

- CHLÁDEK, G., HANUŠ, O., FALTA, D., KOMZÁKOVÁ, I., JEDELSKÁ, R., HERING, P., KRÁLÍČEK, T. (2009b): Kontrola užítkovosti v systémech robotizovaného dojení krav. Milk recording of dairy cows milked using the automatic milking system. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, 11, 188 (4), s. 3-11.
- JANŮ, L., HANUŠ, O., BAUMGARTNER, C., MACEK, A., JEDELSKÁ, R. (2007): The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 10 (3), s. 74-85.
- KOPEC, T., CHLÁDEK, G., KUČERA, J., FALTA, D., HANUŠ, O., ROUBAL, P. (2013): The effect of the calving season on the Wood's model parameters and characteristics of the lactation curve in Czech Fleckvieh cows. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, 56 (80), s. 808-815.
- KOPEC, T., CHLÁDEK, G., KUČERA, J., FALTA, D., VEČEŘA, M., HANUŠ, O. (2021): The effect of extended lactation on parameters of Wood's model of lactation curve in dairy Simmental cows. *Animal Bioscience*, 34 (6), s. 949-956. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0347>
- LEXER, D., HAGEN, K., PALME, R., TROXLER, J., WAIBLINGER, S. (2009): Time budgets and adrenocortical activity of cows milked in a robot or a milking parlor: Interrelationships and influence of social rank. *Animal Welfare*, 18, s. 73-80.
- OLOFSSON, J., WIKTORSSON, H. (2001): Competition for total mixed diets fed restrictively using one or four cows per feeding station. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A – Animal Science*, 51 (1), s. 59-70.
- PARANTHOS DA COSTA, M. J. R., BROOM, D. M. (2001): Consistency of side choice in the milking parlour by Holstein-Friesian cows and its relationship with their reactivity and milk yield. *Applied Animal Behaviour Science*, 70 (3), s. 177-186.
- PHILLIPS, C.J.C AND RIND, M.I. (2002): The effects of social dominance on the production and behaviour of grazing dairy cows offered forage supplements. *Journal of Animal Science*, 85 (1), s. 51-59.
- POLIKARPUS, A., KAART, T., KOKIN, E., VEERMÄE, I., POIKALAINEN, V. (2011): Automatic monitoring of milking order in a large loose housing cowshed. In: *Animal Hygiene and Sustainable Livestock Production: Proceedings of the XVth International Congress of the ISAH*. Vienna, Austria, s. 329-332.
- RATHORE, A. K. (1982): Order of cow entry at milking and its relationship with milk yield and consistency of the order. *Applied Animal Ethology*, 8 (1-2), s. 45-52.
- RAUBERTAS, J. K., SHOOK, G. E. (1982): Relationship between lactation measures of SCC and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 65, s. 419-425.
- REINHARDT, V. (1973): Social rank order and milking order in cows. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 32 (3), s. 281-292.
- RENEAU, J. K., APPLEMAN, R. D., STEUERNAGEL, G. R., MUDGE, J. W. (1983, 1988): *Somatic cell count. An effective tool in controlling mastitis*. Agricultural Extension Service, University of Minnesota, AG-FO-0447.
- RENEAU, J. K. (1986): Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 69, s. 1708-1720.
- RIND, M. I., PHILLIPS, C. J. C. (1999): The effects of group size on the ingestive and social behaviour of grazing dairy cows. *Animal Science*, 68 (4), s. 589-596.
- SAMBRAUS, H. H., FRIES, B., OSTERHORN, K. (1979): Social relationships in a herd of dehorned dairy cattle. *Animal Behaviour Abstracts*, 7, s. 228.
- SHOOK, G. E. (1982): *Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability*. National Mastitis Council, Louisville, Kentucky, s. 1-17.
- SOFFIE, M., THINES, G., DE MARNEFFE, G. (1976): Relation between milk order and dominance value in a group of dairy cows. *Applied Animal Ethology*, 2 (3), s. 271-276.
- STEFANOWSKA, J., PLAVSIC, M., IPEMA, A. H., HENDRIKS, M. M. (2000): The effect of omitted milking on the behaviour of cows in the context of cluster attachment failure during automatic milking. *Applied Animal Behaviour Science*, 67 (4), s. 277-291.
- TICHÁČEK, A., BENDA, P. (1991): Proti mastitidám. *Zemědělec*, 4.
- TICHÁČEK, A., BENDA, P., HANUŠ, O., JEDELSKÁ, R. (1996): Účinný kontrolní mastitidní program – zkušenosti z poradenství. Kontrola mastitid při produkci mléka: sborník referátů VÚCHS Rapotín, s. 64-83.
- VARLYAKOV, I., TOSSEV, A. (1989): Behaviour of cows observed at milking parlour. In: *Proceedings of International Symposium Ethology of Farm Animals*. Eberswalde-Finow: Eberswalde Tierhygiene-Information, s. 3-8.
- VARLYAKOV, I., TOSSEV, A. (1990): Investigation on milking reflex in milking parlour "Herringbone" type. In: *Proceedings of Scientific Session on Faculty of Animal Science*, Stara Zagora, 1.
- VARLYAKOV, I., RADEV, V., SLAVOV, T., GRIGOROVA, N. (2011): Behaviour of cows in milking parlour. *Agricultural Science and Technology*, 3 (2), s. 107-111.
- WENDT, K. et al. (1994): *Zu hoher Zellgehalt in der Herdensammelmilch – wie kann geholfen werden?* AG Melken und Melktechnik, Informationszentrum WGM, e. V.
- WIGGANS, G. R., SHOOK, G. E. (1987): A lactation measure of somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 70, 2666-2672.

**Korespondující autor:** Mgr. Vendula Renčínová, Ph.D.  
Chovatelské družstvo Impuls, Bohdalec 122,  
592 55 Bobrová, e-mail: [vendula.rencinova@seznam.cz](mailto:vendula.rencinova@seznam.cz)

Přijato dne: 27. 4. 2022  
Lektorováno: 21. 5. 2022

## IDENTIFIKACE DRUHŮ ASPERGILLUS SP. Z MLÉKAŘSKÝCH MATRIC A PROVOZŮ A JEJICH REGULACE POMOCÍ KMENŮ LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM

Miloslava Kavková, Jaromír Cihlář, Vladimír Dráb,  
Olga Bazalová a Zuzana Dlouhá  
Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.; Praha

Identification of *Aspergillus* sp. in dairy matrices and environment and its suppression by using *Lactiplantibacillus plantarum* strains

### Abstrakt

Zástupci rodu *Aspergillus* sp. jsou celosvětově rozšířené houbové organismy, které díky své metabolické aktivitě, kompetičním vlastnostem a obrovské reprodukční kapacitě osidlují různé substráty ve všech klimatických zónách a ekosystémech. V potravinářském a krmeném průmyslu jsou za nežádoucí považovány zejména druhy produkující mykotoxiny jako je např. *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*. V mlékárenských provozech se vyskytuje však řada dalších druhů, které také produkují sekundární metabolity a mohou znehodnocovat mléčné produkty. Ochrana provozů a produktů spočívá především v preventivních a sanitárních opatřeních, která nemusí být vůči těmto kontaminantům efektivní. Vzhledem k současným trendům, které cílí na potraviny bez chemických

konzervantů, jsme se zaměřili na biologickou ochranu mléčných produktů založenou na antifungální aktivitě kmenů *Lactiplantibacillus plantarum*. V rámci této studie bylo z mlékárenských provozů získáno deset čistých kultur aspergilů, které byly identifikovány klasickými kultivačními postupy a tzv. barkódováním. Vůči těmto izolátům/kmenům byla testována antifungální aktivita čtrnácti izolátů a kmenů *L. plantarum* na umělých médiích a na médiích s mlékem. Také byl hodnocena tolerance aspergilů k obsahu soli v médiu a citlivost vůči produktům *L. plantarum*. Nejeftektivnější antifungální účinek vykazovaly kmeny *L. plantarum* původem z kvasů a ze siláží. Na potlačení růstu aspergilů měl významný vliv přídavek bezbuněčných filtrátů z *L. plantarum* do kultivačního média. Významný supresivní účinek vykazovaly také kmeny *L. plantarum* nakultivované v obnoveném mléce a přidané takto do kultivačního média. Druhy aspergilů, které se nacházejí v sýrárnách jako součást solných lázní, jsou citlivější vůči produktům *L. plantarum* a tolerují vyšší obsah soli, na rozdíl od ubikvitních druhů, jako je *A. niger* a *A. flavus*.

