

Miroslava Kačániová

Natália Čmíková

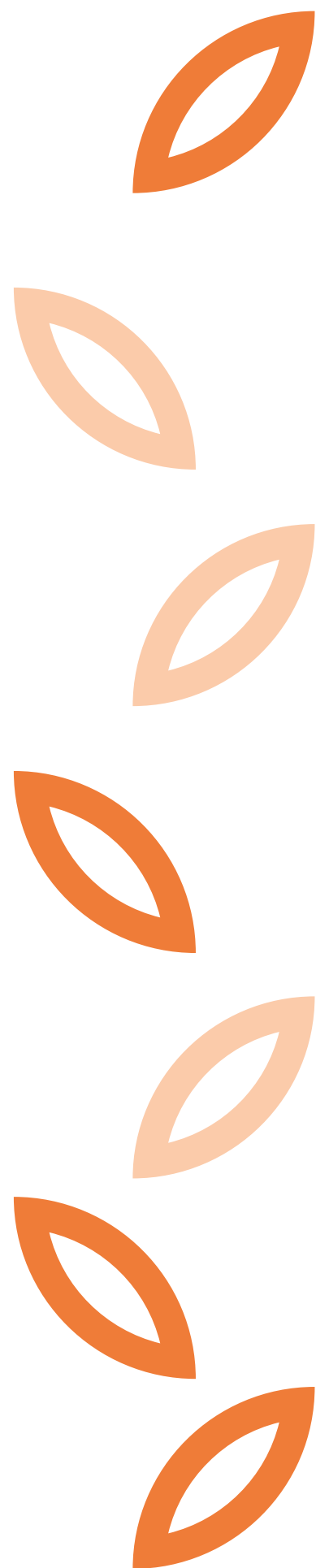
# Mikrobiálne biotechnológie v záhradníctve



**SPU·FZKI**

Fakulta záhradníctva  
a krajinného  
inžinierstva

Nitra 2023



**Názov:** Mikrobiálne biotechnológie v záhradníctve

**Autorky:** prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD. (9,38 AH)  
Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva  
Ústav záhradníctva

Ing. Natália Čmiková (9,38 AH)  
Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva  
Ústav záhradníctva

**Recenzenti:** prof. Ing. Leona Buňková, PhD.  
Univerzita Tomáša Baťu v Zlíne

prof. Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD.  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
Ústav rastlinných a environmentálnych vied

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre  
dňa 8. 11. 2023 ako online skripta pre študentov SPU v Nitre.

Táto publikácia je publikovaná pod licenciou Creative Commons Attribution  
NonCommercial 4.0 International Public License (CC BY-NC 4.0).  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



**ISBN 978-80-552-2667-5**

# Obsah

Úvod.....	7
<b>1 Interakcie medzi rastlinami a mikroorganizmami a ich vplyv na produktivitu plodín.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Rôzne typy interakcií medzi rastlinami a mikroorganizmami .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Mutualizmus.....	9
1.1.2 Komenzalizmus .....	10
1.1.3 Amensalizmus .....	10
1.1.4 Symbióza .....	10
1.1.5 Patogénne interakcie .....	10
<b>1.2 Mechanizmy interakcie rastlina-mikroorganizmus .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Prostredníctvom koreňových exsudátov .....	11
1.2.2 Pozitívna interakcia rastlín a mikroorganizmov sprostredkovaná koreňovými exsudátmi .....	12
1.2.3 Negatívna interakcia rastlín a mikroorganizmov .....	12
<b>1.3 Prospešné/pozitívne interakcie na zvýšenie produktivity rastlín.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Fixácia dusíka.....	14
1.3.2 Solubilizácia fosfátov .....	14
1.3.3 Solubilizácia anorganického fosfátu pomocou PSM .....	15
1.3.4 Mineralizácia organického fosforu pomocou PSM .....	15
1.3.5 Biohnojivá .....	15
1.3.6 Biopesticídy .....	17
1.3.7 Fytostimulanty.....	18
<b>1.4 Interakcie rastlín a mikroorganizmov pri ochrane proti biotickým stresom.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Interakcie rastlín a mikroorganizmov pri ochrane pred abiotickým stresom... </b>	<b>20</b>
1.5.1 Voda.....	20
1.5.2 Teplota .....	21
1.5.3 Ťažké kovy.....	22
<b>1.6 Využitie arbuskulárnych mykoríznych húb v záhradníctve.....</b>	<b>23</b>
1.6.1 Rozsah symbiotických rastlín .....	24
1.6.2 Taxonómia arbuskulárnych mykoríznych húb .....	24
1.6.3 Úloha AM húb v boji proti chorobám rastlín.....	24
1.6.4 Spôsob pôsobenia arbuskulárnych mykoríznych húb .....	25
<b>1.7 Mikroorganizmy podporujúce rast rastlín ako činitele biologickej kontroly chorôb rastlín.....</b>	<b>27</b>
1.7.1 Mechanizmy, výzvy a perspektívy do budúcnosti.....	27
1.7.2 PGPR ako sľubné biokontrolné činidlá.....	27
1.7.3 Mechanizmy biokontroly pomocou PGPR.....	28
1.7.4 Výzvy pri využívaní PGPR ako biologické kontrolné činidlá (BCA).....	29
1.7.5 Rhizobaktérie ako BCA .....	31
1.7.6 Huby ako BCA .....	32
1.7.7 Mechanizmy používané MBCA .....	34
1.7.8 Konkurencia v rhizosfére .....	35
1.7.9 Perspektívy do budúcnosti .....	37
<b>2 Najdôležitejšie patogény rastlín .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Bakteriálne patogény rastlín .....</b>	<b>38</b>
<b>2.2 Hubové patogény rastlín.....</b>	<b>48</b>

2.3	Vírusové patogény rastlín.....	58
<b>3</b>	<b>Biologická kontrola chorôb rastlín pomocou prírodných a geneticky modifikovaných flourescenčných <i>Pseudomonas</i> spp .....</b>	<b>69</b>
3.1	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	69
3.2	Rhizosféra ako mikrohabitat .....	69
3.3	Genetická charakterizácia <i>Pseudomonas</i> spp. ....	72
3.4	Ekologické aspekty <i>Pseudomonas</i> v rhizosfére .....	73
<b>4</b>	<b>Mikrobiálna kontrola pozberových chorôb ovocia a zeleniny .....</b>	<b>80</b>
4.1	Prírodní mikrobiálni antagonisti .....	81
4.2	Umelo zavedení mikrobiálni antagonisti .....	81
4.3	Spôsob účinku mikrobiálnych antagonistov .....	84
4.4	Zavádzanie mikrobiálnych antagonistov.....	88
4.5	Kritériá pre ideálneho antagonistu.....	89
4.6	Antagonistické prípravky.....	89
4.7	Kvasinky: Ako potenciálni mikrobiálni antagonisti .....	90
4.8	Metódy aplikácie mikrobiálnych antagonistov .....	90
4.9	Zvýšenie biologickej účinnosti mikrobiálnych antagonistov .....	92
4.10	Mikrobiológia minimálne spracovaného čerstvého ovocia a zeleniny.....	96
<b>5</b>	<b>Charakter mikroorganizmov v ovocí a zelenine MPF.....</b>	<b>97</b>
5.1	Mikrobiálna kontaminácia.....	97
5.2	Pektinolytické mikroorganizmy .....	98
5.3	Potravinami prenášané patogény v zelenine MPF .....	99
5.4	Pôvod mikrobioty na minimálne spracovanom čerstvom ovocí a zelenine (MPF) .....	99
5.4.1	Nespracovaná zelenina .....	99
5.4.2	Spracovaná zelenina .....	101
5.5	Vplyv mikroorganizmov na kvalitu ovocia a zeleniny MPF .....	102
5.6	Kontrola chladenia.....	115
<b>6</b>	<b>Zemiaky a zemiakové výrobky .....</b>	<b>116</b>
6.1	Mikrobiológia zemiakov a výrobkov zo zemiakov .....	117
6.2	Výskyt ochorení prenášaných potravinami v súvislosti so zemiakmi a výrobkami zo zemiakov .....	122
6.3	Štúdie mikrobiologických problémov spojené s konzumáciou zemiakov a výrobkov zo zemiakov .....	125
6.4	Mikrobiologické štúdie zemiakov a výrobkov zo zemiakov balených v modifikovanej atmosfére, alebo vo vákuu .....	127

<b>7</b>	<b>Mikrobiálne biotechnológie tropických koreňových a hľuzových plodín po zbere úrody .....</b>	<b>132</b>
7.1	<b>Stratégie kontroly mikroorganizmov .....</b>	<b>133</b>
7.1.1	Manipulácia epifytickej a endofytickej mikrobioty .....	133
7.1.2	Zavedenie mikrobiálnych antagonistov .....	134
7.2	<b>Huby .....</b>	<b>134</b>
7.3	<b>Kvasinky .....</b>	<b>134</b>
7.4	<b>Baktérie.....</b>	<b>135</b>
7.5	<b>Oblasti použitia bakteriálnych antagonistov .....</b>	<b>137</b>
7.6	<b>Opatrenia na zlepšenie účinnosti antagonistov.....</b>	<b>138</b>
7.7	<b>Koreňové plodiny mierneho pásma .....</b>	<b>140</b>
7.7.1	Zemiaky .....	140
7.7.2	Cukrová repa .....	141
7.7.3	Mrkva .....	144
7.7.4	Cibuľa .....	145
7.7.5	Zázvor .....	145
7.7.6	Cesnak.....	146
7.8	<b>Tropické hľuznaté plodiny .....</b>	<b>146</b>
7.8.1	Maniok .....	146
7.8.2	Yam biely .....	147
7.8.3	Cocoyam.....	148
7.8.4	Batáty.....	148
<b>8</b>	<b>Fermentácia manioku v Latinskej Amerike: Fermentovaný škrob a múka</b>	<b>149</b>
8.1	<b>Hlavné technológie výroby fermentovaných potravín z manioku v Afrike .....</b>	<b>150</b>
8.1.1	Fermentované potraviny z manioku vo východnej Afrike .....	150
8.1.2	Fermentované potraviny z manioku v strednej Afrike.....	152
8.1.3	Fermentované potraviny z manioku v západnej Afrike.....	153
8.2	<b>Mikroorganizmy súvisiace s fermentovanými potravinami z manioku v Afrike .....</b>	<b>156</b>
8.3	<b>Úloha a funkcia fermentácie v potravinách z manioku .....</b>	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>Choroby húb a ich manažment.....</b>	<b>163</b>
9.1	<b>Hubové ochorenia.....</b>	<b>166</b>
9.2	<b>Bakteriálne ochorenia .....</b>	<b>169</b>
9.3	<b>Vírusové ochorenia.....</b>	<b>172</b>
<b>10</b>	<b>Kvasenie vína z tropického a subtropického ovocia .....</b>	<b>176</b>
10.1	<b>Technológia výroby vína.....</b>	<b>179</b>
10.2	<b>Vína z tropického a subtropického ovocia.....</b>	<b>179</b>
10.2.1	Mangové víno .....	180
10.2.2	Hroznové víno.....	181
10.2.3	Banánové víno.....	182
10.2.4	Jablčný cider a víno.....	182
10.2.5	Granátové víno .....	183
10.2.6	Víno Sapota .....	183

10.2.7	Jackfruit víno.....	183
10.2.8	Ostatné ovocné vína.....	184
<b>11</b>	<b>Fermentované nápoje na báze ovocia (FBFB).....</b>	<b>185</b>
11.1	Mikrobiologické riziká zistené v kvasených nápojoch na báze ovocia.....	188
11.2	Chemické riziká zistené v kvasených nápojoch na báze ovocia.....	189
11.3	Zistené mikroplasty v kvasených nápojoch na báze ovocia.....	196
11.4	Techniky použité na obmedzenie tvorby a odstraňovanie kontaminantov ....	197
11.4.1	Enzymatické metódy .....	197
11.4.2	Chemické metódy.....	198
11.4.3	Fyzikálne metódy.....	199
11.4.4	Postupy biologickej dekontaminácie.....	200
<b>12</b>	<b>Biotechnologický potenciál kávovej dužiny a kávových šupiek pre bioprosedy .....</b>	<b>201</b>
12.1	<b>Káva.....</b>	<b>202</b>
12.1.1	Priemyselné spracovanie kávových čerešní .....	202
12.1.2	Prírodná mikrobiota izolovaná z kávovej dužiny/šupky .....	203
12.1.3	Bioprosedy využívajúce kávovú dužinu a šupky .....	204
12.1.4	Produkty a aplikácie .....	205
<b>13</b>	<b>Fermentácia kakaa a kávy .....</b>	<b>209</b>
13.1	Proces fermentácie kakaa .....	210
13.2	Proces fermentácie kávy.....	211
	<b>Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>214</b>

# Úvod

Mikroorganizmy plnia na našej planéte rôzne úlohy, z ktorých väčšina je dôležitá urobiť zo Zeme obývateľný a udržateľný ekosystém. Mnoho vlastností mikroorganizmov sa využívajú v biotechnológiách s nízkym vstupom na riešenie rôznych problémov súvisiacich so životným prostredím, potravinovou bezpečnosťou, výživou, biodegradáciou, bioremediáciou, udržateľným poľnohospodárstvom, bio-energetikou a biopalivami, bio-priemyslom vrátane mikrobiálnych enzýmov/extremozýmov, probiotík atď. Učebné texty zahŕňajú širšie aspekty a odhaľujú úlohu mikroorganizmov pri dosahovaní trvalo udržateľného sveta. Zameriavajú sa na rôzne mikrobiálne technológie súvisiace s obživou ekosystémov a dosahovanie cieľov trvalo udržateľného rozvoja. Mikrobiálne biotechnológie prinášajú informácie o technológiách na báze mikroorganizmov na nahradenie škodlivých chemikálií v poľnohospodárstve, zelených alternatívach k fosílnym palivám, využitie mikroorganizmov na rekultiváciu pustatín/regiónov postihnutých stresom, bioremediácia kontaminovaných biotopov, bio-degradačné účely. Mikrobiálne biotechnológie sa zameriavajú aj na využitie mikroorganizmov na rôzne priemyselné účely vrátane enzýmov, extrémofilných mikroorganizmov a enzýmy, čistenie odpadových vôd, potravinárske výrobky. Mikrobiálne biotechnológie sa zameriavajú na súčasné témy súvisiace s mikrobiálnou technológiou zo všetkých častí sveta, čím sa zisťuje kľúčová úloha mikroorganizmov pri udržiavaní ekosystémov. Aplikácia mikrobiálnej biotechnológie v záhradníctve má veľký význam, pretože má potenciál zvýšiť produktivitu, zlepšiť kvalitu a trvanlivosť produktov, kontrolovať choroby a škodcov a vyvinúť nové techniky v spracovaní potravín. Okrem toho využitie mikrobiálnej technológie v záhradníctve zahŕňa rôzne vedecké činnosti vrátane aplikácie prostriedkov na biologickú fixáciu dusíka ( $N_2$ ) v zeleninových strukovinách, bio-hnojivách, mikrobiálne pesticídy a prostriedky na mikrobiálnu biologickú kontrolu proti rastlinným patogénom. Okrem toho možno mikrobiálne systémy využiť na bio-konverziu rastlinných materiálov, ako sú systémy na výrobu biomasy a biopáliv, na biologické spracovanie fermentovaných potravín a nápojov, na obohacovanie bielkovinami v záhradníckych odpadových produktoch na použitie v krmivách pre zvieratá, na výrobu mikrobiálnych enzýmov potrebných v záhradníctve, v priemysle a ako nástroje na konštrukciu transgénnych rastlín.

Veríme, že predkladané skriptá umožnia študentom FZKI a študentom príbuzných odborov prírodovedného a biotechnologického zamerania, získať potrebné vedomosti z mikrobiálnych biotechnológií, a že zároveň siahnu po nej i odborníci z praxe, či sa jedná o záhradníctvo, životné prostredie, verejné zdravotníctvo, výskumné a diagnostické laboratóriá.

