Analiza Wyniki testów podczas załadunku w kraju pochodzenia.	moisture / Wilgotność max.12,5% (test result 12,4%) - etheric oils / Olejki Et. Min 2,5% (ASTA method 12.1) - Total foreign matter: < 0,5% (result 0,18% max) - piperine/piperyna ASTA 12.1: Min. 3,5% - bulk density / gęstość nasypowa 500 g/l	
Packaging / Opakowania	PP new bags , each of 25kg net weight / Nowe worki PP, każdy o 25kg netto	
Storage conditions/ warunki przechowywania	Keep in a dry room, at the temperature up to 20°C. (Temperature is recommended but not mandatory.)/ Przechowywać w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze do 20st. (temperatura ta jest zarekomendowana)	
Health suitability / Cechy Zdrowotne	1.1. Maximum allowed quantity of mycotoxins: according to Ordinance on maximum allowed quantity of given contaminants (Official Gazette no. 154/2008) with amendments and Commission Regulation (EC) No 1881/2006 with amendments./ Maks. Zawartość mikotoksin: zgodnie z normami UE nr. 1881/2006 z póź. Zm.	
Mycotoxins/ Mykotoksyny Whole Black & white pepper	Method/ Metoda	Results / Wyniki (µg/kg)
Aflatoxin B1	Ref. AOAC 2005.08 (2011) LC/MS/MS	N.D
Total aflatoxins B1+B2+G1+G2	Ref. AOAC 2005.08 (2011) LC/MS/MS	N.D
Ochratoxin A	AOAC 973.37	N.D

Microbiological analysis at loading point / Analiza Mikrobiologiczna podczas załadunku z kraju pochodzenia

	Unit	Results	Method / metoda
<i>Salmonella species/salmonela</i>	In 25g / w 25g	Absent / <i>nieobecna</i>	ISO 6579:2002

Příloha č. 7

Coliform	Cfu/g	<10	ISO 4832:2007)
E.Coli	Cfu/g	<10	ISO16649-2:2001)
Total Plate count/ O.L.D.	Cfu/g	<40000	ISO4833:2003)
Yeast & Mould/ Drozdze I pleśnie	Cfu/g	<10	ISO4832

Declaration of Health / Deklaracja Zdrowotna: we hereby declare that the goods shipped under this order are manufactured in accordance with the directive of the CODEX Alimentarius Commission / niniejszym deklarujemy , że dostarczony towar został wyprodukowany zgodnie z dyrektywami KOMISJI CODEX Alimentarius:

- These products do not contain any detrimental substance / nie zawierają szkodliwych substancji
- These products are manufactured under hygienic conditions / zostały wyprodukowane w higienicznych warunkach
- These products are qualified for human consumption/ są dobre dla konsumpcji ludzkiej

Declaration of non-radiation treatment/ Deklaracje o braku radiacji:

- We hereby confirm that the delivered goods under this order have not been treated with irradiation / deklarujemy , że dostarczony pieprz nie został poddany radiacji

Non GMO declaration / deklaracja non_GMO:

- We hereby certify that the goods delivered under this order were manufactured without using any Genetically Modified Organisms or methods/ potwierdzamy , że dostarczony towar jest wolny od GMO

Self Declaration for heavy metals/deklaracja dot. Metali ciężkich: We declare that true to our knowledge the cargo fulfils the EU directive 1881/2006 / Zgodnie z posiadaną wiedzą dostarczony towar spełnia rozporządzenie UE nr. 1881/2006.

Production/Expiry declaration / deklaracja dot. Daty produkcji i daty przydatności pod warunkiem składowania w warunkach idealnych dla tego towaru / The production date is 31st March 2016 and expiry date is : 31st July 2018 subject to storage under ideal conditions.

Above results and declarations are true, best to our knowledge and as presented by the Producers at the time of loading, however, these do not release the Buyers from obligation to re-check conformity of all the parameters in accordance to the rules applicable in their markets before putting the received cargo into production or resale. / W/w wyniki i deklaracje są prawidłowe zgodnie z posiadaną wiedzą oraz deklaracjami Producenta w momencie załadunku w kraju pochodzenia.

Any complaint related to this cargo must be made within 2 weeks from date of delivery and before placing cargo for re-sale or processing.

W/w wyniki i deklaracje nie zwalniają Kupującego od obowiązku kontrolowania wyników badań podanych w niniejszym dokumencie przed dalszą obróbką lub odsprzedażą dostarczonego towaru. Jakikolwiek reklamacje dot. Tej partii musze być wzniesione w ciągu 2 tygodni licząc od daty dostawy oraz zanim towar zostanie odsprzedany lub poddany dalszej obróbce.

PANKAJ SARAN SRIVASTAVA

Przewodzący

SARAN ENTERPRISES LTD.
Sp. z o.o.

02-970 Warszawa, ul. Zapłocie 17A
kom. 603 862 036
NIP 951 231 64 84, REGON 14248409r

Příloha č. 8

Microbiological analysis at loading point / Analiza Mikrobiologiczna podczas załadunku z kraju pochodzenia.

	Unit	Results
<i>Salmonella species/salmonella</i>	In 25g / w 25g	Absent / nieobecna
<i>E.Coli</i>	Cfu/g	<10
Total Plate count	CFU/g	<1x10 ⁶
Yeast & mould	CFU/g	<100

Declaration for Steam sterilization:

We guarantee that the goods were sterilized with steam and under pressure / Potwierdzamy, że towar został wysterylizowany parą wodną

Declaration of Health / Deklaracja Zdrowotna: we hereby declare that the goods shipped under this order are manufactured in accordance with the directive of the CODEX Alimentarius Commission / niniejszym deklarujemy, że dostarczony towar został wyprodukowany zgodnie z dyrektywami KOMISJI CODEX Alimentarius:

- These products do not contain any detrimental substance / nie zawierają szkodliwych substancji
- These products are manufactured under hygienic conditions / zostały wyprodukowane w higienicznych warunkach
- These products are qualified for human consumption/ są dobre dla konsumpcji ludzkiej

Declaration of non-radiation treatment/ Deklaracje o braku radiacji:

- We hereby confirm that the delivered goods under this order have not been treated with irradiation / deklarujemy, że dostarczony pieprz nie został poddany radiacji

Non GMO declaration / deklaracja non_GMO:

- We hereby certify that the goods delivered under this order were manufactured without using any Genetically Modified Organisms or methods/ potwierdzamy, że dostarczony towar jest wolny od GMO

Self Declaration for heavy metals/deklaracja dot. Metali ciężkich: We declare that true to our knowledge the cargo fulfils the EU directive 1881/2006 / Zgodnie z posiadaną wiedzą dostarczony towar spełnia rozporządzenie UE nr. 1881/2006.

Production/Expiry declaration / deklaracja dot. Daty produkcji i daty przydatności pod warunkiem składowania w warunkach idealnych dla tego towaru / The production date is 23.10.2015 and expiry date is : 22.10.2017 subject to storage under ideal conditions.

Above results and declarations are true, best to our knowledge and as presented by the Producers however, these do not release the Buyers from obligation to re-check conformity of all the parameters in accordance to the rules applicable in their markets before putting the received cargo into production or resale. / W/w wyniki i deklaracje są prawidłowe zgodnie z posiadaną wiedzą oraz deklaracjami Producenta w kraju pochodzenia.