**Klíčová slova:** kontaminace, barkóding, *Aspergillus* sp., antifungální účinek, *Lactiplantibacillus plantarum*

## Abstract

The genera *Aspergillus* sp. are worldwide spread fungal organisms that inhabit various substrates in all the climatic zones and ecosystems because of its metabolic activity, competitive properties and huge reproductive capacity. Particularly the species that produce mycotoxins such as *A. niger*, *A. flavus* and *A. parasiticus* are undesirable in the food and feed industry. The dairy plants are inhabited by other species belonging to *Aspergillus* sp. that also produce secondary metabolites including proteolytic enzymes thus it can spoil the dairy products. The protection of the dairy environment in dairy plants is based on preventive and sanitary controls that might not be effective against fungal contaminants. Considering current trends aimed to green label food without chemical preservatives we decided to test the biological control of aspergilli based on antifungal activity of *Lactiplantibacillus plantarum*. In the scope of this study, ten species of the aspergilli were isolated and identified from the dairy environment and products by using classical cultivation and molecular methods. The antifungal activity of fourteen isolates of *L. plantarum* against these aspergilli was evaluated. The most effective suppressive effect performed the *L. plantarum* strains originated from silage and sourdoughs. The growth of *Aspergillus* sp. was significantly limited by cell free supernatants from *L. plantarum* in artificial medium. The adjunct of reconstituted milk with *L. plantarum* strains into media also significantly influenced the growth of aspergillus colonies. The *Aspergillus* sp. occurred in cheese manufactures and salt baths are more sensitive against metabolite products of *L. plantarum* and tole-

rates higher levels of salt compared to ubiquitous species such as *A. niger* and *A. flavus*.

**Keywords:** contaminants, barcoding, *Aspergillus* sp., antifungal effect, *Lactiplantibacillus plantarum*

## Úvod

Houbové organismy jsou díky své specifické fyziologii a metabolismu schopny úspěšně osidlovat různé niky, možit se a šířit v rámci všech ekosystémů. Hrají nezastupitelnou roli při rozkladu a recyklaci organických i anorganických materiálů. Z hlediska trofických vztahů zahrnují symbiotické druhy (např. mykorhizní houby), saprofytické druhy (např. *Penicillium* sp.) a obligátně nebo fakultativně parazitické druhy (např. entomopatogenní houby). U řady druhů je známý dvojitý způsob života tzn. že mají schopnost žít jako saprofyt i jako symbionti, anebo parazité. Tato trofická rozmanitost je výsledkem složitých evolučních pochodů a adaptačních mechanismů hub, podmíněných celou řadou genů. Houbové organismy jsou nedílnou součástí dějin lidstva, ať už jako organismy prospěšné, využívané k výrobě a produkci potravin, nápojů, organických kyselin a látky využívané v léčitelství a farmacii, nebo jako nežádoucí kontaminanty potravin, patogenní nebo parazitické agens.

V potravinářském a krmivářském průmyslu je celosvětově, z důvodu ekonomických ztrát a zdravotních rizik, považován za jeden z nejzávažnějších kontaminantů rod *Aspergillus* sp.. Kromě senzorickeho a výživového znehodnocení potravin, je významným doprovodným faktorem také produkce toxických a alergenních metabolitů, mykotoxinů, případně, s ohledem na imunodeficientní osoby, také možnost mykotické infekce. Produkce mykotoxinů je známá u řady druhů rodu *Aspergillus* sp. (Ráduly a kol., 2020). Ačkoliv tyto mykotoxinogenní druhy kontaminují produkci obilovin, rýže a kukuřice zejména v tropických a subtropických oblastech, globální oteplování a celosvětový trh umožňuje nežádoucí šíření mykotoxigenních druhů aspergilů i do Evropských zemí (Garnier a kol., 2017; Udovicki a kol., 2018). Kontrola kvality dovážených obilovin a produktů do zemí EU spadá pod nařízení Evropské unie (EC 1881/2006). Pro mléčné výrobky, do kterých se mykotoxiny mohou dostat z mléka kontaminovaného přes potravní řetězec, jsou stanovené mykotoxiny (aflatoxin A1, B1) rovněž stanovené limity v rámci nařízení EU 1881/2006.

Rod *Aspergillus* sp. zahrnuje více než 180 anamorfních stádií, které se rozmnožují výhradně nepohlavně a produkují masy spór, snadno se šířících vzduchem i vodou. Řada druhů vykazuje toleranci k solím, organickým kyselinám, nízké vodní aktivitě (aw) a teplotě (Samson a kol., 2010). Kontaminace mléčných výrobků rodem *Aspergillus* sp. pocházejí z různých zdrojů. Zdrojem kontaminace mléčných výrobků, zejména v případě druhů *A. flavus*, *A. niger*, může být vzduch (Géry a kol., 2021). Ke kontaminaci sýrů různými druhy aspergilů dochází během solení v solných lázní a nálevech (Bokulich

a kol., 2013; Garnier a kol., 2017). V mléčných výrobcích se mohou aspergily vyskytovat jako nahodilé kolonie na povrchu produktu zpravidla v souvislosti se vzdušnou kontaminací či nedostatečnou ochrannou atmosférou obalu. Může docházet také k systemické kontaminaci celé výroby v souvislosti s kontaminovanou solnou lázní či nálevem. Charakter a zabarvení kolonie je druhově specifické. V současné literatuře jsou také relevantní odkazy na fungální biofilmy, tvořené buď výhradně aspergily (Morelli a kol., 2021) nebo komunitami aspergilů a dalších druhů plísní a kvasinek (Siqueira a kol., 2013; Subroto a kol., 2022). Takovéto biofilmy jsou součástí různých méně přístupných částí mlékárenských zařízení (vany, spáry dlaždic, potrubí). Identifikace druhů aspergilů z biofilmů a kontaminovaných produktů vyžaduje polyfázický přístup, tj. kombinaci klasických kultivačních a molekulárních metod. Kultivace stěrů/vzorku biofilmu na kultivačních médiích umožňují získat čistou kulturu a její morfologický popis (Samson a kol., 2010) a následně mikroskopický popis morfologických struktur. Molekulární metody identifikace druhů *Aspergillus* sp. nejsou založené pouze jen na sekvencích běžně užívaného regionu ITS (úsek jaderné DNA kódující krátké části RNA malé a velké ribozomální podjednotky obsahující vnitřní přepisované distanční sekvence) (Schoch a kol., 2012). Pro přesnější identifikaci se využívá tzv. DNA barkódování, tedy sekvenování více standardizovaných taxonomicky relevantních úseků DNA markerů (beta-tubulinu (*BenA*), kalmodulinu (*CaM*), aktinu (*Act*) a dalších) a porovnání získaných sekvencí se sekvencemi v on-line databázích (Stiellow a kol., 2015).

Prevence výskytu plísní v mlékařství je založená na implementaci HACCP systému ochranných a preventivních opatření a sanitacním programu. Metody ochrany mléčných produktů vůči fungálním kontaminantům spočívají v jejich částečné či úplné inhibici za použití chemických ochranných konzervantů, fyzikálních metod, jako je ochranná atmosféra balených produktů, chlazení nebo naopak zahřátí na vysokou teplotu nebo vysokotlaké ošetření. Kromě uvedených způsobů ochrany jsou testovány a uváděny do praxe možnosti biologické ochrany potravin, založené na interakcích (antibióza, kompetice) mezi mikroorganismy a houbovými organismy, nebo na jejich metabolických produktech, které mohou mít antifungální účinky. Jednou z možností je využití bakterií mléčného kvašení (BMK) s ověřeným antifungálním účinkem. V rámci fermentačního procesu BMK vznikají organické kyseliny, diacetyl acetoin a peptidy, které, jak bylo potvrzeno v mnoha studiích (Kavková a kol., 2022; Salas a kol., 2018; George a kol., 2018; Garcia-Cano a kol., 2019), inhibují růst a vývoj houbových organismů. Produkce těchto látek je podmíněna geny, faktory prostředí a je kmenově specifická (Scano a kol., 2021; Palla a kol., 2020). Bioprotektivní účinky BMK představují