**Naše poďakovanie patrí prof. RNDr. Leone Buňkovej, PhD. a prof. Ing. PaedDr. Jane Žiarovskej, PhD. za cenné návrhy a pripomienky k rukopisu.**

**Skriptá vznikli za podpory projektu KEGA 010SPU-4/2021 Internacionalizácia vzdelávania a tvorba nových učebných textov v jazyku anglickom pre akreditovaný študijný program "International Master of Horticulture Science (IMHS)" a pre program Erasmus.**





# 1 Interakcie medzi rastlinami a mikroorganizmami a ich vplyv na produktivitu plodín

Mikroorganizmy sa nachádzajú v podzemných aj nadzemných častiach a delia sa na fylosférické mikroorganizmy, ktoré sa vyskytujú na povrchu listov, stoniek, kvetov a plodov, a rhizosférické mikroorganizmy, ktoré žijú v pôde, alebo v primárnych koreňoch rastlín. Podobne, epifytické mikroorganizmy sa nachádzajú na povrchu rastlín, zatiaľ čo endofytické mikroorganizmy žijú vo vnútri rastlinného tkaniva. Najčastejšie vyskytujúce sa podzemné mikroorganizmy patria do skupín *Acidobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Planctomyces* a *Actinobacteria*. Väčšina mikroorganizmov sa prenáša horizontálne (výmena genetického materiálu medzi organizmami), zatiaľ čo niektoré baktérie sa prenášajú prostredníctvom semien, ktoré sa nakoniec premenia na korene. Najdominantnejšie nadzemné endofytické mikroorganizmy patria do rodov *Dyella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* a *Mesorhizobium* a fylosférické nadzemné mikroorganizmy, ako sú *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Frigoribacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter* a *Acinetobacter*, sú bežnými zástupcami. Interakcia medzi rastlinami a mikroorganizmami ovplyvňuje rast rastlín pozitívnym aj negatívnym spôsobom. Pozitívna interakcia vedie k fixácii dusíka, zvýšenej tolerancii voči biotickému a abiotickému stresu a k produkcii biofilmov, alebo antibiotík, ktoré fungujú ako biokontrola proti napadnutiu patogénmi, zatiaľ čo negatívna interakcia vytvára asociácie s patogénnymi baktériami, parazitickými rastlinami, hubami a herbivormi.

## 1.1 Rôzne typy interakcií medzi rastlinami a mikroorganizmami

Mikroorganizmy komunikujú s rastlinami aj inými spôsobmi, ako je napríklad mutualizmus, komenzalizmus, amenzalizmus, symbióza a patogenéza.

### 1.1.1 Mutualizmus

Mutualistická interakcia medzi rastlinami a mikroorganizmami je vzájomne prospešná. Počas tejto interakcie mikroorganizmy kolonizujú svoje hostiteľské rastliny, aby získali prístup k živinám. Táto interakcia sa bežne vyskytuje u strukovín a rhizóbií, kde baktérie prenikajú do koreňa rastliny a vytvárajú špecializovaný orgán nazývaný uzlíky (hrčky). Uzlíky vytvorené prienikom baktérií do rastlín premieňajú dusík na amoniak, ktorý rastliny ďalej využívajú a umožňuje strukovinám prežiť v pôde ochudobnenej o dusík. Týmto spôsobom si navzájom prospievajú strukoviny aj baktérie. Takáto mutualistická interakcia prebieha aj medzi rastlinami a hubami, keď rastliny poskytujú hubám uhlík vo forme cukru a organických molekúl, zatiaľ čo huby zachytávajú vodu a živiny z pôdy pre rastliny. Ektomykorízne a endomykorízne huby (arbuskulárne mykorízy) sú dve formy húb, ktoré interagujú s rastlinami. Ektomykorízne huby, ako naznačuje názov, zostávajú na povrchu rastlín a nevstupujú do vnútra rastlinných tkanív, zatiaľ čo endomykorízne huby prenikajú do vnútra rastlinného tkaniva. Arbuskulárna mykoríza (AM) je najrozšírenejšou formou, ktorá interaguje s rastlinami tvorbou hýf sprevádzanou vývojom apresórií vedúcich k tvorbe arbuskul a vstupu do kôry rastlinného tkaniva. Zistilo sa, že metabolity prítomné

v koreňových exudátoch ako strigolaktóny (rastlinný hormón) priťahujú AM huby a existuje hypotéza, že strigolaktóny pôsobia ako signál pre tvorbu hýf u AM húb.

### 1.1.2 Komenzalizmus

Komenzalizmus je dlhodobá medzidruhová interakcia, ktorá je prospešná pre jeden druh a nemá žiadny vplyv na druhý. Chemolitotrofné baktérie a archeá oxidujúce amoniak premieňajú amónium na dusitany. *Nitrospira* a *Nitrobacter* potom premieňajú dusitany na dusičnany. Dusitany sú pre oxidátory amoniaku toxické, preto sú oxidátory amoniaku zvýhodnené. *Nitrospira* aj *Nitrobacter* zostávajú neovplyvnené.

### 1.1.3 Amensalizmus

Chemické látky uvoľňované jedným organizmom môžu poškodiť, alebo zničiť iný organizmus vo forme interakcie. Amensalizmus známy aj ako antibióza a nastáva vtedy, keď jeden mikroorganizmus produkuje antimikrobiálnu látku, ktorá je škodlivá pre iné mikroorganizmy. Napríklad antibiotikum 2,4-DAPG (2,4-diacetylfloroglucinol) produkované *Pseudomonas fluorescens*, ktoré poskytuje rezistenciu prvku *Acanthamoeba castellanii*, *Bacillus* spp. a *Streptomyces* spp. a *Pseudomonas* spp. tiež produkuje bioaktívne lipopeptidy, ktoré narúšajú bunkovú membránu patogénov, ako sú oomycéty a trofozoity *Naegleria americana*, a zabíjajú ich.

### 1.1.4 Symbióza

Parasymbióza je symbióza, pri ktorej nový organizmus vstupuje do existujúcej symbiózy. Spoločná symbiotická cesta (CSP) sa iniciuje väzbou lipochitooligosacharidov (LCO) na receptor s lyzínovým motívom (LysM) prítomný na bunkovej membráne rastlín. Tak strukoviny a iné rastliny majú na svojej plazmatickej membráne receptory LysM, ktoré sa viažu na LCO uvoľňované rhizóbiami a AM hubami.

### 1.1.5 Patogénne interakcie

Patogénne mikroorganizmy môžu viesť k progresii ochorenia rastlín a môžu v nich stimulovať obranný systém. Rastlinné transmembránové receptory rozoznávajú všeobecné elicitory (zlúčeniny, ktoré sú schopné stimulovať tvorbu iných zlúčenín vnútri bunky), ktoré produkuje patogén, a aktivujú obranné mechanizmy známe ako mikrobiálne, alebo s patogénmi spojené molekulárne vzory (MAMPs/PAMPs) a receptory rozpoznávania vzorov (PRR). PAMPs vyvolávajú v rastlinách obranný mechanizmus prvej línie. MAMPs/PAMPs ďalej spúšťajú dva typy imunity: horizontálnu imunitu, ktorá spúšťa imunitu MTI/PTI, a vertikálnu imunitu nazývanú ako imunita spúšťaná efektorom (ETI)/R na báze génov. ETI sa vytvára proti avirulentným proteínom vylučovaným patogénmi v rastlinách. V dôsledku toho efektorové molekuly uvoľnené z MTI/PTI imunity, alebo ETI vyvolávajú hypersenzitívnu reakciu (HR), ktorá obmedzuje vstup patogénov do rastlín. Keď patogén uvoľňuje elicitory, MAMP/PAMP a PRR prítomné na plazmatickej membráne zabraňujú kolonizácii patogénov a infekcii. Produkovanými obrannými faktormi sú fenolové zlúčeniny, lignín, elektrolytické úniky, fytoalexíny a inhibítory proteináz. Uvádza sa, že významnú úlohu v obrane proti patogénom zohráva aj receptor NB-LRR (Nucleotide-binding leucine-rich repeat). NB-LRR blokuje receptory rozpoznávania vzorov (pattern recognition receptors – PRR) prostredníctvom efektorových molekúl a zabraňuje infekcii.

## 1.2 Mechanizmy interakcie rastlina-mikroorganizmus

### 1.2.1 Prostredníctvom koreňových exsudátov

Korene vylučujú do okolia koreňové exsudáty, ktoré majú pozitívne aj negatívne účinky na okolité rastliny a mikroorganizmy. Oblasť, v ktorej sa tieto zlúčeniny vylučujú, sa nazýva rhizosféra. Rhizosféra obsahuje tri zóny ako endorhizosféru, ktorá sa nachádza medzi kortikálnou vrstvou a endodermis, rhizoplán, ktorý sa nachádza medzi sliznicou a epidermidis, a ektorhizosféru, ktorá je v blízkosti koreňov. Väčšina mikroorganizmov sa bežne vyskytuje v ektorhizosfére. Exsudáty vylučované v ektorhizosfére sú aminokyseliny, sacharidy, fenoly, organické kyseliny a iné sekundárne metabolity, ako sú prchavé organické zlúčeniny (VOC), kyselina jazmónová (JA) a kyselina salicylová (SA), ktoré majú nízku molekulovú hmotnosť, zatiaľ čo sliz (sacharidy), proteíny a lipopolysacharidy majú vysokú molekulovú hmotnosť. Rast rastlín podporujúce rhizomikroorganizmy (PGPR) sú mikroorganizmy, ktoré sú prítomné v rhizosfére a sú užitočné pri posilňovaní obranyschopnosti a indukovanej odolnosti hostiteľskej rastliny. Rast rastlín podporujúce rhizobaktérie (PGPR) prinášajú rastlinám priamy a nepriamy úžitok. Fixácia dusíka, solubilizácia minerálnych látok, produkcia siderofóru a fytohormónu sú priame mechanizmy, zatiaľ čo produkcia antibiotík, lipopolysacharidov, hydrolytických enzýmov a indukovaná systémová rezistencia (ISR) sú nepriame mechanizmy. Fenazín-1-karboxylová kyselina (PCA) je antibiotikum, ktoré pôsobí na *Sclerotium rolfsii* a *Gaeumannomyces graminis*, ktoré sa podieľajú na spôsobovaní ochorenia stoniek arašidov a pšenice. Rhizosférické zlúčeniny sa vylučujú aktívnymi a pasívnymi mechanizmami. Aktívny transport je sprostredkovaný membránovými transportérmi ABC (ATP-binding cassette) a MATE (multidrug and toxic extrusion). ABC transportéry sú primárne aktívne transportéry, ktoré hydrolyzujú ATP na transport rôznych rozpustených látok, zatiaľ čo MATE sú sekundárne aktívne transportéry, ktoré umožňujú pohyb rôznych zlúčenín cez membránu pomocou elektrochemického gradientu. MATE tiež detoxikujú sekundárne metabolity, ako je fenol a kovy. Na druhej strane pasívny transport zahŕňa difúziu, iónové kanály a vezikulárny transport.

- 1. Difúzia:** Difúzia medzi cytoplazmou koreňových buniek a rhizosférou uľahčuje uvoľňovanie nízko-molekulových zlúčenín, ako sú cukry, karboxylová kyselina, aminokyseliny a fenoly, do rhizosféry.
- 2. Iónové kanály:** Na aktiváciu iónových kanálov je potrebných niekoľko proteínov, ktoré potom uľahčujú vylučovanie rôznych sacharidov, ako sú malát a oxalát vo veľkom množstve. Existujú dva typy aniónových kanálov: pomalý aniónový kanál (SLAC) známy aj ako typ S a rýchly aniónový kanál (QUAC) známy aj ako typ R (rýchly typ). Hliníkom aktivovaný malátový transport (ALMT) je príkladom iónového kanála, v ktorom sa na vylučovanie malátu používajú ióny  $Al^{3+}$ .
- 3. Vezikulárny transport:** Vysokomolekulárne metabolity sa vylučujú vezikulárnym transportom. Tieto molekuly sú uzavreté vo vezikulách a uvoľňujú sa do rhizosféry exocytózou. Vylučované metabolity vznikajú v endoplazmatickom retikule a Golgiho aparáte, odkiaľ sa aktívnym transportným mechanizmom uzavretých vezikul transportujú k bunkovej membráne a uvoľňujú sa do okolia.

### 1.2.2 Pozitívna interakcia rastlín a mikroorganizmov sprostredkovaná koreňovými exsudátmi

- 1. Nodulácia strukovín rhizóbiami:** Rhizóbia vytvárajú symbiotické spojenie s leguminózami, ktoré vedie k fixácii atmosférického dusíka prostredníctvom koreňových uzlín. Tvorba koreňových hľúz je stimulovaná koreňovými exsudátmi a expresiou génov hľúz.
- 2. Mykorízne huby:** Ako už bolo uvedené, ektomykorízne a endomykorízne AM huby sú dve formy húb, ktoré interagujú s rastlinami. Zistilo sa, že strigolaktóny v koreňových exudátoch priťahujú pozornosť AM húb, ktoré ďalej zohrávajú významnú úlohu pri tvorbe a vývoji hýf.
- 3. PGPR (rhizobaktérie podporujúce rast rastlín):** ovplyvňuje rastliny priamym a nepriamym spôsobom. Zlepšuje rast rastlín dodávaním živín, ako je dusík, fosfor, draslík a iné základné minerálne látky, priamo, zatiaľ čo nepriamo znižuje, alebo potláča účinok rôznych patogénov ako biokontrolných činiteľov.
  - (a) Priama interakcia medzi rastlinou a mikroorganizmov prostredníctvom PGPR sa** podieľajú na fixácii dusíka symbioticky (s mikroorganizmami) a asymbioticky (s voľne žijúcimi diazotrófmi). Podieľa sa aj na rozpúšťaní fosfátov a produkcii siderofrov. Solubilizáciu fosfátov vykonávajú mikroorganizmy solubilizujúce fosfáty, ktoré menia nerozpustné fosfáty na rozpustné fosfáty, ktoré môžu rastliny ľahko absorbovať. Tento proces sa iniciuje uvoľňovaním zlúčenín, ako sú protóny, anióny organických kyselín, hydroxylové ióny, CO<sub>2</sub> a extracelulárny enzým. *Enterobacter*, *Arthrobacter* a *Azotobacter* sú bakteriálne kmene, ktoré rozpúšťajú fosfát pomocou exopolysacharidu (EPS). Na druhej strane k tvorbe siderofórov dochádza za podmienok obmedzujúcich obsah železa. Stimuluje mikrobiálny príjem železa z pôdy a uľahčuje ho rastlinám. Hydroxamáty, katecholáty a karboxyláty sú tri hlavné skupiny siderofórov na základe ich funkčnej skupiny.
  - (b) Nepriama interakcia rastlín a mikroorganizmov prostredníctvom PGPR**
- 4. Antibióza:** Antibiotiká ako amfizín, 2,4-DAPG, fenazín a oomycín produkované mikroorganizmami zabraňujú rozmnožovaniu patogénov v rastlinách.
- 5. Indukovaná systémová rezistencia (ISR):** Existujú tri cesty, z ktorých dve sa podieľajú na patogénnom útoku a jedna na ranách a nekróze.
- 6. Produkcia biofilmu:** Produkcia biofilmu si vyžaduje dva kroky. Prvým je adhézia buniek a druhým je tvorba matrice extracelulárnej polymérnej látky, ktorá sa skladá z polyméru 1,6-väzby N-acetylglukozamínu.

### 1.2.3 Negatívna interakcia rastlín a mikroorganizmov sprostredkovaná koreňovými exsudátmi

Inhibícia quorum-sensing (schopnosťou detekovať a reagovať na hustotu bunkovej populácie pomocou génovej regulácie) je negatívna interakcia medzi rastlinou a mikroorganizmom. Rastliny používajú symbiotické signály, prchavé látky a quorum-sensing na kolonizáciu a komunikáciu. Malé autoinduktory (AI), ako napríklad N-acyl-homoserín laktón (AHL), sú zodpovedné za interakciu medzi bunkami počas procesu quorum-sensing v rastlinách. Niektoré druhy, ako napríklad červená riasa *Delisea pulchra*, vylučujú halogénované furanóny, ktoré napodobňujú AHL a môžu blokovat' quorum-sensing (QS). Tieto molekuly majú schopnosť narušiť procesy riadené QS vrátane bioluminiscencie a rojenia.

## Siderofóry

Železo je pre rastliny a živočíchy nevyhnutným prvkom, pretože sa podieľa na rôznych funkciách, ako je fixácia dusíka, dýchanie, fotosyntéza a detoxikácia. Rastliny absorbujú železo väčšinou vo forme  $\text{Fe}^{2+}$ , ale niekedy aj vo forme  $\text{Fe}^{3+}$ . Považuje sa za štvrtý najčastejší prvok na Zemi.

Bez ohľadu na túto skutočnosť a vzhľadom na nízku rozpustnosť železa v alkalicknej pôde nie sú rastliny a mikroorganizmy schopné prijímať železo. Na prekonanie tejto situácie si mikroorganizmy vyvinuli špecializovaný mechanizmus "siderofórov" na konzumáciu železa z prostredia.

Siderofór je špecializovaná štruktúra s nízkou molekulovou hmotnosťou menšou ako 10 kDa, ktorá má vysokú afinitu k iónu železa. Prijíma ióny  $\text{Fe}^{3+}$  z rôznych stanovišť a uľahčuje ich prenos do rastlín. Nielenže chelatuje železo, ale podieľa sa aj na zvetrávaní pôdnych minerálov a posilňovaní rastu rastlín. Baktérie podporujúce rast rastlín (PGPB) produkujú siderofóry, ktoré sa viažu na železo a sprístupňujú ho hostiteľskej rastline. Tento mechanizmus je dôležitý, pretože poskytuje železo rastlinám aj mikroorganizmom a zvyšuje mieru ich prežitia. PGPB sú schopné premieňať  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  je v prírode rozpustné a môže sa ľahko dostať do bakteriálnej bunky, zatiaľ čo  $\text{Fe}^{3+}$  je nerozpustné a do bunky sa dostáva pomocou siderofóru. Siderofóry produkované PGPB tvoria komplex ferri-siderofór, ktorý sa viaže na určitý receptor prítomný na povrchu. Po naviazaní komplexu na receptor nasleduje naviazanie transportných proteínov na komplex. Tieto proteíny potom transportujú komplex do cytoplazmy. Pri bioremediácii železa používajú grampozitívne a gramnegatívne baktérie rôzne transportné mechanizmy. Gramnegatívne baktérie obsahujú lipopolysacharidovú membránu na vonkajšej strane a receptor TonB umiestnený na cytoplazmatickej membráne. Komplex železitého siderofóru sa viaže na lipopolysacharidovú membránu a potom sa cez periplazmatický priestor viaže na receptor TonB. Potom sa z receptora TonB komplex viaže na komplex ATP, ktorý je tiež prítomný na cytoplazmatickej membráne, a putuje do cytoplazmy, kde sa  $\text{Fe}^{3+}$  mení na  $\text{Fe}^{2+}$ . Grampozitívne baktérie nemajú lipopolysacharidovú membránu. Preto sa komplex priamo viaže na cytoplazmatickú membránu a putuje do cytoplazmy, kde sa  $\text{Fe}^{3+}$  premieňa na  $\text{Fe}^{2+}$ .

Kategorizácia siderofórov vyplýva z ich chemickej štruktúry a vylučuje ich celý rad skupín PGPB. Takéto siderofóry sú hydroxamát, katecholát a karboxylát, ktoré sa kategorizujú na základe ich chemického zloženia:

**1. Hydroxamátový siderofór:** V baktériách sú hydrofilné siderofóry zložené z alkylamínov a acylovaných alkylamínov, zatiaľ čo v hubách sú zložené z hydroxylovaného a alkylovaného ornitínu. N5-acyl-N5-hydroxyornitín a N6-acyl-hydroxylyzín sú hlavnými zložkami siderofóru u húb.

**2. Katecholátový siderofór:** Je zložený z katecholátu a hydroxylovej skupiny, ktorá sa viaže na  $\text{Fe}^{3+}$  a premieňa ich na  $\text{Fe}^{2+}$ . Katecholátový siderofór vzniká spojením dvoch molekúl kyslíka, každej z hydroxamátovej skupiny a katecholátu. Vyskytuje sa len v baktériách.

**3. Karboxylátový siderofór:** Mikroorganizmy ako *Sinorhizobium meliloti* a *Zygomycetes* produkujú karboxylátové siderofóry. Tieto mikroorganizmy na chelatáciu železa využívajú svoje funkčné skupiny, ako sú hydroxylové

a karboxylové skupiny. Okrem toho pozostáva aj z jedného D-ornitínu a dvoch zvyškov kyseliny citrónovej, ktoré sú spojené dvoma amidovými väzbami. Siderofóry majú rôzne tvary, veľkosti a vlastnosti. Siderofóry majú zachované štruktúry, ktoré sa viažu na molekuly feritínu a laktoferínu. Hydroxamátové siderofóry, ako napríklad dihydroxybenzoylserín trimer odvodený od enterobaktínu, majú komplexnú štruktúru a sú hydrofilnejšie. Siderofóry majú hexadentátnu štruktúru, ktorá priraduje železo k šiestim železitým koordinačným miestam. Afinita k Fe (III) je vyššia u hexadentátnych siderofórov ako u tetradentátnych siderofórov.

Siderofóry tiež inhibujú rast patogénov. *Pseudomonas putida* produkuje siderofóry pseudobaktíny, ktoré inhibujú rast patogénu *Ralstonia solanacearum* v *Eucalyptus urophylla*, *Erwinia carotovora* v tabaku a *Botrytis cinerea* v rajčiakoch. Pseudobaktíny produkované z *Pseudomonas fluorescens* chránia rastlinu *Arabidopsis* pred vírusom krčenia repy a rastlinu tabaku pred vírusom nekrózy tabaku. *Rhizobium meliloti* RMP3 a RMP5 produkujú siderofóry, ktoré chránia rastlinu pred patogénom *Macrophomina phaseolina*.

### 1.3 Prospešné/pozitívne interakcie na zvýšenie produktivity rastlín

#### 1.3.1 Fixácia dusíka

Fixácia dusíka je dôležitou zložkou cyklu dusíka, pretože dopĺňa celkový obsah dusíka, ktorý je menej náchylný na vyplavovanie a prchavosť. Je to proces, pri ktorom sa dusík premieňa na amoniak pomocou voľne žijúcich baktérií, alebo symbiotických baktérií a má potenciál zachytávať atmosférický CO<sub>2</sub>. Je obmedzený len na prokaryoty a chýba u eukaryotov. Na fixácii dusíka sa podieľajú firmibaktérie, sinice, proteobaktérie, zelené sírové baktérie, aktinobaktérie a archeá, najmä metanogény. Mikroorganizmy fixujúce dusík sú aeróbne (*Azotobacter*), fakultatívne anaeróbne (*Klebsiella*), anaeróbne, heterotrofné (*Clostridium*), fototrofné (*Anabaena*), chemolitotrofné (*Leptospirillum ferrooxidans*) atď.

Nitrogenázy sú enzýmy, ktoré sa podieľajú na fixácii dusíka. Sú to zachované metaloenzýmy, ktoré redukujú dusík (N<sub>2</sub>) na amoniak. Obsahuje dve zložky: menšia zložka je železitý proteín, ktorý prenáša elektróny na väčšiu heterotetramerickú zložku MoFe proteín.

#### 1.3.2 Solubilizácia fosfátov

Baktérie rozpúšťajúce fosfáty (PSB) môžu premieňať nerozpustný fosfor na rozpustný a pôsobiť ako biohnojivá. Tieto biohnojivá sú šetrné k životnému prostrediu a zvyšujú produktivitu potravín. Okrem toho vyvolávajú produkciu fytohormónov, zlepšujú dostupnosť stopových prvkov a zvyšujú účinnosť fixácie dusíka. Najviac PSB majú rody *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Kushneria*, *Paenibacillus*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Sinomona* a *Thiobacillus*. Pôdne huby sa môžu pohybovať na veľké vzdialenosti rýchlejšie ako baktérie a môžu vylučovať kyseliny, ako je kyselina mliečna, octová, šťaveľová, 2-ketoglukónová a vínna, ktoré sú dôležité pre rozpúšťanie fosfátov. Podľa správ sa na solubilizácii fosfátov podieľa 20 % aktinobaktérií, ako sú *Actinomyces*, *Streptomyces* a *Micromonospora*.

### 1.3.3 Solubilizácia anorganického fosfátu pomocou PSM

Organické kyseliny so svojimi karboxylovými a hydroxylovými iónmi sú schopné vytvárať komplexy s kationmi. Vylučovanie týchto organických kyselín má za následok pokles pH, ktorý spôsobuje okyslenie okolia, po ktorom nasleduje substitúcia vodíkových iónov kationmi, čo vedie k uvoľňovaniu fosforečných iónov do okolia. Ďalšie zlúčeniny, ktoré sa podieľajú na uvoľňovaní fosforu, sú siderofóry, CO<sub>2</sub>, protóny a hydroxylové ióny. Vylučovanie organických kyselín v pôde spôsobuje okyslenie mikrobiálnych buniek a okolia. Alternatívne existuje ďalší mechanizmus solubilizácie fosforu pomocou H<sup>+</sup> translokácie ATPázy. Pri tomto procese dochádza k výmene kationov s povrchom H<sup>+</sup>. Kyselina glukónová sa považuje za najdôležitejšiu organickú kyselinu zodpovednú za solubilizáciu fosfátov. Gramnegatívne baktérie solubilizujú fosfát premenou glukózy na kyselinu glukonovú priamou oxidáciou.

### 1.3.4 Mineralizácia organického fosforu pomocou PSM

Mineralizácia fosforečnanov je rozpúšťanie iba organickej časti molekuly fosforu a rozklad zvyšnej časti. Zdroje uvádzajú, že v pôde sa nachádza 30 – 50 % organického fosfátu a väčšinou je prítomný vo forme inozitolfosfátu. Fosfomonoestery, fosfodiester, fosfolipidy, nukleové kyseliny a fosfotriester sú niektoré z ďalších organických zlúčenín fosforu. Organický P sa vo veľkom množstve vyskytuje aj vo forme xenobiotických fosfonátov, ako sú pesticídy, prísady do detergentov, antibiotiká a spomaľovače horenia. Organické zlúčeniny majú vysokú molekulovú hmotnosť a sú odolné voči chemickej hydrolýze; preto je potrebné ich pred asimiláciou bunkou premeniť na rozpustný iónový fosforečnan, ako je HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, alebo nízkomolekulový organický fosforečnan. Mineralizácia fosfátov sa uskutočňuje pomocou rôznych tried enzýmov. Enzýmy, ktoré defosforylujú fosforový ester, alebo fosforovo-anhydridovú väzbu organických zlúčenín, sú známe ako nešpecifické kyslé fosfatázy (NSAP). Enzýmy NSAP sú fosfomonoesterázy a vylučujú ich PSM. Fytáza je ďalší enzým uvoľňovaný PSM, ktorý sa podieľa na rozpúšťaní fosfátov. Tento enzým uvoľňuje fosfor z fytátov získaných z rastlinných semien a peľu v pôde.

### 1.3.5 Biohnojivá

Rozsiahle používanie hnojív na plodiny spôsobilo zrušenie produktivity poľnohospodárskeho systému a rýchle zvýšenie nákladov na pestovanie, čo viedlo k stagnácii príjmov poľnohospodárov a vyvolalo obavy o potravinovú bezpečnosť. Chemické hnojivá na báze dusíka a fosfátov sa bežne používajú na zvýšenie produktivity plodín, ale zároveň majú potenciál znečisťovať atmosféru a podzemné vody, ako aj spôsobovať eutrofizáciu a okysľovanie pôdy. Rastliny pestované pri vysokom obsahu dusíka vedú k tvorbe karcinogénnych zlúčenín, ako sú nitrozamíny, ktoré sa nachádzajú v potravinách, ako sú listy šalátu a špenátu. Dusičnany sú základnou zložkou dusíkatých hnojív a podieľajú sa na kontaminácii vody. Využitie dusíkatých hnojív rastlinami je len 50 %, 2 – 20 % hnojív sa vyparí, 15 – 25 % reaguje s organickými zlúčeninami v ílovitej pôde a zvyšných 2 – 20 % zasahuje povrchové a podzemné vody. Ďalšou nevýhodou dusíkatých hnojív je, že ich rastliny úplne neabsorbujú a ničia podzemné a nadzemné biotopy. Vplýva nielen na rastliny, ale aj na ľudí tým, že spôsobuje zdravotné problémy, ako je methemoglobínémia, alebo syndróm modrého dieťaťa. Hlavnou príčinou tohto ochorenia je hromadenie

dusičnanov v krvi, ktoré vedie k premene dusičnanov na dusitany a inhibícii prenosu kyslíka do buniek, pričom zdrojom je voda kontaminovaná dusičnanmi. Dusičnany možno odstrániť metódou elektrokoagulácie adsorpciou na  $Al(OH)_3$  a redukciou dusičnanov na dusitany, alebo amónium. Na druhej strane sú biohnojivá alternatívou k chemickým hnojivám, ktoré sú v súčasnosti potrebné na zníženie našej závislosti od dusíkatých hnojív. Biohnojivá poskytujú využitie obnoviteľných vstupov kombináciou biologických s prospešnými mikroorganizmami na zvýšenie produktivity plodín a dodanie živín do poľnohospodárskeho podniku. Mikroorganizmy v biohnojivách kolonizujú rhizosféru a podporujú stav živín hostiteľskej rastliny, keď sa aplikujú na povrch rastlín, semená, alebo pôdu.

### Výroba biohnojív

Výroba biohnojív zahŕňa izoláciu, identifikáciu a funkčnú charakterizáciu požadovaných a netoxických mikroorganizmov, ktoré podporujú rast rastlín. Tieto mikroorganizmy sa izolujú z pôdy, alebo rhizosféry. Mikroorganizmy sa potom pestujú v kultivačných médiách a vykonáva sa kvalitatívne testovanie s cieľom charakterizovať funkčné vlastnosti mikrobiálneho kmeňa. Potom sa vyberie čistý kmeň na základe požadovaných požiadaviek na biohnojivá, ako je rozpúšťanie živín, mobilizácia živín, fixácia dusíka a produkcia fytohormónov. Vybraný kmeň sa potom určí pestovaním na selektívnych médiách a kvantitatívnym testovaním. Potom sa vyberie materiál na formuláciu, napríklad granulovaný prášok, alebo kaša. Formulovací materiál môže byť tekutý, alebo pevný. Nosič sa používa na udržanie mikroorganizmov pri živote. Ďalším krokom je kultivácia vybraného kmeňa v optimálnych podmienkach v laboratóriu, čím sa zvýši počet vybraných kmeňov. Ďalším krokom je tvorba prototypu, pri ktorej sa vyberie najlepší výrobok, a posledný krok zahŕňa testovanie výrobku v teréne a v rôznych podmienkach s cieľom určiť jeho účinnosť a obmedzenia.

### Rôzne typy biohnojív

- 1. Biohnojivo rozpúšťajúce fosfáty:** Baktérie solubilizujúce fosfáty (PSB) majú potenciál premieňať nerozpustný anorganický fosfor na rozpustné formy produkciou kyselín, chelatáciou a metódou iónovej výmeny. PSB fixujú fosfor vo forme  $HPO_4^{2-}$  a  $H_2PO_4^-$ . *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Achromobacter* a *Flavobacterium* sú populácie baktérií, ktoré rozpúšťajú anorganické zlúčeniny fosforečnanov, ako sú kamenný fosforečnan, trikalciumpfosfát, dikalciumpfosfát a hydroxyapatit.
- 2. Biohnojivá mobilizujúce fosfáty:** Fosfát-mobilizujúce mikroorganizmy (PMM) zachytávajú fosfáty z rastlín a mobilizujú ich. Mykorízy sú dôležitými mobilizátormi fosfátov v symbiotickom vzťahu s koreňmi rastlín, kde huba získava uhlík z rastlín a rastliny získavajú mikro- a makroživiny z húb.
- 3. Biohnojivá rozpúšťajúce zinok:** Zinok je pre rastliny veľmi potrebný mikroelement. Použitie síranu zinočnatého je drahé, a preto sa v súčasnosti uprednostňujú baktérie rozpúšťajúce zinok, ako napríklad *Bacillus* spp. Používajú sa aj mikroorganizmy rozpúšťajúce zinok v kombinácii s lacnejšími zlúčeninami zinku, ako je oxid zinočnatý, uhličitan zinočnatý a sulfid zinočnatý.
- 4. Biologické hnojivá viažuce dusík:** Viazanie dusíka je po fotosyntéze druhým najdôležitejším mechanizmom v rastlinách, pri ktorom sa plynňý dusík premieňa na



amónium. Fixácia dusíka môže vyprodukovať 300 – 400 kg/N/ha/rok. Baktérie viažuce dusík sú *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Cyanobacteria*, *Azolla* a *Azotobacter*. *Rhizobium* má symbiotický vzťah so strukovinami a nestruckovinami, ako je parasponia, ktorá môže viazať 50 – 100 kg dusíka. *Azospirillum* spp. patrí do čeľade Spirillaceae a má heterotrofný charakter. Môže viazať 20 – 40 kg dusíka. Tieto druhy sú gramnegatívne a nachádzajú sa na ryžových poliach. Cyanobaktérie a azolla sa nachádzajú na ryžových poliach a majú potenciál viazať 20 – 30 kg dusíka. *Azotobacter* je gramnegatívna voľne žijúca baktéria, ktorá sa vyskytuje v rhizosfére pôdy rôznych druhov rastlín. Dokáže viazať iba 10 mg dusíka a 1 g uhlíka.

**5. Biohnojivá oxidujúce síru:** Kombinácia tiobacilov so sírou robí alkalickú pôdu vhodnou na pestovanie plodín. *Thiobacillus* produkuje v pôde kyselinu sírovú, ktorá zvyšuje mobilizáciu živín a priťahuje ďalšie živiny, ako sú fosforečnany, draslík, vápnik, mangán, hliník a horčík, čím zvyšuje ich obsah v pôde.

**6. Biologické hnojivá rozpúšťajúce silikáty:** Baktérie solubilizujúce silikáty nielenže dodávajú do pôdy ióny  $H^+$ , ale tiež udržiavajú kyslý stav. Do pôdy tiež pridávajú organické zlúčeniny, ako sú kyseliny citrónová, kyselina šťaveľová a hydroxylkarbolická. Môže tiež odstraňovať organické kyseliny z pôdy vytváraním komplexu s kationmi.