souhrn funkčních vlastností, z nichž na začátku testování kmenů BMK vůči fungálním kontaminantům je antifungální aktivita ověřená *in vitro* a v potravinové matrici. V současné době existuje na trhu několik produktů založených na protektivních bakteriálních kulturách *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *L. paracasei*, *Propionibacterium freidenreichii*. Jedním z vhodných druhů BMK, úspěšně testovaných v mnoha studiích je také *Lactiplantibacillus plantarum*. Kmeny *L. plantarum* na základě svých funkčních vlastností mohou zvyšovat bezpečnost a kvalitu potravin a poskytovat další zdravotní benefity pro konzumenty (Scano a kol., 2021; Behera a kol., 2018; Raveschot a kol., 2018). Kmeny *L. plantarum* byly již v několika studiích testovány vůči řadě fungálních kontaminantů, včetně aspergilů kontaminujících potraviny, ale v jednalo se výhradně o druhy *A. niger* (Dallagnol a kol., 2019), *A. flavus* (Živkovic a kol., 2019; Zhao a kol., 2019; Li a kol. 2020), *A. parasiticus* (Luz a kol., 2017; Poornachandra Rao a kol., 2017), *A. carbonarius* (Djossou a kol., 2011) a *A. nidulans* (Ström, 2005). V prostředí mlékáren se však vyskytuje i řada dalších druhů aspergilů, které mohou příležitostně kontaminovat a znehodnocovat mléčné výrobky. Cílem studie bylo izolovat a identifikovat aspergily z prostředí mlékáren a mléčných výrobků a otestovat antifungální aktivitu kmenů a izolátů *Lactiplantibacillus plantarum* vůči aspergilům ve formě bezbuněčných supernatantů a živých buněk v mléčné matrici.

## Materiál a metody

### 1. Izolace a identifikace aspergilů

Izolace fungálních kontaminantů ze sýrů, solných lázní a stěrů probíhala podle standardních mikrobiologických postupů (Samson a kol., 2010). Čisté kultury byly identifikovány na základě makromorfologie kolonií na médiích uvedených v tabulce 1, mikromorfologie morfologických struktur pomocí světelného mikroskopu Olympus BX 43 (Tokyo, Japonsko) a dle DNA analýz.

Izolace DNA byla prováděna rychlou metodou alkalické lýze (Kavková a kol., 2021). PCR amplifikace regionu ITS i sekundárních markerů pro barkódovou analýzu probíhaly za použití primerů a reakčních pod-

**Tab. 1** Přehled půd a kultivačních metod použitých při izolaci a kultivaci fungálních kontaminantů

Houbový organismus	Médium	Původ	Reference	Kultivace
Plísně	MEA, CYA (Czapek Yeast Agar), CREA (Creatin Agar), YES (Yeast Extract Saccharose)	MERCK KGaA, Německo, MILCOM a.s., Česká republika	Samson a kol., 2010	5 dní, aerobní, při 25 °C
	DG18	BDH, Prolabo, Německo	Samson a kol., 2010	Aerobní kultivace, teplotní podmínky dle druhu viz. mikroskopický obraz
	SNF	MILCOM a.s., Česká republika	Andrews a Pitt, 1986	
Toxigenní plísně (např. <i>Fusarium</i> sp.)	DCPA	Hi-media, Indie	Samson a kol., 2010	
	PDA			



Tab. 2 Molekulární markery použité pro DNA barkóding

region DNA	primery	sekvence (5' → 3')	zdroj	doporučené podmínky reakce
BenA	BT2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass a Donaldson, 1995	95 °C, 300 s; 35x (95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 60 s); 72 °C, 300 s
	BT2b	ACCCTCAGTGAGTGACCCCTGGC		
CaM	CMD5	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	Hong a kol., 2006	95 °C, 300 s; 35x (95 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 60 s); 72 °C, 300 s
	CMD6	CCGATAGAGGTCATAACGTGG		
Act	ACT-512F	ATGTGCAAGCCGGTTTGGC	Carbone a Kohn, 1999	95 °C, 300 s; 35x (95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 60 s); 72 °C, 300 s
	ACT-783R	TACCAGTCTCTGGCCCAT		
ITS	ITS1F	CTTGGTCATTAGAG	Gardes a Bruns, 1993; White a kol., 1990	95 °C, 300 s; 35x (95 °C, 30 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 80 s); 72 °C, 300 s
	ITS4	TCCTCCGCTATTGATATGCa		

míně uvedených v tabulce 2. V případě, že PCR reakce neproběhly, nebo proběhly nestandardně, byly podmínky PCR reakce dále optimalizovány pomocí gradientu teplot. Rovněž byly zkoušeny různé koncentrace templátové DNA vstupující do reakce. Jako sekvenční primery byly použity příslušné forward primery.

Získané nukleotidové sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v on-line databázích (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://its.mycologylab.org/>), na základě čehož byly vzorky identifikovány. Pro snazší vizualizaci výsledků identifikací byly konstruovány fylogenetické stromy. Získané sekvence byly vloženy do datasetů (pro každý marker jeden) a společně s kompatibilními sekvencemi z databáze NCBI byly alignovány (zarovnány) v programu SeaView (Gouy a kol., 2010) algoritmem Muscle (Edgar, 2004). Výsledný alignment byl zkrácen o vzniklé mezery a byly na něm provedeny fylogenetické analýzy metodou maximální pravděpodobnosti (ML), modelem GTR, s bootstrapovou podporou ze sta opakování, programem PhyML v3.1 (Guindon a kol., 2010). Pro finální grafické zpracování výsledků identifikací byl zkonstruován konkatenovaný (řetězený) dataset obsahující zkrácené sekvence všech amplifikovaných markerů skládané za sebou na kterém následně proběhla fylogenetická analýza výše uvedeným způsobem (obrázek 1).

## 2. Tolerance druhů *Aspergillus* sp. k obsahu soli

Druhy rodu *Aspergillus* sp. byly izolovány z mlékařských a pekárenských provozů a matric. Po genomické analýze byly na základě barkódování identifikovány, morfologicky popsány na definovaných médiích (Samson a kol., 2010) a uloženy ve sbírce CCDBC (MILCOM a.s., CZ). Druhy *A. niger*, *A. flavus* byly na vyžádání získány ze sbírky CCF (UK, Praha, CZ) (Tabulka 3). Kmeny aspergilů byly nakultivovány na médiu MEA (MERK, Německo) (Tabulka 1). V Ringerově roztoku (Sigma Aldrich, Německo) byly připraveny suspenze o koncentraci spór  $1 \times 10^5 \times \text{ml}^{-1}$ . Ředění bylo upraveno podle přepočtu v Bürkerově komůrce (Inglis a kol., 2011). Byly připraveny půdy MEA s obsahem soli 0-5-10-15-20 % NaCl. Po zatuhnutí půd na Petriho miskách byla do středu kápnuta kapka (20  $\mu\text{l}$ ) suspenze spór příslušného druhu. Petriho misky byly uloženy v termostatu a kultivovány při 25 °C po dobu 7 dní. Po této době byl měřen a hodnocen radiální růst fungální kolonie. Od každého

druhu byla nakultivována tři opakování. Data byla zpracována analýzou variance (ANOVA) Statistica Software (Tulsa, USA) při  $\alpha \leq 0,05 \leq p$ .

## 3. Testování antifungální aktivity kmenů *L. plantarum* vůči *aspergilům*

K testování antifungální aktivity *L. plantarum* byly použity druhy aspergilů (Tabulka 3), jejichž taxonomická příslušnost vychází z výše uvedené metody barkódování a je uvedena v Tabulce 6 ve výsledkové části.

Tab. 3 Seznam kmenů a izolátů rodu *Aspergillus* sp. izolovaných z mlékařských a pekařských matric

Rod a druh	Akronym sbírky			
<i>Aspergillus</i>	CCDBC	CCF	izolát	Kultivace
<i>montevidensis</i>	338			25 °C CYA, MEA, DG18, YES
<i>tabacinus</i>			AT	
<i>cibarius</i>	318			
<i>versicolor</i>	321			
<i>flavus</i>		1838		
		3170		
<i>niger</i>		3264		
		3282		
<i>unguis</i>			AU	

Izoláty a kmeny *L. plantarum* pocházejí ze sbírky CCDM a pracovních sbírek projektů VÚM. Jedná se o izoláty z mlékařských a pekařských matric a ze siláží

Tab. 4 Seznam kmenů *Lactiplantibacillus plantarum* a jejich původ

<i>L. plantarum</i>	CCDM	Původ
K19-1	3030	Kvas
K19-2	3031	
K19-3	3048	
K20-4	3049	
CCDM3018	3018	Siláž
CCDM 185	185	
CCDM 191	191	
CCDM 196	196	
L12	1091	Livanjský sýr
L16	1092	
L17	434	
L24	1094	
L32	1095	Lidského původu
CCDM375	375	

(Tabulka 4). Taxonomická příslušnost použitých kmenů, včetně přístupových kódů k DNA sekvencím jednotlivých kmenů je uvedena v Kavková a kol. 2022. Kmeny jsou uchovávány v lyofilizované formě, oživovány v 16 % obnoveném mléce (RSM) a nadále uchovávány v MRS bujónu. Kultivace kmenů probíhá v MRS při 30 °C 24 h.

## Antifungální testy

### Difúzní test s 20 % a 30 % filtrátu *L. plantarum* na MEA

Laktobacily byly kultivovány v 50mL falkonách v MRS+FGGM za účelem intenzivní produkce funkčních metabolitů, jako jsou krátkořetězcové organické kyseliny (mléčná, octová) a antimikrobiální a antifungální peptidy a proteiny (Abassilias a kol., 2017; Kavková a kol., 2022). Po 27 h kultivaci byly kultury laktobacilů centrifugovány (12 tis RPM/10 minut). Supernatant byl přefiltrován přes mikrobiální filtr o velikosti pórů 2,2µm (CHROMAFIL®, Macherey-Nagel, Německo). Do vytemperovaného média (47 °C) MEA bylo přidáno odpovídající množství filtrátu tak, aby byly dosaženy podíly 20 % a 30 % (v/v). Médium bylo nalito na Petriho misky a po zatuhnutí byla nanášena do středu kapka suspenze spór (20 µL), ( $1 \times 10^5 \times \text{ml}^{-1}$ ) jednotlivých druhů aspergilů. Kromě měření růstu kolonie (mm) byl sledován celkový vývoj na základě indexové stupnice (Tabulka 5), tj. zda spóra naklíčí, jak se bude vyvíjet mycelium a zda dojde ke sporulaci, tj. bude-li se za daných podmínek kmen šířit. Experiment byl třikrát

**Tab. 5** Stupnice hodnocení růstu aspergilů na médiu s 30 % a 20 % obsahem filtrátu

stupnice	definice
1	nic
2	redukované mycelium
3	vzdušné mycelium
4	sporulace

**Tab. 6** Přehled identifikací na základě použitých markerů. (Aktin není pro *Aspergillus* sp. standardizovaný barkód a pro většinu vzorků tedy nejsou v databázích uloženy odpovídající sekvence)

Vzorek/CCDBC	ITS	<i>BenA</i>	<i>Cmd</i>	<i>Act</i> (nestandardizovaný)
F20/321	<i>A. versicolor</i>	<i>A. fructus</i>	<i>A. fructus</i>	není v DB
F25	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>
F36/318	<i>A. cibarius</i>	<i>A. cibarius</i>	<i>A. cibarius</i>	není v DB
730	<i>A. melleus/A. unguis</i>	<i>A. unguis</i>	<i>A. unguis</i>	<i>A. unguis</i>
1f/AT	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. tabacinus</i>	není v DB
M20-1/338	<i>A. chevalieri/ montevid. / amstelodami</i>	<i>A. montevidensis / amstelodami</i>	<i>A. montevidensis / amstelodami</i>	není v DB
1172A	<i>A. chevalieri/ montevid. / amstelodami</i>	<i>A. montevidensis / amstelodami</i>	<i>A. montevidensis / amstelodami</i>	není v DB
Asp_mad/AU	<i>A. melleus/A. unguis</i>	<i>A. unguis</i>	<i>A. unguis</i>	<i>A. unguis</i>
Ni326	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	není v DB
Pe3282/CCF3282	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	není v DB
FI3170/CCF3170	<i>A. niger/A. foetidus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	není v DB
FI1838/CCF1838	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	není v DB
Bio2039-4	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	není v DB
Ch1A/318	<i>A. pseudoglaucus/ A. cibarius</i>	<i>A. cibarius</i>	<i>A. cibarius</i>	není v DB

ITS – region jaderné ribosomální DNA, *BenA* – β tubulin, *Cmd* – calmodulin, *Act* – aktin

opakován. Data byla zpracována analýzou kovariance (ANCOVA), kde procentické zastoupení filtrátu v médiu bylo bráno jako kovariát (Statistica Software v 12.1.).

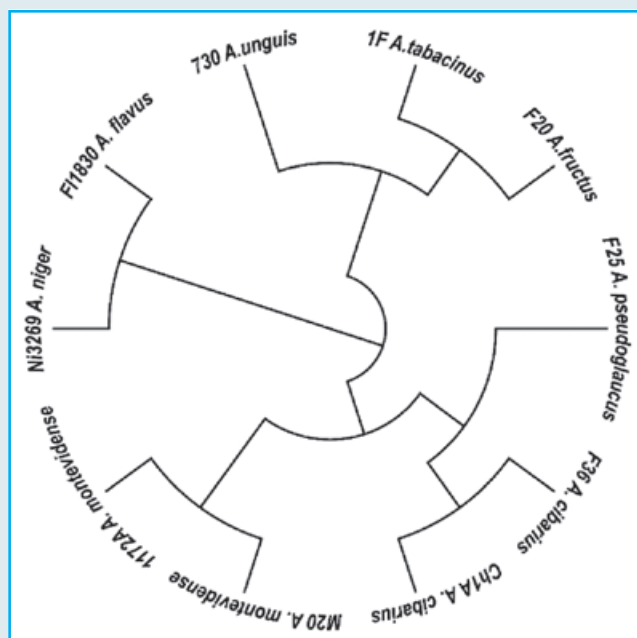
### Difúzní test s obsahem *L. plantarum* v 10 % RSM (modifikace Tropcheva a kol., 2014)

RSM (10 %) bylo zaočkováno laktobacily a kultivovalo při 30 °C 24 h. Sražené mléko s laktobacily bylo smícháno s vytemperovaným MEA agarem (45 °C), tak abychom dosáhli 20 % a 30 % podílu sraženého mléka v médiu (RSM/MEA). Takto připravené médium bylo rozlito na Petriho misky. MEA smíchaná pouze s mlékem představovala kontrolní variantu č. 1 a MEA bez jakéhokoliv přídavku kontrolu č. 2. Na zatuhlé médium byla nanášena do středu misky kapka suspenze spór ( $1 \times 10^5 \times \text{ml}^{-1}$ ) (5µL). Zaočkované Petriho misky byly uloženy v termostatu (25 °C). Růst kultur byl pravidelně sledován po denně po dobu 10 dní. Růst bodové kolonie byl porovnáván s kontrolami, byl měřen průměr kolonií a sledována tvorba inhibiční zóny. Experiment byl třikrát opakován. Data byla zpracována analýzou kovariance (ANCOVA), kde procentické zastoupení filtrátu v médiu bylo bráno jako kovariát (Statistica Software v 12.1.).

## Výsledky a diskuze

### 1. Izolace a identifikace

Izoláty (Tabulka 6) byly podle sekvencí ITS identifikovány jako rod *Aspergillus* sp.. Na základě literatury byly vybrány a sekvenovány nejběžněji používané sekundární markery (*BenA*, *CaM*) (Samson a kol., 2014; Koscubé a kol., 2016). Jako doplňující sekundární marker jsme vybrali aktin (*Act*). Tento marker není standardizovaným barkódovým genem pro rod *Aspergillus*, ale osvědčil se nám při analýzách příbuzného rodu *Penicillium*. Byly získány sekvence markerů: *BenA* – 400 bp, *Cmd* – 500bp a *Act* – 160-300 bp. Většina vzorků vykazovala stejné taxonomické zařazení u všech vybraných markerů



**Obr. 1** Grafické zpracování výsledků molekulárních identifikací. ML kladogram konstruovaný na základě *BenA* a *ITS* konkatenovaného datasetu. Pro vyšší přehlednost byly odstraněny duplicitní zástupci rodů *A. unguis*, *niger* a *flavus*.

(Tabulka 6). Taxonomické určení vzorku F20 na základě *BenA* a *Cmd* se lišilo od prvotního určení na základě *ITS*, ale na základě fylogenetických analýz konkatenovaného datasetu jsme tento vzorek identifikovali jako *A. fructus* (Obrázek 1). Dalším vzorkem, u kterého se taxonomické zařazení lišilo v závislosti na použitém markeru byl vzorek F25. *ITS* a *Cmd* sekvence tento vzorek určily jako *A. pseudoglaucus*, zatímco *Cmd* sekvence odpovídala spíše *A. tabacinus*. V tomto případě ke správnému určení pomohla sekvence *Act*, která byla na základě porovnání s databázemi identifikována jako *A. pseudoglaucus*. Speciálním případem byly vzorky M20-1 a 1172A, které byly na základě *ITS* nejednoznačně určeny jako *A. chevalieri/amstelodami/montevicensis*. Podle sekvencí *BenA* a *Cmd* byl okruh zařazení zúžen na *A. montevicensis* nebo *A. amstelodami*. Ačkoliv se oba izoláty sekvenčně nepatrně liší, na základě fylogenetických analýz oba nejvíce odpovídají *A. montevicensis*. Sekvence aktinu nebyly zařazeny do konkatenovaného datasetu a jeho fylogenetických analýz (Obrázek 1), protože v databázích je k dispozici jen velmi málo odpovídajících sekvencí. To nám prozatím neumožňuje získané sekvenční s jistotou přiřadit k daným druhům, zejména díky vzorkům, u nichž se taxonomické zařazení na základě různých barkódů lišilo.