## Výhody biohnojív

Biohnojivá sú nákladovo efektívne a ľahko sa vyrábajú vo veľkých množstvách. Nižšie sú uvedené najdôležitejšie výhody biohnojív:

- a) Biohnojivá obohacujú pôdu o dôležité živiny a mikroorganizmy.
- b) Biohnojivá sa podieľajú na fixácii dusíka.
- c) Biohnojivá zvyšujú odolnosť rastlín voči stresu tým, že podporujú hormóny a antimetabolity.
- d) Podieľa sa aj na bioremediácii ťažkých rastlín v pôde.
- e) Zvyšuje produktivitu plodín o 25 %.
- f) Podieľa sa na odstraňovaní toxínov z ekosystému.

### 1.3.6 Biopesticídy

Pesticídy sa už mnoho rokov používajú na ochranu plodín a hospodárskych zvierat pred škodcami, ale napriek ich priaznivým účinkom vyvolávajú aj obavy o životné prostredie a bezpečnosť potravín. Okrem toho znížili produktivitu plodín a spôsobili degradáciu pôdy, kontamináciu podzemných vôd a nedostatok výživy rastlín. Biopesticídy sú oproti pesticídom výhodnejšie, pretože sú menej škodlivé pre zdravie ľudí a zlepšujú výživný stav rastlín. Biopesticídy obsahujú živé patogénne mikroorganizmy, ktoré sa zameriavajú na konkrétnych škodcov. Patria medzi ne biofungicídy, bioherbicídy a bioinsekticídy.

## Klasifikácia biopesticídov

1. Biopesticídy obsahujú účinné látky, ako sú baktérie, huby, vírusy, prvoky, alebo riasy. Tieto účinné zložky sú zamerané na škodcov a mali by byť monitorované ľuďmi, aby sa zabezpečilo, že neovplyvnia základné druhy. Napríklad *Bacillus thuringiensis*, alebo Bt vylučuje bielkovinu, ktorá je jedovatá pre mnohých hmyzích škodcov.

2. Ochranné látky v rastlinách (PIP): Rastliny vylučujú pesticídne látky po vložení pesticídneho génu do rastliny. Výsledkom prenosu pesticídneho génu do rastlín je transkripcia tohto génu a produkcia špecifického proteínu, ktorý ničí škodcu. Vloženie Bt pesticídneho génu do rastlín produkuje proteín, ktorý zabíja škodcu, čo je príklad rastlinného biopesticídu.
3. Biochemické pesticídy: Biochemické pesticídy produkujú voňavé rastlinné výťažky, ktoré chytajú hmyz, alebo môžu zasahovať do procesu párenia hmyzu s cieľom kontrolovať škodcov. O týchto pesticídoch rozhoduje osobitný výbor zriadený Agentúrou na ochranu životného prostredia (EPA).
  - a) *Bacillus thuringiensis*: Je široko používaný ako biopesticíd a pôsobí najmä proti lepidopteróznym škodcom, ako je napríklad voška a stonkový červotoč. Po preniknutí do stredného čreva škodcu vylučuje Bt toxíny a škodcu usmrť. Kmene ako *Kurstaki*, *Galleria* a *Dendrolimus* sú poddruhy *Bacillus thuringiensis* používané ako biopesticíd.
  - b) *Baculovírus* sa podieľa na ničení rôznych škodlivých rastlinných škodcov, ako sú napríklad motýle (*Lepidoptera*), ktoré napádajú bavlnu, ryžu a zeleninu, ale je obmedzený na malé oblasti. V malom rozsahu ho vyrábajú oddelenia integrovanej ochrany proti škodcom a poľnohospodárske oddelenia.
  - c) *Trichoderma* je biopesticíd, ktorý ničí škodcov na hlavných strukovinách. Druhy *Trichoderma*, ako napríklad *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* a *T. reesei*, sú izolované z rôznych oblastí a zistilo sa, že pôsobia ako biopesticídy na strukoviny.
  - d) Antifungálna aktivita bakteriálnych endofytov ako *Pseudomonas*, *Bacillus* a *Paenibacillus* kontroluje patogény ako *Rhizoctonia bataticola*, *Fusarium udam*, *F. oxysporum* a *S. rolfsii* v strukovinách.
  - e) *Verticillium* a *Paecilomyces* sa používajú ako biopesticídy v strukovinách, zatiaľ čo *Paecilomyces*, *Pochonia chlamydosporia*, *Aspergillus nidulans* a *T. harzianum* sa používajú ako biopesticídy v sóji.

### 1.3.7 Fytostimulanty

Fytostimulant je akákoľvek látka, alebo mikroorganizmus, ktorý po exogénnom pridaní do rastliny, alebo pôdy zlepšuje výživný stav, kvalitu plodín, produktivitu plodín a toleranciu voči abiotickému stresu. Podľa Európskej kontroly biostimulačného priemyslu (EBIC) biostimulant pridaný do plodín, alebo rhizosféry zlepšuje príjem živín, kvalitu plodín a toleranciu voči abiotickému stresu. Fytostimulanty môžu byť živé, alebo neživé. Fytostimulanty na báze živých mikroorganizmov sú rhizosférické mikroorganizmy, ako napríklad PGPR, zatiaľ čo fytostimulanty na báze neživých mikroorganizmov sú humínové kyseliny, aminokyseliny, nitrobenzén, kyselina giberelová a morské riasy. Kyselina humínová vzniká rozkladom mikroorganizmov, ako sú baktérie a huby, a chemickým rozkladom rastlín a živočíchov. Kyselina humínová v kombinácii s kyselinou fulvovou vytvára organické zlúčeniny, ktoré zvyšujú prienik vody do pôdy a znižujú množstvo toxínov a škodlivých látok absorbovaných rastlinami. Aminokyseliny sú dôležité pre fytohormóny, klíčenie semien, delenie buniek, veľkosť semien, úrodu, opeľovanie, tvorbu plodov a metabolické procesy v rastlinách. Preto exogénny prísun aminokyselín do rastlín v mnohých ohľadoch zlepšuje rast rastlín. Výživné prvky, ako sú železo, morské riasy, dusík, mangán a draslík, tiež pôsobia ako

fytoestimulátory. Používajú sa morské riasy, ako sú hnedé, červené a zelené riasy. Hnedé morské riasy vrátane *Ascophyllum nodosum*, *Sargassum* spp., *Laminaria* spp. a *Turbinaria* spp. sa zameriavajú ako fytoestimulátory, ktoré zabezpečujú lepšiu adsorpciu živín, rýchlejšie klíčenie semien, kvalitu plodov, kvitnutie atď.

Formulácia fytoestimulátorov je veľmi dôležitým procesom pre rozvoj a účinnosť rastu rastlín. V tomto procese sa prírodné suroviny premieňajú na účinný, bezpečný a ekonomický produkt, ktorý sa dá skladovať, prepravovať a aplikovať. Prírodné suroviny, ktoré sa používajú, sú semená, listy a korene. Ich biologická aktivita sa hodnotí pomocou organických rozpúšťadiel.

### **1. Vstupy uvedené pre návrh formulácie:**

- Fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti zlúčenín.
- Marketingové vstupy, ako je spoľahlivosť, hospodárnosť, užívateľská prívetivosť a ochrana.
- Vstupy pre aplikáciu, ako je zariadenie, klíma a vybavenie.
- Vstupy výrobného procesu, ako je kontrola kvality a výrobné zariadenia.

### **2. Vývojové kroky:**

- Výskum, ako je laboratórna príprava, fyzikálne a chemické skúšky.
- Skúmanie zloženia zahŕňajúce biologickú účinnosť, fyto toxicitu, trvanlivosť, analytickú metódu a poľné skúšky v malom rozsahu.
- Obchodná úroveň zahŕňajúca návrh obalu.

### **3. Ďalšie požiadavky na návrh zloženia:**

- Pri aplikácii by nemal mať negatívny účinok.
- Prípravok by mal mať čo najväčší biologický účinok a mal by byť lacnejší.
- Cenovo dostupná veľkovýroba.
- Balenie a skladovanie by mali byť čisté.
- Dlhá skladovateľnosť a jednoduchá preprava.
- Mal by byť riadne registrovaný.

## **Výhody fytoestimulátorov**

Výhody fytoestimulátorov sú tieto:

1. Zlepšuje účinnosť kvality a metabolizmu plodín tým, že zlepšuje zdravie a vitalitu rastlín.
2. Zlepšuje odolnosť plodín voči abiotickému stresu a regeneráciu.
3. Zlepšuje absorpciu, translokáciu a využitie živín.
4. Zlepšuje kvalitu produktov, ako je obsah cukru, farba a semenáčky plodov.
5. Zlepšuje účinnosť vody a príjem živín.

## **1.4 Interakcie rastlín a mikroorganizmov pri ochrane proti biotickým stresom**

### **Obranný mechanizmus rastlín proti byľinožravcom**

Byľinožravce využívajú na získavanie živín z rastlín rôzne stratégie kŕmenia. Niektoré byľinožravce sa živia malými, alebo jednotlivými rastlinami a sú známe ako monofágne, zatiaľ čo niektoré sú spojené s rôznorodými hostiteľskými rastlinami.

Bylinožravce môžu konzumovať všetky rastlinné orgány. Niektoré z bylinožravcov, ako sú pavúky, alebo tripsy, obsahujú trubicovitú štruktúru a niektoré, ako sú mšice a blanokrídlovce vysávajú živiny z parenchymatických buniek, alebo cievnych tkanív rastliny. Zistilo sa, že listožravky sú odolné voči obrannému systému rastlín. Živia sa epidermálnymi vrstvami buniek v pletivách listov a majú prispôbené stratégie trávenia a fyziológiu trávenia, ako je detoxikačný systém, inhibítory proteáz, pH a endo, alebo exo-peritrofné oddelenia.

Rastliny reagujú na patogény aktiváciou obranných mechanizmov, ktoré inhibujú, ničia, alebo menia metabolizmus patogénov. Obranný systém rastlín zahŕňa fyzikálne bariéry, ako sú povrchové vosky, trichómy, tŕne a modifikácia bunkovej steny, a toxíny na zníženie rastu a trávenia bylinožravcov. Trichómy sú vlasové epidermálne štruktúry, ktoré sa nachádzajú na listoch a stonkách a poskytujú primárnu ochranu pred bylinožravcami. Zabraňujú tiež prichyteniu vajíčok hmyzu/roztočov na rastlinné pletivá po naklodení vajíčok. Trichómy vylučujú aj toxické metabolity, inhibítory proteáz a škodlivé zlúčeniny proti škodcom a bylinožravcom. Na uväznenie bylinožravcov uvoľňujú rastliny aj iné materiály, ako sú latex, oleje, živice a iné lepkavé materiály. Tieto látky sa väčšinou uvoľňujú z poranených rastlín. Latex sa skladá z veľkého množstva proteínov, ako sú lektíny, proteázy a sekundárne metabolity, ako sú terpenoidy, alkaloidy, furanokumaríny a fenoly. Ďalšími molekulami uvoľňovanými patogénmi sú elicitory spojené s herbivormi (HAE) a molekulárne vzory spojené s herbivormi (HAMP), ktoré sú detekované obranným mechanizmom rastlín. Detekcia týchto elicitorov aktivuje kaskádu udalostí zahŕňajúcich  $Ca^{2+}$ , čo vedie k vzniku reaktívnych foriem kyslíka (ROS), fosforylačným kaskádám a transkripčným aktivačným udalostiam, ktoré spúšťajú obranné reakcie rastlín. Príkladom HAMP a HAE sú slinné enzýmy, ako sú glukózo oxidázy, oxidoreduktázy, beta-glukozidázy a amino konjugáty mastných kyselín (FAC) bylinožravého hmyzu.

Obranný systém rastlín je tiež vyvolaný kryptickými peptidmi, inceptínmi a volicitínom. Inceptíny sú proteolytickým produktom podjednotky c ATP syntázy (cATPC), ktorá bola objavená v hrachu. Volicitín je molekula FAC prítomná v *Spodoptera exigua*, ktorá bola prvou študovanou FAC. Inceptín a volicitín sa reverzibilným spôsobom viažu na membránu rastlinných buniek prostredníctvom špecifických receptorov a spúšťajú uvoľňovanie prchavých terpénov, ktoré sa považujú za nepriamu obranu.

## 1.5 Interakcie rastlín a mikroorganizmov pri ochrane pred abiotickým stresom

### 1.5.1 Voda

Osmotický stres spôsobený zasolením, chladom, alebo suchom zvyšuje riziko dehydratácie rastlín. Na zníženie dehydratačného stresu sa uvoľňujú osmoprotektanty, ktoré znižujú vodný potenciál a zabraňujú strate vody. Niektoré z mikroorganizmov, napríklad *Arabidopsis*, uvoľňujú VOC (volatile organic compound), aby zabránili strate vody. Takýmito VOC sú cholín, glycín a betaín. Rastlina *Arabidopsis* po ošetrovaní, alebo inokulácii GBo3 v prítomnosti VOC vykazovala lepšiu toleranciu voči dehydratačnému stresu. Ošetrovanie rastlín VOC tiež zvyšuje hladinu transkriptov fosfoetanolamín N-metyltransferázy (PEAMT) na vyvolanie tolerancie voči dehydratácii. PEAMT

vykonáva tri metylačné kroky a premieňa fosfoetanolamín na fosfocholín. PEAMT sa považuje za dôležitý enzým v ceste biosyntézy cholínu, glycínu, betaínu a VOC, ktorý vyvoláva toleranciu rastlín voči dehydratácii. Ďalšia zlúčenina 2,3-butandiol, ktorá sa nachádza v GBo3, tiež podporuje toleranciu voči vodnému stresu a odolnosť voči chorobám. 2,3-butandiol vo VOC niekoľkých ďalších PGPR škvrn, ako je napríklad kmeň *Pseudomonas chlororaphis* O6, je schopný indukovať ISR v rastlinách. 2,3-butandiolu v *Arabidopsis* sa tiež ukázala lepšia tolerancia voči suchu u *P. chlororaphis* O6 po inokulácii *Arabidopsis* s *P. chlororaphis* O6. Zistilo sa tiež, že PGPR zohráva úlohu v tolerancii voči suchu. Zistilo sa, že pšenica inokulovaná kmeňom *Bacillus safensis* W10 zvyšuje antioxidantné reakcie na enzymatickej a metabolitovej úrovni. Zemiaky ošetrené PGPR zvýšili agregáciu prolínu a génovú expresiu enzýmov vychytávajúcich ROS, čo zvýšilo toleranciu voči abiotickému stresu. Zistilo sa, že EPS produkovaný niektorými kmeňmi PGPR, ako napríklad kmeňom *Pseudomonas aeruginosa* Pa2, udržiava obsah pôdnej vlhkosti a zvyšuje toleranciu rastlín voči suchu.

### 1.5.2 Teplota

Teplota riadi fyziológiu a metabolizmus mikroorganizmov rôznymi mechanizmami. Mikroorganizmy sa prispôbujú nízkym a vysokým teplotám vďaka svojim vnútorným vlastnostiam, aby prežili v takýchto nepriaznivých podmienkach. Tieto mikroorganizmy si vyvinuli mechanizmy, ako je expresia enzýmov odolných voči teplu a chladu, aby chránili svoje bielkoviny, membrány a nukleové kyseliny. Expresia proteínov tepelného šoku, ako sú HSP20, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, a enzýmu vychytávajúceho ROS, ako je kataláza a askorbátperoxidáza, je nevyhnutná pre toleranciu tepla a chladu. Mikroorganizmy tolerujúce tepelný a chladový stres sa na základe ich rastu rozdeľujú do niekoľkých skupín: psychrofilné (pravé psychrofilny a psychrotrofy), mezofily a termofily. Pravé psychrofilné mikroorganizmy rastú najlepšie pri teplote 15 °C, alebo nižšej, zatiaľ čo psychrotrofné mikroorganizmy rastú najlepšie pri teplote 20 až 30 °C. Mezofily rastú najlepšie pri teplote 20 – 40 °C a termofily rastú najlepšie pri teplote 50 °C, alebo vyššej. Tepelný stres spúšťa expresiu génu, ktorý sa podieľa na prežití mikroorganizmov. Počas tepelného stresu gén Dnak v *Alicyclobacillus acidoterrestris* zvyšuje svoju expresiu, aby kódoval HSP, ktorý ho chráni pred teplom. Indukcia proteínu tepelného šoku je základným faktorom pre prežitie v extrémnom tepelnom strese. Väčšina mikroorganizmov prežíva tepelný stres vďaka efektívnemu získavaniu živín a príjmu vody, ako aj zvýšeniu fotosyntézy. Trehalóza produkovaná mikroorganizmami, ako je *Saccharomyces cerevisiae*, je ďalšou dôležitou zlúčeninou, ktorá odoláva tepelnému stresu a chráni mikroorganizmy pred tepelným, chladovým a oxidačným stresom tým, že vyvoláva denaturáciu bielkovín vyvolaných tepelným stresom.