Rod *Aspergillus* sp. představuje skupinu závažných potravinářských kontaminantů. S ohledem na mlékařskou matici (solné lázně, syrovátka, sýry, jogurty) bylo izolováno 8 druhů (obrázek 1) buď přímo z kontaminovaných produktů, nebo jako součást nežádoucích biofilmů. V porovnání s druhy, na které se přednostně zaměřují současné studie (*A. niger*, *A. flavus*), představují

izoláty z mlékařských matic xerofytické a halofytické druhy (*A. unguis*, *A. montevicensis*, *A. tabacinus*, *A. versicolor*) (Yang a kol., 2017; Visagie a kol., 2017; Piontek a kol., 2016). Všechny druhy uvedených aspergilů jsou producenti sekundárních metabolitů a produkují také proteolytické enzymy (Piontek a kol., 2016). U všech testovaných druhů aspergilů je popsána patogenita a toxicita produkovaných sekundárních metabolitů (Yang a kol., 2017; Visagie a kol., 2017).

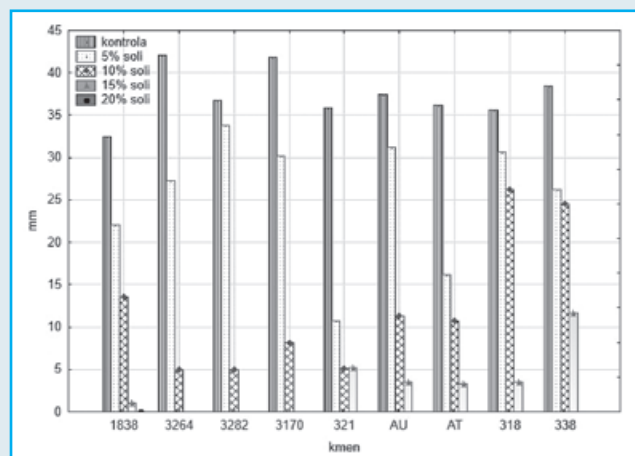
## 2. Tolerance druhů *Aspergillus* sp. k obsahu soli v substrátu

Růst jednotlivých kmenů při 25 °C na MEA byl téměř stejný. Analýza variance (ANOVA, Statistica soft v 12.1) také potvrzuje, že jednotlivé kmeny se mezi sebou v intenzitě růstu statisticky významně nelišily, pokud rostly na MEA (Tabulka 7).

**Tab. 7** Vliv faktorů na variabilitu růstu kolonií aspergilů (mm) s ohledem na obsah soli v médiu (ANOVA, Statistica Software v.12.1) \* statisticky významné

Faktor	Stupně volnosti	F	P
Obsah soli	4	2208,3	0,001*
Kmeny aspergilů	8	32,34	0,22

Růst kolonií jednotlivých druhů aspergilů se však významně lišil v závislosti na obsahu soli v médiu. Druhy (*A. montevicensis*, *A. cibarius*, *A. unguis*, *A. tabacinus* a *A. versicolor*), izolované ze solných lázní a van, tolerují 15% obsah soli. Kolonie jsou po sedmi-denní kultivaci menší v porovnání s kontrolní kulturou na MEA, ale plně sporulující. Druhy izolované jako kontaminanty z mléčných výrobků (*A. flavus* a *A. niger*) jsou na obsah soli citlivější a výrazně omezují růst a sporulaci již při 10% obsahu soli. Rozdíly v reakci na množství soli v médiu mezi kmeny a izoláty aspergilů jsou graficky znázorněné na obrázku 2.



**Obr. 2** Porovnání růstu devíti bodových kultur kmenů a izolátů *Aspergillus* sp. po 7 dnech kultivace na MEA s různým obsahem soli. (1838, 3170 – *A. flavus*, 3264, 3282 – *A. niger*, 321 – *A. versicolor*, AU – *A. unguis*, AT – *A. tabacinus*, 318 – *A. cibarius*, 338 – *A. montevicensis*)

### 3. Antifungální aktivita *L. plantarum* vůči druhům *Aspergillus* sp.

#### Difúzní test s 20 % a 30 % filtrátu *L. plantarum* na MEA

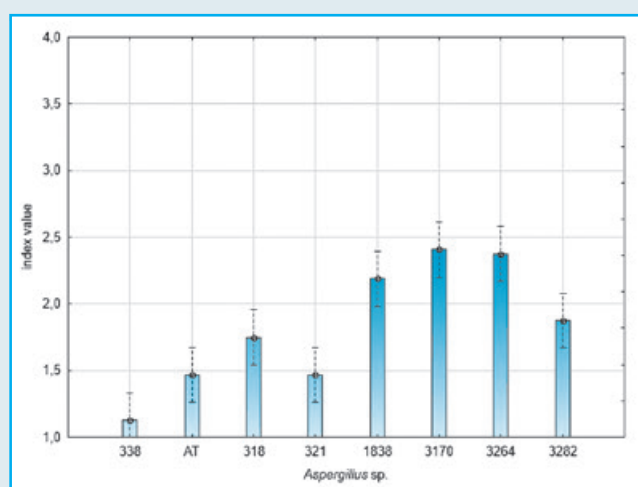
Vliv filtrátu *L. plantarum* na aspergily byl významně odlišný v rámci testovaných druhů *L. plantarum* i samotných druhů aspergilů. Zvýšený podíl filtrátu (30 %) také významně potlačoval růst kolonií na MEA mediu (Tabulka 8).

**Tab. 8** Statistická významnost sledovaných faktorů a jejich vliv na růst fungální kolonie (mm), ANCOVA, Statistica Soft. v.12.1,  $p \leq \alpha \leq 0.05$

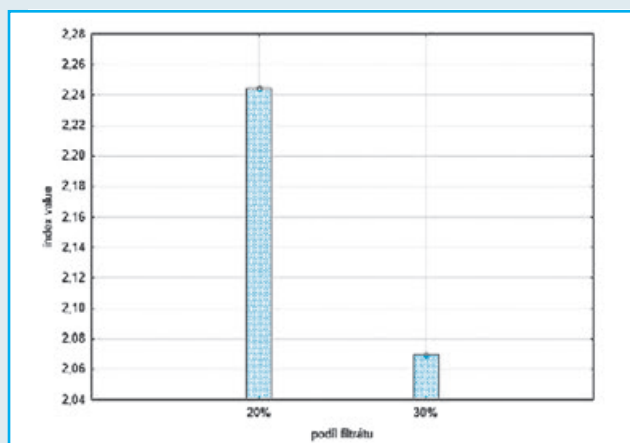
Faktory	Df	F	p
Rozměr kolonie (mm)	8	26,6597	0,000001*
<sup>1</sup> Podíl filtrátu	1	7,2900	0,007603*
Kmeny <i>L. plantarum</i>	10	10,0659	0,000000*
Kmeny aspergilů	8	2,2298	0,027293*

\* statisticky významné, <sup>1</sup> – kovariát

Supresivní účinek *L. plantarum* na vývoj fungální kolonie byl zřejmý u všech druhů aspergilů. Významný rozdíl (obrázek 3) je patrný mezi druhy, které pocházejí z mlékařských matric, a i z hlediska ekologie jsou vázány na tyto specifické substráty (338, AT, 318, 321) oproti druhům, které jsou známé jako saprofyty s širokou ekologickou amplitudou, jako je *A. flavus* (3170) a *A. niger* (3264, 3282). *A. unguis* při této dávce filtrátu nerostl, není proto ani na obrázku 3. Do fáze sporulace se během 7 dnů nedostal žádný z kmenů, přesto že všechny kontroly na MEA bez filtrátu plně sporulovaly a dosahovaly tedy indexu 4. Vyšší dávka filtrátu (30 %) měla významný vliv na vývoj kolonie, zejména na tvorbu spór, což projevilo na indexové hodnotě v rozmezí bodů 2 a 3, tj. na úrovni redukovaného a vzdušného mycelia (obrázek 4).