Mikroorganizmy ako *Arthrobacter nicotianae*, *Pseudomonas carina* a *Brevundimonas terrae* prežívajú pri nízkych teplotách vďaka PGPR. Psychrofilné baktérie izolované z Antarktídy a obsahujú proteíny tepelného šoku a ďalšie zlúčeniny, ako je trehalóza, ktoré ich chránia pred takou nízkou teplotou. Bolo zistené, že vysoká teplota u niektorých mikroorganizmov, ako napríklad *Agrobacterium*, inhibuje tvorbu pilusu a virulenciu, zatiaľ čo u niektorých baktérií, ako napríklad baktérie mäkkej hniloby *Pectobacterium atrosepticum*, sa preukázala zvýšená virulencia, vývoj enzýmu

rozkladajúceho rastlinnú bunkovú stenu a quorum-sensing. Niektoré rhizosférické baktérie a endofyty môžu pomôcť rastlinám vyrovnáť sa s negatívnymi účinkami teplotného stresu. Symbiotický vzťah medzi tropickou panikovou trávou *Dichanthelium lanuginosum* a hubou *Curvularia protuberata* pomáha obom druhom prosperovať pri vysokej teplote pôdy. Kmeň *Burkholderia phytofirmans* má antifungálne vlastnosti a zistilo sa, že zvyšuje odolnosť voči teplu u rajčiakov, odolnosť voči chladu u viniča, suchu u pšenice a soli a mrazu u *Arabidopsis*.

### 1.5.3 Ťažké kovy

Akumulácia ťažkých kovov v pôde je spôsobená najmä industrializáciou, poľnohospodárskymi metódami a antropogénnou činnosťou. Ťažké kovy majú väčšiu hustotu ako  $4 \text{ g.cm}^{-3}$  a majú negatívny vplyv na rastliny, ako aj na ľudské zdravie. Preto je naozaj dôležité odstrániť ťažké kovy zo životného prostredia. Je to nákladovo efektívna a dlhodobá metóda. Mikroorganizmy spojené s rastlinami, ako napríklad mykoríza, rhizobaktérie a firmikuty, majú potenciál podporovať rast rastlín. Biosorpcia, bioakumulácia, imobilizácia, bioventilácia a priama-nepriama enzymatická redukcia sú metódy zahrnuté do bioremediácie ťažkých kovov.

- 1. Biosorpcia:** kovy sú absorbované na záporne nabitom povrchu mikroorganizmov.
- 2. Bioakumulácia:** kovy vstupujú do buniek prostredníctvom proteínov a hromadia sa v nich.
- 3. Imobilizácia:** kovy sa viažu na oxidy Fe a organické koloidy.
- 4. Priama a nepriama enzymatická redukcia:** pri metóde priamej redukcie sa kovy redukujú organickou oxidáciou a pri metóde nepriamej redukcie sa kovy redukujú oxidačným procesom Fe, alebo S.
- 5. Bioventilácia:** pri nej sa pôdnym mikroorganizmom dodáva  $\text{O}_2$  a podporuje sa ich rast.

Fixácia dusíka, mobilizácia živín, siderofóry a rozpúšťanie fosfátov sú ďalšie metódy používané na odstraňovanie ťažkých kovov. AM huby znižujú stres z kadmia v rastlinách znižovaním malonaldehydu a peroxidu vodíka. *Enterobacter* spp. a *Klebsiella* spp. sú účinné pri odstraňovaní Cd, Pb a Zn zo znečistenej pôdy. Baktérie odolné voči arzénu (ARB) z *Pteris vittata* zlepšili rozpúšťanie fosfátov. Produkcia siderofóru z *Pteris vittata* zlepšuje rast rastlín a príjem živín. Dva bakteriálne kmene *Bradyrhizobium japonicum* E109 a *Azospirillum brasilense* Az39 akumulujú arzén z pôdy. Extracelulárna a intracelulárna agregácia, sekvestrácia a biotransformácia sú hlavnými mechanizmami, ktoré mikroorganizmy prijali na vyrovnanie sa s touto situáciou. Ťažké kovy môžu byť úplne rozložené niektorými mikroorganizmami. MBR *Pseudomonas* spp. napríklad vykazuje biotransformáciu a elimináciu jednoduchého komplexu  $\text{Fe}^{3+}$ , zinku a citrátu Cd.

Endofytické mikroorganizmy sú schopné syntetizovať nitrogenázu v podmienkach stresu z kovov a nízkeho obsahu dusíka. Endofytické mikroorganizmy ako *Burkholderia* spp., *Rahnella* spp., *Sphingomonas* spp. a *Acinetobacter* spp. syntetizujú nitrogenázu a fixujú atmosférický dusík v *Populus trichocarpa* a *Salix sitchensis*. Okrem toho PGPM produkuje množstvo nízkomolekulových organických kyselín, ktoré sú užitočné pri fytoremediácii. Kyseliny glukónová, šťavelová a citrónová sú najsilnejšie pri mobilizácii ťažkých kovov a ich sprístupňovaní rastlinám. Okrem toho

oxidáciou, alebo redukciou ovplyvňujú ťažké kovy, ako sú arzén, selén, chróm a ortuť. Ďalšou metódou mobilizácie ťažkých kovov je biometilácia. Biometilácia je prenos metylovej skupiny mikroorganizmov. Baktérie sa podieľajú na metylácii Pb, Hg, Se, As, Tn a Sn. Fytochelatíny (PC) sú peptidy bohaté na cysteín viažuce kovy, ktoré sa syntetizujú z glutatiónu v niektorých hubách a rastlinách proti stresu.

Nepriamy mechanizmus fytoremediácie zlepšuje rast rastlín a potláča infekcie spôsobené patogénmi a zvýšenú akumuláciu ťažkých kovov. Vysoká koncentrácia ťažkých kovov v rhizosfére narúša príjem živín a inhibuje rast rastlín. PGPB sú schopné viazať atmosférický dusík a chrániť rastliny pred stresom z kovov prostredníctvom symbiotickej asociácie. Fosfor je v pôde prítomný vo väčšom množstve, ale v komplexnej forme je pre rastliny nedostupný. Mikroorganizmy v reakcii na kovový stres produkujú organické kyseliny a dodávajú ich rastlinám. Endofytické baktérie pomáhajú rastlinám prosperovať v prostredí vystavenom stresu z kovov tým, že kontrolujú patogény, alebo vyvolávajú systémovú rezistenciu.

## 1.6 Využitie arbuskulárnych mykoríznych húb v záhradníctve

Arbuskulárna mykoríza sa vyskytuje v 80 % rastlín vrátane poľných plodín, ovocných stromov, zeleniny, okrasných a liečivých rastlín. Spóry arbuskulárnych mykoríznych húb (AMF) majú zvyčajne dostatok zásobných lipidov, trochu sacharidov a hrubé steny s chitínom a v niektorých prípadoch s  $\beta$ 1-3-glukánom. Rast hýf ako klíčením spór zahŕňa určité zásoby sacharidov a lipidov, delenie jadier a produkciu obmedzeného množstva rozvetveného koenocytárneho mycélia. Signálne molekuly z koreňov asociovanej rastliny stimulujú vetvenie hýf. Nízke koncentrácie pôdneho fosforu zvyšujú rast a vetvenie hýf, ako aj vyvolávajú exsudáciu rastlín. Hýfy prenikajú do vlasatých a bočných koreňov a rastú medzi epidermálnymi bunkami. Väčšina týchto húb sa objavuje medzi bunkami koreňového parenchýmu a vytvára oválne, alebo vajcovité "vezikuly" s tenkou stenou v strede, alebo na konci hýf. Vzhľadom na to, že tieto vezikuly sú bohaté na tuk a ich počet sa v starých koreňoch zvyšuje, považujú sa za zdroj zásobnej potravy a energie huby a sú trvalé po odumretí rastliny v pôde. Takto môže huba prežiť v koreňovom tkanive dlhý čas, ak sa korene neodstránia z pôdy. Všetky tieto huby vytvárajú vo vnútri buniek endodermis medzi plazmatickou membránou a bunkovou stenou kričkovitú štruktúru nazývanú "arbuscule", ktorá je bohatá na jadrá, glykogénové častice, tukové guľôčky a vakuoly. Arbuskuly sú špecifické štruktúry arbuskulárnych mykoríznych húb a miesta výmeny živín, ako sú fosfor, voda a sacharidy. AMF po usadení v koreňovom tkanive vytvárajú na povrchu koreňa jemnú sieť "extraradikálnych hýf". Táto sieť hýf absorbuje vodu a živiny a prenáša ich do koreňových tkanív a arbuskulov. Na koncoch vetiev extraradikálnych hýf sa vytvárajú spóry, ktoré sa po uvoľnení z materskej bunky a vyklíčení vzájomne spájajú s inými časťami koreňa tej istej rastliny, alebo so susednými rastlinami. Arbuskulárna mykoríza, alebo endomykoríza je spojená so vzájomným prínosom, čo znamená, že huba poskytuje viac vody a živín a rastlina na oplátku dodáva potrebné sacharidy pre hubu. AMF zvyšujú odolnosť rastlín voči suchu, environmentálnym stresom, zasoleniu pôdy a vody a pôdnym patogénom. Zvyšujú tiež aktivitu baktérií viažucich dusík, čo vedie k zvýšeniu poľnohospodárskych výnosov, a tiež zvyšujú účinnosť rastlín pri raste v púšťach, piesočných dunách a kontaminovaných pôdach.

### 1.6.1 Rozsah symbiotických rastlín

Rozsah symbiotických rastlín AM húb je veľmi široký, napr. pšenica, jačmeň, kukurica, cirok, lucerna, sója, slnečnica, sezam, bavlna, jablko, hrozno, olivy, jujuba, ľalia, ceriman, syngónia, pothos, sansevieria, papraď asparágus a juka bez trňov. Okrem toho bola arbuskulárna mykoríza zaznamenaná u väčšiny bylinných rastlín a niektorých vzácnych drevín, ako sú *Acer*, *Araucaria*, *Podocarpus*, *Agathis*, ako aj členovia *Taxodiaceae*, *Cupressaceae*, *Cephalotaxaceae*, a *Taxaceae* a u väčšiny tropických tvrdých drevín. Dostupné správy o rastlinách z niekoľkých hlavných čeľadí vrátane *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*, *Caryophyllaceae*, *Proteaceae* a *Juncaceae* neuvádzajú žiadnu mykoríznu symbiózu.

### 1.6.2 Taxonómia arbuskulárnych mykoríznych húb

Predpokladá sa, že arbuskulárna mykoríza vznikla približne pred 1000 miliónmi rokov, teda v rovnakom čase, ako sa na súši začali objavovať rastliny. AM huby boli pravdepodobne dôležité pri kolonizácii súše rastlinami vďaka ich úlohe pri prijímaní živín. Prvé druhy AM húb boli predstavené v rode *Glomus* v roku 1845, nasledovali rody *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Scutellospora* a ďalšie. Arbuskulárne mykorízne huby boli pred viac ako dvadsiatimi rokmi zaradené do rodu *Endogonales* (*Zygomycota*) kvôli ich aseptickým hýfam a podobným spóram ako zygospóry druhov rodu *Endogone*. Prvý pokus o znázornenie fylogenetických vzťahov sa uskutočnil pomocou kladistických nástrojov a za predpokladu nového monofyletického radu *Glomales* (*Zygomycota*), ktorý obsahuje len tie huby, u ktorých sa uhlík získava obligátne z ich hostiteľských rastlín prostredníctvom arbuskulí. Potom sa genetickou analýzou arbuskulárne mykorízne huby zaradili do samostatného *Glomeromycota*.

### 1.6.3 Úloha AM húb v boji proti chorobám rastlín

#### Vplyv na hubové a hubám podobné ochorenia

Symbióza *Funneliformis mosseae* s koreňom jačmeňa poskytuje významnú ochranu proti infekcii *Gaeumannomyces graminis*, pôvodcom choroby take-all. Symbióza zvýšila rast, počet strukov, obsah dusíka, draslíka a fosforu, suchú hmotnosť stonky a počet dusík fixujúcich bakteriálnych hľúz v koreni a znížila hnilobu koreňa spôsobenú *Macrophomina phaseolina*. V skleníku inokulácia zmesi niekoľkých arbuskulárnych mykoríznych húb do koreňov uhoriek zvyšuje rast a kontroluje vädnutie ciev spôsobené *Fusarium oxysporum*. Kombinácia zmesi dvoch AM húb a *Pseudomonas fluorescens* významne znižuje hnilobu koreňov fazule obvyčajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) spôsobenú *Rhizoctonia solani* a zvyšuje rast a úrodu. Zmes *F. mosseae* a *R. intraradices* významne chráni jahody pred chorobou vädnutia spôsobenou *Verticillium dahliae*, ako aj vykazovala 60 % zvýšenie úrody. *R. intraradices*, *Trichoderma harzianum* a *P. fluorescens* boli inokulované samostatne, alebo v kombinácii s rajčikom v skleníkových a poľných podmienkach na kontrolu fuzáriového vädnutia spôsobeného *Fusarium oxysporum*. Všetky ošetrenia výrazne znižujú závažnosť ochorenia, ale kombinácia týchto húb a baktérií má najlepší účinok, pretože toto ošetrenie znižuje závažnosť ochorenia o 74 % a poskytuje 20 % zvýšenie úrody.



### **Vplyv na rastlinné parazitické nematódy**

Prehľad 65 výskumných článkov o vplyve AM húb na rastlinné parazitické nematódy ukázal, že spomedzi AM húb majú *R. intraradices*, *C. etunicatum*, *M. sadraei* a *F. mosseae* schopnosť znižovať poškodenie koreňovými háďatkami (*Meloidogyne* spp.) a *Tylenchorhynchus* spp. Sadenice čerešní inokulované *R. intraradices* vykazovali významne vyššiu hmotnosť (za mokra) a priemer stonky ako nemykorízne sadenice a boli odolnejšie voči *Pratylenchus vulnus*. Jablňové sadenice inokulované *F. mosseae* vykazovali väčšiu odolnosť voči *P. vulnus* a ich hmotnosť koreňov za mokra a dĺžka konárov boli významne vyššie ako nemykoríznych sadeníc. Symbióza *F. mosseae* s koreňmi citrusov ochránila korene pred *Radopholus similis* a znížila populáciu háďatka o 50 %. Pri stimulácii rastu rastlín inokulácia koreňových podpníkov rajčiaka s *Funneliformis coronatus* výrazne znížila infekciu koreňovým háďatkom *Meloidogyne incognita*.

### **Vplyv na bakteriálne choroby rastlín**

Rastliny rajčiakov kolonizované arbuskulárnou mykoríznu hubou, ktoré boli inokulované baktériou *Pseudomonas syringae* a po 3 týždňoch vykazovali vyšší rast ako rastliny bez mykorízy.

### **Vplyv na fytoplazmy**

Inokulácia koreňa tabaku arbuskulárnou mykoríznu hubou s cieľom preskúmať jej účinok na ochorenie žltnutie astry tiež ukázala, že táto symbióza výrazne zvyšuje dĺžku koreňa a fotosyntézu chorých rastlín.

### **Vplyv na fyziologické poruchy rastlín**

V skleníkovom pokuse inokulácia sadeníc rajčiakov *F. mosseae* významne zlepšila ich rast a úrodu v zasolenej pôde v porovnaní s neinokulovanými rastlinami. Inokulácia koreňov semenáčikov kávy s *Glomus* spp. zvýšila ich odolnosť voči suchu a zasoleniu vody a pôdy.

#### **1.6.4 Spôsob pôsobenia arbuskulárnych mykoríznych húb**

##### **Väčší príjem vody a živín a minimalizácia environmentálnych záťaží**

Arbuskulárne mykorízne huby zvyšujú príjem a prenos vody do koreňov symbiotických rastlín v dôsledku zväčšenia absorpčnej plochy koreňov extramatikou sieťou hýf. Aj prienik ich arbuskul do buniek endodermis poskytuje vhodnú cestu cez koreň pre pohyb vody a jej prístup k drevným cievam. Tieto huby tiež zvyšujú rast koreňov, čo následne poskytuje rozsiahly koreňový systém na príjem vody. Tieto huby zvyšujú príjem neaktívnych živín, napríklad fosforu, z pôdy vylučovaním enzýmu fosfatázy. Zvýšená absorpcia fosforu týmito hubami pre rastliny prispieva k zvýšeniu rýchlosti rastu a rýchlejšiemu prechodu rastliny cez kritické štádium mladosti, ako aj k schopnosti buniek množiť sa a opravovať poškodené tkanivá od pôdných patogénov. Arbuskulárne mykorízne huby zvyšujú absorpciu vody a živín, vďaka čomu sú rastliny odolnejšie voči environmentálnym stresom, ako je sucho a nedostatok živín.

### **Zmeny chemických látok v rastlinných tkanivách**

Kolonizácia koreňov podzemnice olejnej (*Arachis hypogaea* L.) a póru (*Allium porrum*) arbuskulárnou mykoríznu hubou zvýšila hladiny ortodihydrického fenolu, silného inhibítora pôdných patogénov. V arbuskulárnych mykoríznych koreňoch sóje,

ktoré vykazovali odolnosť voči infekcii patogénnymi hubami a háďatkami, bolo zaznamenané zvýšenie obsahu látok podobných izoflavonoidom fytoalexínu.

### **Súperenie s patogénmi o miesto a živiny**

Rastlinné parazitické háďatká zvyčajne napádajú korene a na svoj rast a rozmnožovanie potrebujú živiny produkované rastlinami. Skoršie usadenie arbuskulárnych mykoríznych húb zabraňuje háďatkám vo vývoji a prijímaní živín.

### **Štrukturálne zmeny v koreňoch**

V mykoríznych koreňových bunkách uhoriek a rajčiakov bola pozorovaná zvýšená lignifikácia, ktorá sa považuje za hlavný faktor ich odolnosti voči fuzáriovému vädnutiu ciev.

### **Zvyšovanie populácie prospešných pôdných baktérií**

Mykorízne korene majú bohatšie exsudáty, ktoré poskytujú vhodné prostredie pre rast prospešných pôdných baktérií. Extramatické hýfy AM húb tiež spôsobujú zhlukovanie jemných pôdných častíc a zlepšujú prúdenie vzduchu v pôde, čo je nevyhnutné pre rast a rozmnožovanie pôdných baktérií. V dôsledku toho sa zvyšuje populácia baktérií viažucich dusík, rhizobaktérií podporujúcich rast rastlín (PGPR) a množstva grampozitívnych baktérií v rhizosfére a výrazne sa znižuje populácia patogénov z rodu *Fusarium*, alebo *Phytophthora*.

### **Význam húb pri fytoremediácii znečistených pôd**

Rozširovanie miest a priemyselných tovární zvýšilo kontamináciu obmedzenej poľnohospodárskej pôdy škodlivými látkami z priemyselných odpadových vôd, alebo mestských odpadov, čo predstavuje vážnu hrozbu pre udržateľnú produkciu poľnohospodárskych produktov a potravinovú bezpečnosť spoločnosti. Toxické prvky ako olovo, meď, zinok, ortuť, arzén, kadmium a nikel sa môžu dostať do vody, alebo pôdy prostredníctvom priemyselných a mestských odpadových vôd, alebo rozsiahlym používaním chemických hnojív, herbicídov a pesticídov. Tieto ťažké kovy tiež zvyšujú riziko oxidácie rastlinných tkanív, čo vedie k príznakom hniloby koreňov, žltnutiu rastlín a spomalenému rastu. Prítomnosť týchto ťažkých kovov vo vode a pôdných zdrojoch znižuje aktivitu prospešných mikroorganizmov, ako sú PGPR, a úrodnosť pôdy, čo v konečnom dôsledku vedie k výraznému zníženiu úrody. Kadmium, jeden z týchto toxických ťažkých kovov, bráni rastu koreňov a stoniek, ovplyvňuje absorpciu základných živín z pôdy a často sa hromadí v produkte. Zušľachtovanie pôdy kontaminovanej ťažkými kovmi si vyžaduje veľa energie a peňazí. Metódy, ako napríklad výkopové práce, alebo vymývanie pôdy, môžu poškodiť štruktúru a úrodnosť pôdy a preniesť kontaminanty do podzemných vôd. Ekologická rafinácia bola navrhnutá ako nízkonákladová alternatívna technológia šetrná k životnému prostrediu. Fytoremediácia je technológia, ktorá využíva rastliny na odstraňovanie, rozklad, alebo výrobu menej nebezpečných materiálov v pôde a vode. Táto metóda využíva rastliny, ktoré majú schopnosť tolerovať, alebo ukladať veľké množstvá kovov v rhizosfére a vo svojich tkanivách. Rastliny, ktoré sú v symbióze s AM hubami, vykazujú väčšiu schopnosť regenerovať kontaminovanú pôdu. AM huby spôsobujú selektívnu priepustnosť koreňov tvorbou extraradikálnych hýf. Mechanizmy, ktoré tieto huby využívajú na zníženie stresu rastlín spôsobeného ťažkými kovmi, zahŕňajú chelatáciu ťažkých kovov, zlepšenie minerálnej výživy (najmä fosforu) pre rastlinu a urýchlenie

rastu, zmenu pH rhizosféry a reguláciu expresie génov prenášajúcich kovy. Materiály bunkových stien AM húb majú zlúčeniny (napr. hydroxylové a karboxylové skupiny a voľné skupiny aminokyselín), ktoré sa môžu viazať na toxické ťažké kovy a imobilizovať ich. Proteíny bunkovej steny AM húb, ako napr. glomalín, tiež vykazujú schopnosť spájať sa s ťažkými kovmi a inaktivovať ich. V pôde kontaminovanej kadmium symbióza *F. mosseae* s d'atelinou potlačila jeho vplyv na optimálny rast a produkciu rastlín. Arbuskulárna mykoríza ciroku v pôde kontaminovanej olovom stabilizuje a inaktívuje tento ťažký kov v hubových orgánoch pomocou polyfosfátových granúl.

## **1.7 Mikroorganizmy podporujúce rast rastlín ako činitele biologickej kontroly chorôb rastlín**

### **1.7.1 Mechanizmy, výzvy a perspektívy do budúcnosti**

Choroby a škodcovia rastlín sú rizikové faktory, ktoré ohrozujú globálnu potravinovú bezpečnosť. Na zníženie účinkov chorôb rastlín spôsobených bakteriálnymi a hubovými patogénmi sa bežne používa nadmerné množstvo chemických pesticídov. Hlavným problémom, keďže sa snažíme o udržateľnejšie poľnohospodárstvo, je zvýšenie výnosov plodín pre rastúci počet obyvateľov. Mikrobiálne biologické kontrolné činidlá (MBCA) preukázali svoju účinnosť ako ekologická stratégia na zvládanie chorôb rastlín, stimuláciu rastu a výkonnosti rastlín a zvýšenie výnosov. Okrem ich úlohy pri zvyšovaní rastu by mohli rhizobaktérie/huby podporujúce rast rastlín (PGPR/PGPF) potláčať choroby rastlín produkciou inhibičných chemických látok a vyvolávaním imunitných reakcií rastlín proti fytopatogénom. Ako biohnojivá a biopesticídy sa PGPR a PGPF považujú za uskutočniteľný a atraktívny ekonomický prístup k udržateľnému poľnohospodárstvu, čo vedie k situácii "win-win". Niekoľko kmeňov PGPR a PGPF bolo identifikovaných ako účinné BCA (biologické kontrolné činidlá) v environmentálne kontrolovaných podmienkach. Vo všeobecnosti platí, že každá BPRP musí prekonať určité problémy, kým sa zaregistruje, alebo začne vo veľkej miere využívať na kontrolu chorôb/škodcov. Úspešné MBCA ponúkajú praktické riešenie na zlepšenie výkonnosti skleníkových plodín so znížením vstupov hnojív a aplikácií chemických pesticídov.

### **1.7.2 PGPR ako sľubné biokontrolné činidlá**

Pôda je zložitý ekosystém, ktorý obsahuje rôzne skupiny mikroorganizmov vrátane baktérií, húb a živočíchov. Tieto mikroorganizmy zohrávajú kľúčovú úlohu vo vývoji rastlín, regulácii živín a v biokontrole. Usadzujú sa v rhizosfére a endorhizosfére rastlín, kde využívajú rôzne priame a nepriame procesy na podporu rastu rastlín. Fytomikrobióm (mikroorganizmy asociované s rastlinami) môže poskytovať konkurenčné, exploatačné, alebo neutrálne spojenectvo s rastlinami; tým ovplyvňuje úrodu plodín. V poslednom čase sa vedci hlbšie zaoberajú využívaním prospešných PGPR na inhibíciu fytopatogénov a podporu rastu rastlín. Kľúčovú úlohu v tom môže zohrávať zvýšenie cieľovej špecifickosti medzi PGPR a rastlinnými druhmi.

Rhizosférický mikrobióm sa vzťahuje na spoločenstvá baktérií, archeí a húb, ako aj ich genetický materiál, ktoré tesne obklopujú koreňové systémy rastlín. Mikroorganizmy môžu nepriamo ovplyvňovať zdravie plodín a fenotypovú plasticitu

tým, že ovplyvňujú rast rastlín a obranné reakcie v dôsledku ich koevolúcie s rastlinami vo veľkom meradle. Rhizosféra je domovom rôznych mikroorganizmov, ktoré poskytujú stabilné zásoby PGPR. Fytomikrobióm zahŕňa populáciu baktérií, ktoré kolonizujú rhizosféru, na povrchu koreňa a medzi bunkami koreňovej kôry. Keďže rastliny môžu najprv kolonizovať suchozemské prostredie, PGPR sa vyvíjali spoločne s príbuznými rastlinami; výsledkom sú synergické vzťahy hostiteľských rastlín. Účinky, metódy a možnosti úspešného použitia PGPR v poľnohospodárskej rastlinnej výrobe v kontrolovaných situáciách boli predmetom mnohých štúdií. To je rozhodujúce pre vývoj širšie používaných metód biologickej kontroly, ktoré zohľadňujú poľné prostredie.

Bezpečnosť a kontrola kvality sú pri pestovaní zeleniny dôležitejšie, pretože ich používame menej spracované, alebo nespracované a majú vplyv na zdravie. PGPR sú lepšie dosiahnuteľné v skleníkových podmienkach. Vďaka kontrolovanému prostrediu sa objavilo značné množstvo perspektívnych PGPR, ktoré sú možno pripravené na umiestnenie; tak sa potvrdilo, že sú úspešné v skleníkových výskumoch. *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* a *Pseudomonas stutzeri* patria medzi tie, ktoré preukázali úspech pri kolonizácii koreňov, ako aj pri prevencii patogénu *Phytophthora capsici* v uhorkách. Vo fáze po zbere úrody dokáže *B. subtilis* chrániť plody rajčiaka pred infekciou *Penicillium* spp. a *Rhizopus stolonifer*.

V skleníkových podmienkach izoláty *B. amyloliquefaciens* znižujú výskyt *Fusarium oxysporum* spôsobujúceho fuzáriové vädnutie. V kontrolovaných situáciách sú PGPR -ako BCA- účinné, čo poukazuje na ich úlohu v skleníkových produkčných systémoch a ich účinnosť v komerčnom záhradníctve. Nie je potrebné rozlišovať nepriame cesty PGPR na zamedzenie infekcie patogénmi a podporu rastu rastlín pri abiotických stresoch. Okrem toho by PGPR s biokontrolnými aktivitami, ktoré zároveň podporujú rast rastlín, boli v praxi účinnejšie. Tolerancia rastlín voči abiotickým podmienkam a odolnosť voči fytopatogénom spôsobujúcim choroby rastlín sa môže zlepšiť pomocou PGPR. Niektoré kmene prospievajú rastlinám pri zvládaní stresu a prosperite v abiotických prostrediach.

Zatiaľ čo väčšina výskumníkov informovala o PGPR v týchto kontrolovaných podmienkach, len málo z nich skúmalo ich účinnosť ako BCA, najmä v kombinácii s abiotickým stresom. To je kritický faktor pri poľnej biokontrolle a pri zmene klímy, ktorá ovplyvňuje ekosystém. Dlhodobý synergizmus medzi PGPR a rastlinou môže priniesť rôzne výhody pre hostiteľskú rastlinu.

### 1.7.3 Mechanizmy biokontroly pomocou PGPR

PGPR kolonizujúce hostiteľskú rastlinu môžu stimulovať jej rast prostredníctvom priamych a nepriamych mechanizmov. Medzi priame mechanizmy patrí produkcia rastlinných hormónov, rozpúšťanie fosfátov a zvýšený príjem železa. Medzi nepriame účinky patrí produkcia antibiotík, nutričná konkurencia, parazitizmus, inhibícia toxínov patogénu a indukovaná rezistencia. Postoj "PGPR" pri tvorbe fytohormónov, molekúl signálnych metabolitov a súvisiacich látok opisuje, ako sa rastliny chránia pred suchom ako príkladom abiotického stresu a zasolenia. PGPR môžu tiež meniť tvar koreňov, čo má za následok zväčšenie povrchu koreňov a zlepšenie ich výkonnosti. Okrem toho môžu PGPR konkurovať iným baktériám tým, že sa rýchlo kolonizujú a akumulujú väčšiu zásobu živín, čím zabraňujú rastu iných organizmov. PGPR majú rôzne stratégie kolonizácie, z ktorých každá je viazaná

na konkrétneho hostiteľa. Vo všeobecnosti možno infekcie patogénov potlačiť použitím antibiotík a antifungálnych metabolitov; považujú sa tak za známu priamu stratégiu biologickej kontroly. Bakteriocíny, antibakteriálne proteíny a enzýmy sú príkladmi antimikrobiálnych peptidov. Antibiotiká sú malé antimikrobiálne molekuly produkované PGPR, ktoré môžu inhibovať proces metabolických, alebo rastových aktivít mikrobiálnych patogénov. Tieto antibiotiká, ktoré sú väčšinou kmeňovo špecifické, sa môžu zamerať na ribozomálnu RNA (rRNA), zmeniť štruktúru membrány a poškodiť bunkové steny bakteriálnych patogénov

Mnohé baktérie produkujú bakteriocíny, pričom niektoré majú väčšiu škálu inhibičných aktivít ako iné. Siderofóry sú špecializované chelatačné činidlá železitého železa, ktoré bránia fytopatogénom v prístupe k železu, a tak udržiavajú zdravie rastlín najmä v prostredí s nedostatkom železa. PGPR môžu zvládnuť rôzne choroby rastlín tým, že zbavujú patogény železa, čím znižujú rozvoj choroby a vytvárajú extracelulárne siderofóry. Bakteriocíny, siderofóry a antibiotiká boli teda identifikované ako tri najvyššie operatívne prístupy pre potenciálnu biokontrolu pred aplikáciou *in vivo*. Niekoľko štúdií skúmalo PGPR ako potenciálny nástroj na zvládanie chorôb rastlín s cieľom syntetizovať metabolity prospešné pre rastliny, ako sú siderofóry.

PGPR môžu nepriamo zvýšiť odolnosť plodín voči stresu. Signálne chemické látky, ako sú fytohormóny a špecializované signálne molekuly, umožňujú komunikáciu medzi rastlinami a mikroorganizmami. Kontrola a regulácia aktivít v holobionte zahŕňa hostiteľskú rastlinu a "špecifický" fyto-mikrobióm (interakcia rastlina-fyto-mikrobióm).

PGPR môžu tiež produkovať prchavé organické zlúčeniny (VOC), ktoré zohrávajú významnú úlohu pri raste rastlín a indukovanej systémovej odolnosti (ISR) voči patogénom. PGPR môžu vyvolať ISR ako stratégiu na zlepšenie odolnosti rastlín voči chorobám. Kolonizácia koreňov arbuskulárnymi mykoríznyimi hubami (AMF) a určitými kmeňmi nepatogénnych baktérií môže zlepšiť odolnosť rastlín voči biotickým stresom. ISR vyvolaná PGPR a hubami podporujúcimi rast rastlín (PGPF) sa vyskytuje u širokého spektra rastlinných taxónov. Systémová získaná rezistencia (SAR); môže však byť aktivovaná infekciou patogénom.

Podpora rastlinnej výroby a manažment chorôb by sa mohli skúmať spoločne, aby sa zabezpečila udržateľnosť a nákladová efektívnosť poľnohospodárskych systémov. Účinné kmene PGPR tak môžu podporovať toleranciu voči stresu a absorpciu živín, vývoj rastlín a boj s hubovými/bakteriálnymi chorobami. Zdá sa teda, že ide o situáciu, ktorá je výhodná pre všetky strany – pre kmeň PGPR aj pre hostiteľskú rastlinu.

#### **1.7.4 Výzvy pri využívaní PGPR ako biologické kontrolné činidlá (BCA)**

Biokontrola na báze PGPR poskytuje účinný a dlhodobý boj proti chorobám. Európa a Spojené štáty sú najslubnejšími trhmi pre produkty biologickej kontroly, po nich nasleduje Južná Amerika. Hoci mnohé PGPR boli testované *in vitro* a komerčne overené ako BCA, nové produkty na biologickú kontrolu boli uvoľnené na základe výskumných činností vykonávaných v Spojených štátoch a Európe. Vo všeobecnosti trh s BCA a ich produktmi rastie; napriek tomu sa v porovnaní s chemickými pesticídmi ako najbežnejšou metódou ochrany plodín príliš neujal.

Pred verejným prijatím/registráciou ako komerčného BCA je potrebné zohľadniť určité požiadavky/potreby. Výskumníci by mali zlepšiť účinnosť BCA na zvládnutie

určitých chorôb. To sa dá dosiahnuť tak, že BCA bude mať čo najviac prospešných vlastností a mechanizmov účinku. Takéto vlastnosti môžu okrem iného zahŕňať schopnosť BCA rýchlo rásť *in vitro*, produkovať širokú škálu bioaktívnych metabolitov, mať vysokú schopnosť kompetície v rhizosfére, zvyšovať rastovú výkonnosť rastlín, byť bezpečná pre životné prostredie, mať kompatibilitu s inými rhizobaktériami/hubami a byť tolerantná voči abiotickým stresom. Úspešná kolonizácia koreňových tkanív a/, alebo rhizosféry je rozhodujúcou zložkou pre každý kmeň PGPR, aby bol účinným BCA; teda aby dobre pôsobil proti rastlinným patogénom. Na druhej strane, výkonnosť inokulovaných PGPR sa môže líšiť v závislosti od miery prežitia v pôde, compatibility s plodinou, interakcie s inými miestnymi mikrobiálnymi druhmi a faktormi prostredia. Prežívanie a kolonizácia sú hlavnými zložkami pri identifikácii účinných izolátov BCA. Pokusy s antagonizmom *in vitro* sa často používajú na skúmanie účinku bakteriálnych izolátov na určité choroby pred skleníkovými a/, alebo poľnými pokusmi.