**Obr. 3** Vývoj osmi bodových kultur aspergilů na MEA s 30 % přidavkem filtrátu *L. plantarum* – 7 den kultivace. 1 – *Aspergillus* sp. se nevyvíjí, 2 – redukované mycelium, 3 – vzdušné mycelium, 4 – sporulace. (1838, 3170 – *A. flavus*, 3264, 3282 – *A. niger*, 321 – *A. versicolor*, AT – *A. tabacinus*, 318 – *A. cibarius*, 338 – *A. montevicensis*)



**Obr. 4** Rozdíl ve vývoji kolonie na MEA na základě indexové stupnice při 20 % a 30 % přidavku filtrátu *L. plantarum*

#### Test na mediu s 10 % obnoveným mlékem s *L. plantarum*

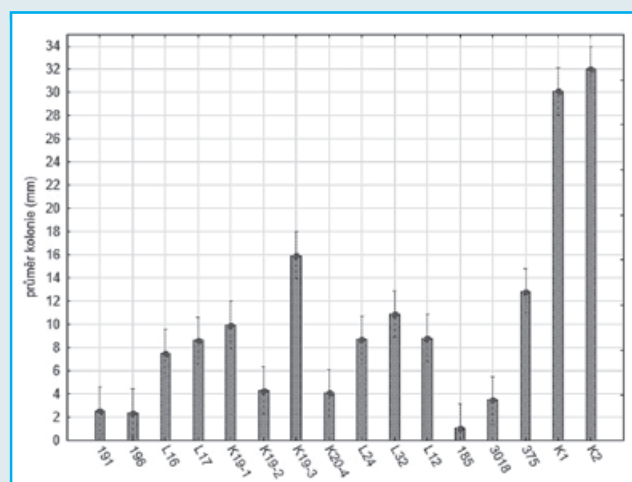
Na MEA agaru obohaceném o RSM s nakultivovanými laktobacily byl jasný rozdíl v růstu kolonií aspergilů. Velikost samotné kolonie byla významně ovlivněna kmenem *L. plantarum*, podílem RSM s *L. plantarum* a různou citlivostí druhů aspergilů (tabulka 9).

V porovnání s růstem kolonií v kontrolních variantách (K1, K2) se průměr kolonie aspergilů rostoucí na RSM-MEA lišil o více než polovinu (obrázek 5). Růst kolonií aspergilů ovlivňovaly významně zejména kmeny *L. plantarum* ze siláží (185, 191, 196) a z kvasů (3018, K19-2, K20-4, K20-5).

**Tab. 9** Statistická významnost sledovaných faktorů a jejich vliv na růst fungální kolonie (mm) na RSM/MEA mediu. ANCOVA, Statistica Soft. v.12,  $p \leq \alpha \leq 0.05$

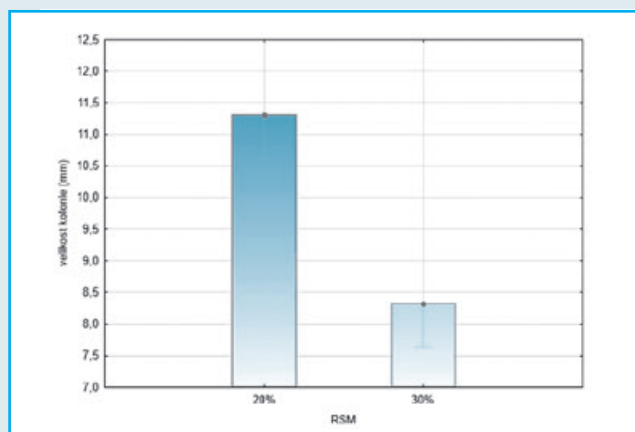
Faktory	Df	F	p
Rozměr kolonie (mm)	16	18,56	0,00E*
<sup>1</sup> Podíl filtrátu	1	9,06	0,002*
Kmeny <i>L. plantarum</i>	16	45,89	0,00E*
Kmeny aspergilů	8	28,67	0,00E*

\* statisticky významné, <sup>1</sup> – kovariát



**Obr. 5** Supresivní účinek izolátů a kmenů *L. plantarum* v MEA s RSM na základě průměru fungálních kolonií (mm) po 7 dnech kultivace

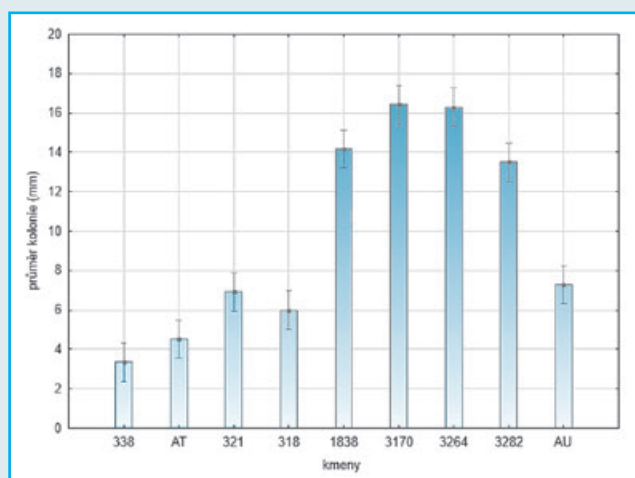




**Obr. 6** Vliv procentického zastoupení RSM s *L. plantarum* v MEA na průměr fungální kolonie

Samotný podíl RSM s laktobacily v médiu významně ovlivňoval průměr kolonií aspergilů. Vyšší obsah (30 %) RSM s laktobacily v MEA redukoval růst mycelia o 30 % ve srovnání s 20 % podílem (obrázek 6). Vyšší podíl RSM s *L. plantarum* také inhiboval vývoj aspergilů na úroveň indexu 2, tj. na tvorbu redukovaného mycelia.

Obdobně, jako tomu bylo v testu na syntetických médiích, citlivost testovaných druhů aspergilů vůči kmenům *L. plantarum* byla významně odlišná na kombinovaném médiu s RSM zejména mezi druhy, které osidlují specifické niky a byly izolovány z mlékáren a mléčných výrobků (*A. montevicensis*, *A. versicolor*, *A. cibarius*, *A. tabacinus*, *A. unguis*) v porovnání s druhy, které sice byly také izolovány z mléčných výrobků, ale jsou širokospektrální saprofyty a některé druhy i potenciální obligátní patogeni (*A. flavus*, *A. niger*).



**Obr. 7** Sensitivita druhů *Aspergillus* sp. vůči kmenům *L. plantarum* v rámci testu s MEA s RSM. Kontrolní varianty dosahovaly v průměru více než 34 cm viz obrázek 5. (1838, 3170 – *A. flavus*, 3264, 3282 – *A. niger*, 321 – *A. versicolor*, AT – *A. tabacinus*, 318 – *A. cibarius*, 338 – *A. montevicensis*, AU – *A. unguis*)

Z našich dosavadních výsledků vyplývá, že druhy aspergilů izolované z mléčných výrobků a mlékařských matric jsou citlivější na přítomnost živých laktobacilů

a jejich produktů v porovnání s kmeny *A. niger* a *A. flavus*. Ve vztahu k těmto dvou druhům označuje Russo a kol., 2017 *L. plantarum* jako druh s průměrným antifungálním účinkem. Testoval však pouze dva kmeny *L. plantarum*. *In vitro* testy i aplikace bezbuněčných supernatantů *L. plantarum* přímo do sýrů potvrdily částečný inhibiční účinek *L. plantarum* na *A. niger* a *A. flavus* (Cosentino a kol., 2018, Sedaghat a kol., 2016).

Testování bezbuněčných supernatantů (BS) v MEA ukázalo, že nejcitlivějšími kmeny jsou *A. cibarius*, a *A. montevicensis*, které ani po deseti dnech kultivace nesporulovaly a kolonie se nevybarvovaly. Kmeny *A. versicolor*, *A. tabacinus* a *A. unguis* na MEA s RSM vysporulovaly, ale kolem kolonií se tvořila zřetelná inhibiční zóna. Rozdílný účinek filtrátu v kontextu s citlivostí jednotlivých druhů aspergilů, se projevil i při kultivaci na MEA s 30 % přídavkem BS. Supresivní účinek na růst a vývoj fungální kolonie na MEA s RSM médiu je oproti kontrolám patrný u všech kmenů *L. plantarum*. Významný je účinek zejména kmenů izolovaných ze siláží (CCDM 191,196,185) a kvasů (CCDM 3018, K20-4, K20-2). Tento výsledek je podpořen studií Yu a kol., 2021, kde srovnávací studie genomů a fenotypových vlastností izolátů *L. plantarum* potvrdily vyšší antifungální aktivitu u kmenů izolovaných z fermentovaných produktů. Většina kmenů *L. plantarum* s antifungální aktivitou, které se úspěšně testují v potravinářských matricích, jsou izoláty původem z kvasů (Quattrini a kol., 2018; Russo a kol., 2017). Z hlediska potenciálního praktického využití je vhodné testovat *L. plantarum* a jeho metabolity na konkrétních potravinových matricích s ohledem na jejich charakter, tj. mléko nebo mouka, a v dalším kroku také testovat další technologické podmínky, jako je teplota, aw, obsah soli (Geronikou a kol., 2020; Salas a kol., 2018; Garnier a kol., 2018). Výsledky na umělých médiích mohou být zkráceny výhodnými či nevýhodnými podmínkami pro jedno či druhé biologické agens.

## Závěr

V mlékařských matricích se objevuje širší druhové spektrum aspergilů, než je cíleně testováno v odborné literatuře (*A. unguis*, *A. montevicensis*, *A. cibarius*, *A. tabacinus*, *A. versicolor*). Tyto druhy vykazují významnou proteolytickou aktivitu, toleranci k soli a sanitacním prostředkům v provozech mlékáren. Uvedené druhy jsou citlivější jak na přítomnost živých buněk *L. plantarum*, tak na jejich produkty ve srovnání s druhy *A. niger* a *A. flavus*, i když i tyto pocházejí z kontaminovaných mléčných výrobků. Účinek *L. plantarum* je podmíněn původem a vnitrodruhovou variabilitou. Je zřejmé, že žádný z testovaných kmenů *L. plantarum* nemá stejný supresivní účinek na celé spektrum testovaných aspergilů, protože sensitivita jednotlivých druhů aspergilů vůči *L. plantarum* a jeho metabolitům se rovněž liší. Přídavek (20 a 30 %) bezbuněčných filtrátů z kmenů a izolátů *L. plantarum* z kvasů a siláží významně potlačoval



růst a vývoj aspergilů na MEA. Rovněž přídavek RSM (20-30 %) s nakultivovanými izoláty a kmeny *L. plantarum* do MEA inhiboval tvorbu fungálních kolonií na povrchu Petriho misky se smíšeným médiem. I zde se nejlépe uplatňovaly kmeny a izoláty *L. plantarum* z kvasů a siláží. U těchto kmenů budou dále prověřovány další funkční a technologické vlastnosti za účelem potenciální praktické aplikace v rámci ochrany mlékařských produktů.

### Poděkování

Práce vznikla za podpory projektů MZe ZEMĚ QK1910036 a QK1910024 a MZe RO1422.

### Literatura

- ABBASILIASI, S., SHUN TAN, J., IBRAHIM, T. A., BASHOKOUH, F., RAMAKRISHNAN, N. R., MUSTAFAAB S., ARIFF A.B. (2017): Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *RSC Adv.*, 7, s. 29395–29420.
- ANDREWS, S., & PITT, J. I. (1986): Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(6), s. 1235–1238.
- BEHERA, S.S., RAY, R.C., ZDOLEC, N. (2018): *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *Biomed Research International*, s. 1–18.
- BOKULICH, N. A., MILLS, D. A. (2013): Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscape of artisan cheesemaking plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, s. 5214–5223.
- CARBONE, I., KOHN, L. M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, s. 553–556.
- COSENTINO, S.; VIALE, S.; DEPLANO, M.; FADDA, M.E.; PISANO, M. B. (2018): Application of autochthonous *Lactobacillus* strains as bio-preservatives to control fungal spoilage in caciotta cheese. *Biomed Res. Int.* 2018, s. 1–10.
- DALLAGNOL, A.M., BUSTOS, A.Y., MARTOS, G.I., VALDEZ, G.F. DE, GEREZ, C.L. (2019): Antifungal and antimycotoxigenic effect of *Lactobacillus plantarum* CRL 778 at different water activity values. *Rev. Argent. Microbiol.* 51, s. 164–169.
- DJOSSOU, O., PERRAUD-GAIME, I., LAKHAL MIRLEAU, F., RODRIGUEZ-SERRANO, G., KAROU, G., NIAMKE, S., OUZARI, I., BOUDABOUS, A., ROUSSOS, S. (2011): Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17, s. 267–272.
- EC 1881/2006 (2006): Regulation 2006/1881 of the Commission of the European Communities of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2006, s. 5–24.
- EDGAR, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res.*, 32, s. 1792–97.
- GARCIA-CANO, I., RICHA-MENDISA, D., ORTEGA-ANAYA, WANG, K., KOSMERI, E. (2019): Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, s. 5243-5257.
- GARDES, M., BRUNS, T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, s. 113–118.
- GARNIER, L., VALENCE F., MOUNIER, J. (2017): Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms*, 5, 42, s. 1–33.
- GARNIER, L., SALAS, M.L., PINON, N., WIERNASZ, N., PAWTOWSKI, A., COTON, E., MOUNIER, J., VALENCE, F. (2018): Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *J. Dairy Sci.* 101, s. 4971–4976.
- GEORGE, F., DANIEL, C., THOMAS, M., SINGER, E., GUILBAUD, A., TESSIER, F.J., REVOL-JUNELLES, A.-M., BORGES, F., FOLIGNÉ, B. (2018): Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* 9, s. 1–14.
- GERONIKOU, A., SRIMAHAEAK, T., RANTSIOU, K., TRIANTAFILLIDIS, G., LARSEN, N., JESPERSEN, L. (2020): Occurrence of Yeasts in White-Brined Cheeses: Methodologies for Identification, Spoilage Potential and Good Manufacturing Practices. *Front. Microbiol.* 11, s. 1–21.
- GÉRY, A., RIOULT, J.-P., HEUTTE, N., SÉGUIN, V., BONHOMME, J., GARON, D. (2021): First Characterization and Description of *Aspergillus* Series *Versicolores* in French Bioaerosols. *J. Fungi* 7, 676, s. 1–20.
- GLASS, N. L., DONALDSON, G. C. (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, s. 1323–1330.
- GOUY, M., GUINDON, S., GASCUEL, O. (2010): SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27(2) s. 221–4.
- GUINDON, S., DUFAYARD, J.-F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., GASCUEL, O. (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *System. Biol.*, 59, s. 307–321.
- HONG, S.-B., CHO, H.-S., SHIN, H.-D., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. (2006): Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, 56, s. 477–486.
- INGLIS, D.G., ENKERLI, J., GOETTEL, M.S., (2012): Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales., Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Academic Press, San Diego, s. 189–253.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J., DRÁB, V., BĀR, L. (2021): Differentiation of *Penicillium roqueforti* from Closely Related Species Contaminating, Cheeses and Dairy Environment. *Fermentation* 7, s. 1–16.
- KAVKOVÁ, M., CIHLÁŘ, J., DRÁB, V.; BAZALOVÁ, O., DLOUHÁ, Z. (2022): The interactions among isolates of *Lactiplantibacillus plantarum* and dairy yeast contaminants: towards biocontrol applications. *Fermentation* 8, s. 1–14.
- KOSCUBÉ, S., PERRONE, G., MAGISTÀ, D., HOUBRAKEN, J., VARGA, J., SZIGETI, G., HUBKA, V., HONG, S.B., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. (2016): *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud. Mycol.* 85, s. 199–213.
- LI, K., ZHANG, W., KWOK, L.Y., MENGHE, B. (2020): Screening of *Lactobacillus plantarum* with broad-spectrum antifungal activity and its application in preservation of golden-red apples. *Czech J. of Food Sci.*, 38: s. 315–322.
- LUZ, C., SALADINO, F., LUCIANO, FERNANDO, MAÑES, J., MECA, G. (2017). In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT – Food Science and Technology*, 81, s. 128–135.
- MORELLI, K.A., KERKAERT, J.D., CRAMER, R.A. (2021): *Aspergillus fumigatus* biofilms: Toward understanding how growth as a multicellular network increases antifungal resistance and disease progression. *PLoS Pathog* 17(8): s. 1–23.
- PALLA, M., CRISTANI, C., GIOVANNETTI, M., AGNOLUCCI, M. (2020): Large genetic intraspecific diversity of autochthonous lactic acid bacteria and yeasts isolated from PDO tuscan bread sourdough. *Appl. Sci.* 10, s. 1–11.
- PIONTEK, M., ŁUSZCZYŃSKA, K., LECHÓW, H. (2016): Occurrence of the Toxin-Producing *Aspergillus versicolor* Tiraboschi in Residential Buildings. *Int J Environ Res Public Health.* 13(9), s. 1–12.
- POORNACHANDRA RAO, K., DEEPTHI, B. V., RAKESH, S., GANESH T., PREMILA ACHAR, SREENIVASA, M. Y. (2017) Antiaflatoxigenic potential of cell-free supernatant from *Lactobacillus plantarum* MYS44 against *Aspergillus parasiticus*. *Probiotics & Antimicro.* Prot., s. 1–10.
- QUATTRINI, M., BERNARDI, C., STUKNYTÉ, M., MASOTTI, F., PASSERA, A., RICCI, G., VALLONE, L., DE NONI, I., BRASCA, M., FORTINA, M.G. (2018): Functional characterization of *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Food Res. Int.* 106, s. 936–944.
- RÁDULY, Z., SZABÓ, L., MADAR, A., PÓCSI, I., CSERNOCH, L. (2020): Toxicological and Medical Aspects of *Aspergillus*-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Front. Microbiol.* 10:2908, s. 1–23.
- RAVESCHOT, C., CUDENNEC, B.; COUTTE, F., FLAHAUT, C., FREMONT, M., DRIDER, D., DHULSTER, P. (2018): Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: From gene to application. *Front. Microbiol.*, 9, s. 1–14.