Účinnosť PGPR sa vo všeobecnosti hodnotí podľa zemepisných oblastí, pôdných typov, hostiteľských druhov plodín a za rôznych podmienok prostredia. Rast BCA sa často ľahšie monitoruje v kontrolovaných podmienkach, t. j. v skleníkoch. Uprednostňovanie tohto štádia zo strany väčšiny výskumníkov možno pripísať stabilite podmienok prostredia. Skleníkové experimenty hodnotiace výkonnosť BCA v kontrolovaných podmienkach môžu poskytnúť silnú teoretickú a praktickú podporu pre aplikáciu PGPR na poli. Zabezpečuje sa tak uskutočniteľnosť a účinnosť PGPR pre komerčnú záhradnícku produkciu, manažment chorôb a podmienky klimatických zmien, aké sa vyskytujú v poľných podmienkach.

Stabilita PGPR je ovplyvnená aj metódou, zložením, prepravou a podmienkami skladovania. Na dosiahnutie vysokej úrovne prežitia PGPR je potrebné zlepšiť technológiu formulácie, predĺžiť trvanlivosť produktu PGPR, optimalizovať produkciu cieľových typov mikroorganizmov a dosiahnuť nízkonákladovú produkciu vo veľkom meradle. Mnohí vedci sa pokúšali predĺžiť trvanlivosť PGPR znížením teploty skladovania a/, alebo úpravou kombinácií prísad. Potrebný je aj rozsiahly výskum rizík a prínosov BPR, pretože prístupy k manažmentu poľnohospodárskych chorôb sa opierajú o túto rovnováhu.

Vzhľadom na rôznorodé spôsoby účinku si identifikácia, charakterizácia a registrácia sľubných kmeňov PGPR vyžaduje čas a spoluprácu akademického a priemyselného sektora. Používanie prírodných zdrojov (napr. BCA) na kontrolu patogénov predstavuje aj súbor právnych a etických otázok, ktoré môžu ohroziť miestnu biodiverzitu. V tejto súvislosti bol vstup nových druhov/populácií BCA do určitých krajín obmedzený. Na komerčné použitie je aplikácia PGPR v chránených prostrediach, ako sú skleníky, oveľa jednoduchšia vďaka izolovanejšiemu a kontrolovanejšiemu prostrediu dodávok a potenciálne menším negatívnym ekologickým dôsledkom. Ďalšou výzvou, ktorá súvisí s rozsiahlou implementáciou biokontroly na báze PGPR, sú regulačné problémy. V súčasnosti má každá krajina svoj regulačný systém, ktorý sa medzi nimi výrazne líši.

Napríklad vysoké náklady na vývoj nových komerčných BCA boli identifikované ako prekážka expanzie BCA priemyslu v Austrálii. Vysoké regulačné náklady na dovoz nových BCA do Austrálie sú jedným z najväčších problémov. Registrácia BCA si vyžaduje úzku koordináciu medzi vládnymi inštitúciami, univerzitami a priemyselnými sektormi, aby sa uľahčilo hodnotenie a komercializácia nových BCA a ich produktov. K náročným problémom možno prirátať aj nedostatok programov pre finančné

a ekologické prínosy. V záujme globálneho marketingu a miestnych praktických aplikácií by sa komercializácia mala riadiť medzinárodnou legislatívou. Medzinárodná organizácia pre biologickú kontrolu (IOBC) zhromaždila akademikov, výskumníkov a odborníkov z praxe z rôznych sektorov/oblastí s cieľom identifikovať prekážky a poskytnúť odporúčania na prekonanie týchto obmedzení.

V porovnaní s chemickými pesticídmi, ktoré sú spoľahlivejšie a predvídateľnejšie, by poľnohospodári mohli zaznamenať len malý, alebo žiadny ekonomický prínos. Takéto programy vrátane miestnych seminárov, školení a bezplatných konferencií môžu zvýšiť povedomie o aplikácii BCA v konkrétnych poľnohospodárskych oblastiach. Napokon, biokontrola založená na PGPR môže byť veľkým prísľubom na zníženie používania agrochemikálií v poľnohospodárstve. Široké využívanie PGPR ako BCA si vyžaduje masívne úsilie regulačných orgánov a pestovateľov plodín, aby presvedčili verejnosť a získali jej dôveru v schopnosť nových BCA produktov zvládať choroby a zvyšovať výnosy plodín. Vysokohodnotná rastlinná výroba v skleníkoch by mohla byť ideálnym miestom na testovanie účinnosti PGPR ako BCA v reakcii na rôzne abiotické stresy. Na základe nedávnych úspešných pokusov v skleníkoch sa BCA môžu používať na poli na zvládanie chorôb a súvisiace zvýšenie rastu poľnohospodárskych rastlín.

#### 1.7.5 Rhizobaktérie ako BCA

V posledných niekoľkých desaťročiach si získali pozornosť rhizobaktérie, ktoré sa aplikujú do zrna, semien, koreňov a/, alebo pôdy, aby pomohli rastu a vývoju rastlín. Rhizobaktérie sú dôležité pre fixáciu  $N_2$ , podporu rastu rastlín a biologickú kontrolu rastlinných patogénnych mikroorganizmov. V poslednom čase sa pri bakterizácii používajú rôzne druhy mikroorganizmov, ktoré obsahujú *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* a *Thiobacillus*. Mnohé ochorenia rastlín spojené s nematódami, bakteriálnymi a hubovými infekciami sa podľa správ dajú zvládnuť pomocou PGPR. Použitie PGPR pri potláčaní populácií nematód bolo kontroverzné, pretože môžu byť nepriaznivo ovplyvnené iné pôdne mikroorganizmy a hostiteľská rastlina. Na zvládnutie chorôb spojených s rastlinnými parazitickými háďatkami sa používa kombinácia biologického manažmentu, nematicidov, organických pôdnych zmien a striedania plodín. *In vitro* kultivačné filtráty kmeňa *Pseudomonas* spp. môžu potlačiť juvenilnú mortalitu *Meloidogyne javanica*; tým výrazne znížiť počet koreňových háďatiek a populáciu nematód a zlepšiť vývoj a úrodu rastlín. Okrem toho inokulácie s *Bacillus* spp. ovplyvňujú správanie a kŕmenie háďatiek. Kmene *Pseudomonas striata*, *Pseudomonas fluorescens* a *B. subtilis* tiež prevládajú nad populáciou nematód. Napadnutie koreňovým háďatkom (RKN) sa úspešne zvládlo prostredníctvom biologického manažmentu s použitím izolátov *Bacillus*. Niekoľko štúdií uvádza, že endofytické *P. fluorescens* a *Bacillus* spp. podporujú systémovú rezistenciu plodín voči háďatkám vďaka zvýšenej aktivite fenylalanín amoniak-lyázy, polyfenoloxidázy a peroxidázy ako enzýmov súvisiacich s obranou na produkciu antagonistických chemických látok a zmenu explicitných koreňových exudátov, ako sú aminokyseliny a polysacharidy. Izoláty *P. fluorescens* zvýšili množstvo obranných enzýmov v rajčiakoch odolných voči RKN. V porovnaní s kontrolou viedla aplikácia

*P. fluorescens* a *Paecilomyces lilacinus* k nízkej úrovni spoločnosti háďatiek v koreňoch, hlúzách a pôde.

Straty vyplývajúce zo zberu ovocia a zeleniny po skončení čerstvosti sa v Indii pohybovali od 4,6 % do 15,9 %. Hoci fungicídy môžu potlačiť rast fytopatogénov, ich používanie spôsobuje problémy pre životné prostredie, ako aj pre zdravie ľudí a zvierat. Environmentálne najpriateľnejším postupom na kontrolu hubových chorôb po zbere úrody je používanie BCA. Vo všeobecnosti môžu BCA chrániť rastliny pred hubovými chorobami a v súčasnosti sú vhodnou možnosťou na zvládnutie pozberových chorôb spojených s rastlinnými patogénmi. V poľnohospodárstve môžu BCA ponúknuť množstvo výhod vrátane zníženia počtu pôvodcov, zachovania poľnohospodárstva, minimálneho množstva práce, kontaminácie pôdy, vody rastlín a ťažkostí pri nakladaní s odpadom. Druhy húb, ako sú *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* produkujúce mykotoxíny, sú škodlivé pre zeleninu a spôsobujú choroby po zbere. Mykotoxíny, ako sú fumonizín, ochratoxíny, aflatoxíny a iné toxíny, sa uvoľňujú v zelenine a ovocí napadnutých hubovými patogénmi *Fusarium*, *Alternaria* a *Aspergillus*. Použitie techník bioprímácie a peletizácie *Serratia plymuthica* HRO-C48 spolu s *Verticillium dahliae* v rastlinách repky odhalilo významnú biokontrolu; poskytlo tak dôkaz o schopnosti BCA zvládnuť choroby porovnateľné s chemickými fungicídmi.

*Bacillus* spp. produkujú rôzne zlúčeniny, ktoré sa podieľajú na biokontrolu fytopatogénov na rôznych rastlinách vrátane zemiakov, ryže, rajčiakov, pšenice, podzemnice olejnej, brikálu, cícera a uhoriek. Izolát *Bacillus* spp. BS061 dokáže zmierniť účinok *Botrytis cinerea* na zníženie výskytu plesne sivej a múčnatky na jahodách a uhorkách zistili, že *Pectobacterium carotovorum* SCC1 dokáže zvládnuť ochorenie mäkkej hniloby na rastlinách tabaku, keď je konjugovaný s kmeňom *B. subtilis* B4 a fungicídmi BTH. Pôvodcovia koreňovej hniloby a hniloby koreňov sú často potlačené, keď sa *Pseudomonas* spp. používajú ako BCA. Izoláty PGPR mali antifungálnu aktivitu v rastlinách mungo fazule proti *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *F. solani* a *F. oxysporum*. Tieto izoláty sa môžu použiť aj na prevenciu hubových infekcií, ktoré spôsobujú ochorenie koreňovej hniloby. Aplikácia bakteriálnej BCA, *Pseudomonas aeruginosa*, môže zvládnuť antraknózu v paprike proti pôvodcovi *Colletotrichum capsici*. *P. aeruginosa* môže tiež vyvolať systémovú odolnosť čili papriky voči antraknóze.

Syntetické chemické pesticídy sa používajú najmä na boj proti chorobám po zbere úrody. To môže viesť k odolnosti rastlín voči patogénom, zhoršeniu kvality pôdy a toxikologickým rizikám pre ľudí a životné prostredie. V súčasnosti sa v dôsledku toho všeobecný trend presúva na hľadanie alternatívy k používaniu agrochemikálií pri manažmente chorôb rastlín. V porovnaní so syntetickými chemickými fungicídmi sa používanie mikrobiálnych antagonistov, alebo BCA stalo "horúcou" témou vďaka mnohým výhodám, ktoré majú ako neškodné, ekologické, ekonomické a uskutočniteľné aplikácie na kontrolu infekcií spôsobených patogénmi po zbere úrody

### 1.7.6 Huby ako BCA

Hubové BCA sú schopné antagonizovať rastlinné patogény a chrániť svoje hostiteľské rastliny. Napríklad niekoľko kmeňov Trichodermy bolo vyvinutých ako BCA proti hubovým patogénom *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pyricularia*, *Botrytis* a *Gaeumannomyces*. Ako BCA môže



*Trichoderma* potláčať rôzne vzdušné a pôdne rastlinné patogény, preto sa môže používať ako biopesticíd v skleníkových a/, alebo poľných pokusoch. Niektoré kmene nematofágnych húb môžu regulovať populácie *Meloidogyne enterolobii* v rámci integrovanej ochrany proti škodcom (IPM). AMF by tiež mohli chrániť plodiny pred pôdnymi patogénmi vrátane RKN, hoci mechanizmy antagonizmu sú nejasné.

Na potlačenie RKN sa ako antagonisti používajú nematofágne a endoparazitické huby. Zistilo sa, že prípravok BCA huby *Paecilomyces lilacinus* na báze mastenca je aktívnejší pri znižovaní populácie *Meloidogyne incognita* v pôdach pestovaných s rastlinami rajčiaka. Účinnosť *P. lilacinus* pri kontrole háďatiek sa pozorovala vo viacerých záhradníckych plodinách vrátane rajčiakov, okra a papriky. Najčastejšie používanou BCA na rastlinné parazitické nematódy je huba *P. lilacinus*, ktorá sa ukázala ako vhodná náhrada syntetickej chemickej kontroly pri aplikáciách pred a po výsadbe. *P. lilacinus* infikuje vajíčka, mladé jedince a samičky *M. javanica* priamou penetráciou hýf. *P. lilacinus* môže zvýšiť úrodu rajčiakov a zároveň znížiť populáciu *M. incognita* v pôde a na koreňoch. Manažment RKN možno dosiahnuť aj použitím *P. lilacinus* a *Bacillus firmus* buď jednotlivo, alebo v kombinácii. Avšak zmes *P. lilacinus* a *B. firmus* aplikovaná do pôdy 2 týždne pred presadením rajčiakov sa ukázala ako najlepší postup na kontrolu *Meloidogyne* spp.

Obalenie osiva *Trichoderma viride* a *P. lilacinus* účinne znížilo populáciu háďatiek v pôde. Zistilo sa, že druhy *Aspergillus* a *Paecilomyces* sú antagonistické voči *M. incognita* v porovnaní s ošetrením jediným biologickým činidlom; výsledkom je teda zvýšený rast rastlín vyvinutá technika manažmentu s použitím nematofágnej huby *Pochonia chlamydosporia* na manažment RKN na účely ekologickej produkcie zeleniny. Semená okry ošetrené hubami *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *P. lilacinus*, *P. chlamydosporia* a *P. fluorescens* v dávke 20 g.kg<sup>-1</sup> semien výrazne znížili populáciu háďatiek v pôde a podporili rozvoj rastu rastlín. *P. chlamydosporia* vykazovala nematocidné účinky proti *M. incognita* na infikovanej fazuli obyčajnej v skleníkových podmienkach. Zistilo sa, že *Trichoderma* spp. syntetizujúce chitinázy, lytické enzýmy, proteázy a glukánázy zvládajú choroby zeleninových plodín. *T. harzianum*, *T. viride* a *T. hamatum* majú nematocidné vlastnosti, keď kolonizujú korene hostiteľskej rastliny a zvyšujú ich rastovú výkonnosť. Keďže úrodu plodín ovplyvňujú najmä klimatické podmienky, agronomické faktory, škodcovia a dostupnosť živín v pôde, výskumníci musia tieto faktory zohľadniť pri výbere hubových BCA.

Podobne *Trichoderma* spp. môže zabrániť prenikaniu a vývoju háďatiek do rastlín prostredníctvom regulácie metabolitov. *M. incognita* a iné RKN sú viac ovplyvnené filtrátom kultúry *Trichoderma*. Druhy *Trichoderma* môžu produkovať viridín, nematocidnú chemickú látku. Gliotoxín a kyselina octová boli tiež zaznamenané ako nematocidné látky v kultivačných filtrátoch *T. virens* a *T. longibrachiatum*. V reakcii na *M. incognita* má *T. polysporum* schopnosť syntetizovať cyklosporín, peptid, ktorý má nematocidný účinok. Účinnosť *P. lilacinus*, ako bioagens, alebo bioproduktov v zmesiach, významne znížila počet *M. incognita* na baklažáne. Ukázalo sa, že rôzne zdroje N a uhlíka ovplyvňujú rast a antagonizmus *Trichothecium roseum* a *T. viride*. Hoci fruktóza a lyzín boli najúčinnnejšie proti *T. viride*, ramnóza a glycín boli účinnejšie proti *T. roseum*. Existuje nepriaznivý účinok filtrátov húb na liahnutie vajíčok a mortalitu juvenilných jedincov RKN. Rastliny ošetrené hubou BCA, *Lecanicillium muscarium*, znížili počet hálok v rastlinách, vajíčok, juvenilov (J2) a reprodukčný faktor (Rf) *Meloidogyne hapla* v porovnaní s kontrolnými rastlinami. Okrem toho sa pri ošetrení *L.*

*muscarium* výrazne zlepšil rast rastlín. Izoláty *Trichoderma* a *P. lilacinum* výrazne znížili počet a hmotnosť vajčiek háďatiek, minimalizovali poškodenie koreňovej galusky a zlepšili vývoj koreňovej hmoty rastlín v porovnaní s kontrolnými rastlinami bez použitia hubových BCA. Celkovo viac ako 30 rodov a 80 druhov húb môže parazitovať RKN preukázalo, že huba *Colletotrichum falcatum* má antagonistický potenciál voči hubovým patogénom *Penicillium citrinum*, *Botrytis cinerea* a *Trichoderma glaucum*. Okrem toho iné huby, ako napríklad *Ampelomyces speciosus* a *Acremonium alternatum*, majú schopnosť rozkladať mycélium hubových patogénov, čo naznačuje, že nielen rhizobaktérie, ale aj huby môžu slúžiť ako BCA.