- RUSSO, P., ARENA, M.P., FIOCCO, D., CAPOZZI, V., DRIDER, D., SPANO, G. (2017): *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Food Microbiol.* 247, s. 48–54.
- SALAS, M.L., THIERRY, A., LEMAÎTRE, M., GARRIC, G., HAREL-OGER, M., CHATEL, M., LÉ, S., MOUNIER, J. (2018): Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Frontiers in microbiology*, 9, s. 1–18.
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J., THRANE, U., FRISVAD, J.C., ANDERSEN, B. (2010): *Food and Indoor Fungi*; CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, 390 s. ISBN 978-90-70351-82-3.
- SAMSON, R. A., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., HONG, B., HUBKA, V., KLAASSEN, C. H., PERRONE, G., SEIFERT, K. A., SUSCA, A., TANNEY, J. B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T., FRISVAD, J. C. (2014): Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* s. 141–73.
- SCANO, P., PISANO, M.B., MURGIA, A., COSENTINO, S., CABONI, P. (2021): GC-MS Metabolomics and Antifungal Characteristics of Autochthonous *Lactobacillus* Strains. *Dairy*, 2, s. 326–335.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., CHEN, W. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, s. 6241–6246.
- SEDAGHAT, H., ESKANDARI, M.H., MOOSAVI-NASAB, M., SHEKARFOROUSH, S.S. (2016) Application of non-starter lactic acid bacteria as biopreservative agents to control fungal spoilage of fresh cheese. *International Dairy Journal*, 56, s. 87–91.
- SIGUEIRA, V.M., LIMA, N. (2013): Biofilm Formation by Filamentous Fungi Recovered from a Water System. *Journal of Mycology*, s. 1–9.
- STIELOW J. B., LÉVESQUE C. A., SEIFERT K. A., MEYER W., IRINY L., SMITS D., RENFURM R., VERKLEY G. J., GROENEWALD M., CHADU LI D., LOMASCOLO A., WELTI S., LESAGE-MEESSEN L., FAVEL A., AL-HATMI A. M., DAMM U., YILMAZ N., HOUBRAKEN J., LOMBARD L., QUAEVLI W., BINDER M., VAAS L. A., VU D., YURKOV A., BEGEROW D., ROEHL O., GUERREIRO M., FONSECA A., SAMERPITAK K., VAN DIEPENINGEN A. D., DOLATABADI S., MORENO L. F., CASAREGOLA S., MALLET S., JACQUES N., ROSCINI L., EGIDI E., BIZET C., GARCIA-HERMOSO D., MARTÍN M. P., DENG S., GROENEWALD J. Z., BOEKHOUT T., DE BEER Z. W., BARNES I., DUONG T. A., WINGFIELD M. J., DE HOOG G. S., CROUS P. W., LEWIS C. T., HAMBLETON S., MOUSSA T. A., AL-ZAHRANI H. S., ALMAGHRABI O. A., LOUIS-SEIZE G., ASSABGUI R., MCCORMICK W., OMER G., DUKIK K., CARDINALI G., EBERHARDT U., DE VRIES M., ROBERT V. (2015): One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, 35, s. 242–263.
- SUBROTO, E., VAN NEER, J., VALDES, I., DE COCK, H. (2022) Growth of *Aspergillus fumigatus* in Biofilms in Comparison to *Candida albicans*. *J. Fungi*, 8, 48, s. 1–23.
- STRÖM, K., SCHNÜRER, J., MELIN, P. (2005): Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* M1LAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microbiol Lett.*, 246(1), s. 119–24.
- TROPICHEVA, R., NIKOLOVA, D., EVSTATIEVA, Y., DANOVA, S. (2014): Antifungal activity and identification of *Lactobacilli*, isolated from traditional dairy product “katak.” *Anaerobe*, 28, s. 78–84.
- UDOVICKI, B., AUDENAERT, K., DE SAEGER, S., AND RAJKOVIC, A. (2018): Overview on the Mycotoxins incidence in Serbia in the period 2004-2016. *Toxins* 10, s. 1–22.
- VISAGIE, C.M., YILMAZ, N., RENAUD, J.B., SUMARAH, M.W., HUBKA, V., FRISVAD, J.C., CHEN, A.J., MEIJER, M., SEIFERT, K.A. (2017): A survey of xerophilic *Aspergillus* from indoor environment, including descriptions of two new section *Aspergillus* species producing eurotium-like sexual states. *MycKeys* 19: s. 1–30.
- ZHAO, Y., ZHANG, C., FOLLY, Y.M.E., CHANG, J., WANG, Y., ZHOU, L., ZHANG, H., LIU, Y. (2019): Morphological and transcriptomic analysis of the inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Toxins*. s. 1–16.
- ŽIVKOVIĆ, S., STOŠIĆ, S., RISTIĆ, D., VUCUROVIĆ, I., STEVANOVIĆ, M. (2019): Antagonistic potential of *Lactobacillus plantarum* against some postharvest pathogenic fungi. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. s. 79–88.
- WHITE T. J., BRUNS T. D., LEE S., TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A., GELFAND D. H., SNINSKY J. J., WHITE T. J. eds. PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego, California: Academic Press, s. 315–322.
- YANG, L., LÜBECK, M., LÜBECK, P.S. (2017): *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews*, 31, s. 33–49.
- YU, A. O., GOLDMAN, E.A., BROOKS, J.T., GOLOMB, B.L., YIM, I.S., GOTCHEVA, V., ANGELOV, A., KIM, E.B., MARCO, M.L. (2021): Strain diversity of plant-associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *Microbial biotechnology*, 14(5), s. 1990–2008.

**Korespondující autor:** Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, email: m.kavkova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 12. 5. 2022

Lektorováno: 30. 5. 2022

## “GO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

### Antioxidační aktivita mléka a mléčných produktů (přehledová práce)

Stobiecka M. et al. (2022): Antioxidant activity of milk and dairy products. *Animals*, 12(3): 245.

Konzumace produktů, které jsou bohatým zdrojem bioaktivních složek, zlepšuje antioxidační stav organismu a snižuje riziko rozvoje řady civilizačních chorob. Mléko a zakysané mléčné výrobky a sýry jsou bohatým zdrojem antioxidačních složek. Existují rozdíly v celkové antioxidační kapacitě mléka různých druhů zvířat, které vyplývají z rozdílu chemického složení těchto mlék. Antioxidační kapacita mléka a mléčných výrobků souvisí především s přítomností sirných aminokyselin, syrovátkových bílkovin (zejména  $\beta$ -laktoglobulinu), vitaminů A, E a C nebo  $\beta$ -karotenu. Obsah antioxidačních složek v mléce a antioxidační potenciál lze ovlivnit výživou zvířat (např. doplnění krmné dávky různými přírodními přísadami (bylinné směsi, odpady ze zpracování ovoce a zeleniny)). Antioxidační potenciál mléčných výrobků je ovlivněn kvalitou syrového mléka, použitými mlékárenským kulturami, případně dodanými rostlinnými přísadami.

Tento článek je dostupný v plné verzi na: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/3/245>