### 1.7.7 Mechanizmy používané MBCA

Pochopenie vhodných podmienok na realizáciu programov proti rastlinným patogénom si vyžaduje spoluprácu medzi rôznymi výskumnými skupinami zameranými na mechanizmy spojené s MBCA na zvládanie chorôb rastlín. V posledných dvoch desaťročiach sa rozsiahly výskum zameril na antifungálny účinok, kolonizáciu rhizosféry a prínosy pre plodiny spojené s MBCA. Primárna stratégia MBCA je zhrnutá ako antibiôza, konkurencia o mikroživiny, ako je železo, mykoparazitizmus, produkcia hydrolytických enzýmov a indukcia ISR v hostiteľských rastlinách. Okrem toho sa produkcia metabolitov, ktoré sú inhibičné pre rastlinné patogénne rhizosférické mikroorganizmy, považuje za jednu z hlavných biokontrolných aktivít mnohých MBCA.

U viacerých mikroorganizmov vedie antibiôza, známa aj ako sekundárne metabolity, k produkcii rôznych toxických chemických látok pre patogénne mikroorganizmy; sú teda vhodné pre rast a vývoj rastlín. Mikroorganizmus produkujúci antibiotiká musí produkovať antibiotikum v správnej mikronike na povrchu koreňa, aby účinne kontroloval choroby rastlín. Aktinobaktérie (8 700 rôznych antibiotík), baktérie (2 900) a huby (4 900) môžu produkovať obrovské množstvo antibiotík. Uvádza sa, že mutagenéza bola úspešná pri určovaní úlohy antibiotík generovaných bakteriálnymi izolátmi BCA na kontrolu patogénov spojených s infekciami rastlín.

Lipopeptidy (surfaktín, iturín a fengycín) v *Bacillus* spp. Tiež sa uvádza, že pyrrolnitrín, 2,4-diacetylfloroglucinol (DAPG) a fenazín môžu byť potenciálne antibiotické metabolity v *Pseudomonas*. *Pseudomonas* spp. majú okrem iných antimikrobiálnych chemických látok schopnosť vytvárať pyoluteorín, siderofóry a kyanid. Okrem toho enzymatická aktivita celulázy, proteázy,  $\beta$ -glukanázy a chitinázy môže lyzovať hubové bunky. Antibiotické metabolity produkované *Pseudomonas* spp. sú regulované komplexnými regulačnými sieťami a vysokým počtom transkripčných faktorov. Významnými triedami antimykotík sú lipopeptidy, alebo peptidy, ktoré sú produkované ribozómami, alebo neribozómami *Bacillus* spp.

*Bacillus* spp. majú schopnosť produkovať rôzne biologicky aktívne chemické látky, ktoré bránia rozvoju viacerých chorôb plodín. Výskum ukázal, že množstvo antibakteriálnych, alebo antifungálnych chemických látok produkovaných *Bacillus* spp. v rhizosfére je trochu malé, čo vyvoláva pochybnosti o úlohe rýchleho zvládania chorôb rastlín. Zistilo sa, že niekoľko izolátov *P. fluorescens* vytvára cyklické lipopeptidy (CLP), ako sú viskosínamid, amfízín a tenzín, ktoré boli účinné proti hubovým patogénom *R. solani* a *Pythium ultimum*.

Biologická kontrola je aplikácia užitočných organizmov, génov a ich produktov vo forme metabolitov. Na kontrolu patogénnych infekcií sa využilo niekoľko metabolitov mikroorganizmov *in vitro*. Výsledkom je, že tieto sekundárne metabolity možno využiť ako produkty BCA; a tak sú účinné na zmiernenie negatívneho vplyvu iných patogénnych mikroorganizmov a zároveň sú šetrné k životnému prostrediu. Antimikrobiálne aktivity niektorých BCA húb môžu vykazovať aj antagonistické účinky voči hubám. Napríklad *Trichoderma* spp. sa bežne vyskytujú v pôde a poskytujú rôzne prchavé a neprchavé zlúčeniny. Prchavé zlúčeniny, ako sú kyanidy, vodík, ET, aldehydy, ketóny a alkoholy; a neprchavé látky, ako sú peptidy, môžu inhibovať rast mycélia niektorých patogénnych húb. Mnohé antifungálne zlúčeniny, ako napríklad gliovirín, gliotoxín, viridiol, kyselina heptelidová, valinotrocín a viridín, môže produkovať *Gliocladium virens*, ktorý pôsobí ako MBCA. Gliotoxín môže účinne redukovať hubové patogény *Pythium aphanidermatum*, *M. phaseolina*, *Pythium debaryanum*, *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* a *Rhizoctonia bataticola*. Produkcia 1-hydroxy-3-metylantrachinónu, 1,8-dihydroxy-3-metylantrachinónu, azafilónu T22, harzianolidu, butenolidu T39 a harzianopyridónu kmeňmi *T. harzianum* T22 a T39 má schopnosť kontrolovať rastlinné hubové patogény *Leptosphaeria maculans*, *Phytophthora cinnamomi*, *R. solani*, *Botrytis cinerea* a *P. ultimum*. Niekoľko sekundárnych metabolitov bolo izolovaných a rozpoznávaných rôznymi metódami, ako je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) a plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS). Tri izoláty, Cg-5, Cg-6 a Cg-7, ktoré produkujú sekundárny metabolit, chaetoglobozín A, sa vo filtráte kultúry detegovali pomocou UV spektra pri 250 nm. Antimikrobiálne zlúčeniny uvoľňované hubami môžu tiež kontrolovať fytopatogény počas pozberových infekcií. Pozberová infekcia spôsobuje nadmerné poškodenie zeleniny a ovocia.

### 1.7.8 Konkurencia v rhizosfére

Koexistencia dvoch živých mikroorganizmov nastáva vtedy, keď sa populácia určitého mikroorganizmu snaží získať niečo väčšie, napríklad priestor, alebo potravu. Patogénne a nepatogénne mikroorganizmy súperia o potravu a zdroje v rhizosfére. Už dlho je známe, že nepatogénne baktérie viazané na rastliny sú zvyčajne chránené kolonizujúcimi rastlinami, v dôsledku čoho oslabujú obmedzené dostupné substráty a bránia šíreniu patogénov. Schopnosť akéhokoľvek mikroorganizmu súťažiť s ostatnými o základné živiny a exudáty vylučované koreňmi rastlín a ich schopnosť kolonizovať do koreňového povrchu hostiteľských rastlín sa označuje ako kompetencia rhizosféry. V rhizosfére môže pravidelne dochádzať k prospešným interakciám medzi rastlinami a mikroorganizmami; tým sa podporuje rast a/, alebo zvyšuje tolerancia rastlín voči biotickým a abiotickým stresom.

Rhizosférická kompetícia môže úspešne vytvoriť mikrobiálne spoločenstvá na koreňoch rastlín, alebo v ich blízkosti. Kolonizácia koreňov rastlín PGPM môže chrániť rastliny pred patogénmi a podporovať rast rastlín a chemotaxia ku koreňovým exudátom sa považuje za základný predpoklad účinnej kolonizácie koreňov. Zistilo sa, že mikrobiálne spoločenstvo v rhizosfére je dôležité krátko po výsadbe, ale pravidelne sa znižuje počas vegetačného obdobia. *Pseudomonas jessenii* RU47 bol účinný na chorobu spodnej hniloby na šaláte spôsobenú *R. solani*. Tryptofán môže stimulovať rast adventívnych koreňov a koreňových vláskov *B. subtilis* SRB28 produkujúceho

IAA, ktorý môže kolonizovať koreňové tkanivá široko, vytvárať mikrokolónie a pretrvávajúť v rhizosfére.

Rhizosférické mikroorganizmy podporujúce rast rastlín predstavujú širokú škálu druhov. PGPM sú rozdelené do kategórií podľa ich schopnosti kolonizovať korene, prežívať, zvyšovať ich počet v mikrohabitatoch na povrchu koreňov, konkurovať pôvodným mikroorganizmom a zvyšovať odolnosť hostiteľských plodín. PGPM môžu nielen podporovať vývoj rastlín, ale často sa používajú aj ako BCA na potlačenie chorôb rastlín. Kmene *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* a aktinobaktérie asociované s rastlinami sa používajú ako biohnojivá a BCA v poľnohospodárstve. Okrem toho *Acetobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* a *Rhodococcus* môžu tiež zlepšiť rast v plodinách, ktoré sa zistilo, že viaceré vlastnosti PGPR, ako je produkcia siderofóru, solubilizácia fosfátu, syntéza IAA a antagonizmus proti hubovým patogénom, stimulujú rast v čajových rastlinách. To súviselo so zvýšením počtu výhonkov a listov v skleníkových a poľných podmienkach. Vo všeobecnosti platí, že pôdy s aktívnymi mikrobiálnymi ekosystémami a vysokým obsahom organickej hmoty vyžadujú menej hnojív ako pôdy bez akýchkoľvek mikroorganizmov.

Biohnojivá vyrobené z mikroorganizmov, ktoré pomáhajú rastlinám získavať živiny, môžu kolonizovať korene rastlín, rozpúšťať P, produkovať siderofór a HCN a viazať N<sub>2</sub>. Fixácia N<sub>2</sub> pomocou PGPR poskytuje poľnohospodárskym systémom na celom svete značné množstvo N, pričom odhady sa pohybujú od 20 do 22 Tg N ročne, čo môže v niektorých rokoch dosiahnuť až 40 Tg N. Okrem toho sa uvádza, že biologická fixácia N<sub>2</sub> môže africkým krajinám poskytnúť približne 12 Tg N ročne<sup>-1</sup>. Výnosy plodín môžu byť obmedzené ďalšími výživnými prvkami, ako sú Fe a Zn. Podobne ako P, aj Fe je v pôde veľmi hojne zastúpené, ale vo väčšine prípadov nie je pre rastliny dostupné. Syntéza organických kyselín, alebo siderofórov rôznymi kmeňmi PGPR zvyšuje dostupnosť Fe.

Auxíny sú produkované rôznymi PGPR, ktoré sa podieľajú na raste a vývoji rastlín a ich architektúre. Veľká pozornosť sa venuje auxínu IAA, ktorý produkujú PGPR. Vo veľkej miere sa podieľa na interakciách medzi PGPR a rastlinami. Uvádza sa, že PGPR produkujúce auxín spôsobujú transkripčné zmeny v hladinách hormónov, odolnosť/toleranciu voči biotickému/abiotickému stresu a reguláciu génov spojených s bunkovou stenou. IAA môže tiež zvyšovať dĺžku koreňov, zvyšovať biomasu koreňov a zároveň znižovať veľkosť a hustotu prieduchov. Rast a vývoj rastlín možno stimulovať aj indukciou génov odpovedajúcich na auxín.

Okrem toho môžu PGPR produkovať GA a CK, hoci presný proces zostáva neznámy. Obmedzený počet kmeňov PGPR môže produkovať obrovské množstvo GA; tým výrazne zvýšiť rast výhonkov v rastlinách. Očakáva sa, že exudáty obsahujú organické kyseliny, cukry a aminokyseliny, ktoré sú v cytoplazme rastlín veľmi hojné, ale nízke množstvo komplexných sekundárnych metabolitov vrátane flavonoidov, terpénov a fenolových látok, ktoré môžu priťahovať určité rhizosférické mikroorganizmy. Zdravie a fyziológia rastlín by sa mohli zlepšiť vďaka kolonizácii koreňov PGPR, čo by malo za následok viac semien a kvetov. Zistilo sa, že aktinobaktérie izolované z rhizosféry bambusu sú schopné potlačiť hubový patogén *Fusarium* spp. a zároveň podporiť rast a vývoj rastlín. Kyselina harziánová produkovaná *T. harzianum* nielenže podporovala rast rastlín, ale vykazovala aj antifungálne účinky proti *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *R. solani*, a to

aj pri veľmi nízkych dávkach. MBCA sú dôležité pre napredovanie a zlepšenie vývoja rastu rastlín, ako aj pre prevenciu útoku rastlinných patogénov.

### **1.7.9 Perspektívy do budúcnosti**

Riadenie biologickej kontroly je jednou z najslubnejších aplikácií pre udržateľné poľnohospodárstvo. Je to osvedčený ekologický prístup k ochrane poľnohospodárstva pred škodcami. Táto stratégia využíva živé mikroorganizmy na zníženie populácie škodcov konzervatívnym, spoľahlivým a ekologicky šetrným spôsobom. V rozvinutých krajinách je biologická kontrola pozoruhodným nástrojom na dosiahnutie udržateľnej, menej nákladnej a bezpečnej kontroly škodcov; v porovnaní so syntetickou (chemickou) kontrolou škodcov tak ponúka výhody pre chovateľov a spotrebiteľov. Tento prehľad poskytol prehľad antagonistických spôsobov účinku MBCA, ktoré sa považujú za praktické náhrady syntetických fungicídov, ako aj za stimuláciu rastu a vývoja rastlín na pozberové účely. Výskumníci pracujúci v oblasti MBCA musia predvídať nové a odlišné otázky, aby mohli poskytnúť riešenia, ktoré pomôžu pri vývoji nových technológií/aplikácií biologickej kontroly. Bioinformatika, molekulárna biológia, analytická chémia a bioštatistika tiež vrhli svetlo na nové oblasti výskumu zamerané na definovanie MBCA-patogén-rastlina.

Nemali by sa zanedbávať ani podmienky prostredia, ktoré tiež zohrávajú rozhodujúcu úlohu v procese antagonizmu a spôsobu (spôsoboch) účinku MBCA. Pri izolácii, identifikácii a charakterizácii kmeňa MBCA by výskumníci mali zohľadniť tieto podmienky:

1. Šírenie infekcie spojené s nematódami, hubami a baktériami, ako aj potenciálnymi antagonistami v mikroprostredí a makroprostredí interakcie.
2. Najlepšie podmienky na aplikáciu BCA.
3. Reakcia MBCA na miestne spoločenstvá a na rôzne stratégie riadenia.
4. Limitujúce faktory účinnej kolonizácie a skĺbenia charakteristík biologickej kontroly.
5. Rastlinné komponenty a dynamika, ktoré vyvolávajú obranu hostiteľa.

Mnohé plodiny sú postihnuté rôznymi patogénmi. PGPM škodcov a chorôb plodín sa vo všeobecnosti považuje za udržateľnú alternatívu konvenčnej chemickej ochrany rastlín. Tieto PGPR a PGPF pôsobiace ako MBCA sú bezpečnou, účinnou a ekologickou formou ochrany proti škodcom, ktorá nepoškodzuje životné prostredie ani ľudské zdravie. PGPR/PGPF sú antagonistické mikroorganizmy, ktoré by sa mohli využívať ako biopesticídy a biohnojivá na zlepšenie zdravia a rastu rastlín. Prijatie biopesticídov/biohnojív na báze PGPR/PGPF v komerčnom meradle môže významne prispieť k udržateľnému poľnohospodárstvu a bezpečnému životnému prostrediu. Tento prehľad poskytol prehľad o výskume týkajúcom sa PGPM, ich prínosoch a účinkoch ako potenciálnych bioinokulantov na rast rastlín a biologickú kontrolu. Zvýšené využívanie PGPM si vyžaduje dosiahnutie presného výberu prospešných kmeňov PGPR/PGPF a konzorcií, mechanizmov, ktoré sú základom interakcií PGPM a rastlín, a schopnosť pripraviť sa na budúce výzvy v poľnohospodárstve.

## 2 Najdôležitejšie patogény rastlín

### 2.1 Bakteriálne patogény rastlín

Baktériou, alebo skupinou patogénov, ktorá sa z vedeckého a hospodárskeho hľadiska najviac prejavuje, je *Pseudomonas syringae*. Je zrejmé, že *P. syringae* mala obrovský vplyv na naše vedecké chápanie patogénnosti mikroorganizmov a naďalej spôsobuje hospodársky významné choroby rastlín. Na druhom mieste je *Ralstonia solanacearum*, ktorá má veľmi vysoké hodnotenie hospodárskeho významu na celom svete, najmä preto, že má veľmi široké spektrum hostiteľov, pričom postihnuté plodiny siahajú od zemiakov až po banány. Na treťom mieste je *Agrobacterium tumefaciens*, ktorý sa veľmi výrazne presadil najmä na základe svojho vedeckého významu. Hoci táto baktéria môže spôsobiť značné škody na konkrétnych plodinách, jej úloha vo vedeckých objavoch a aplikáciách jednoznačne priťahovala pozornosť. Na štvrtom, piatom a šiestom mieste sú druhy *Xanthomonas*, ktoré sa jasne odlišujú svojou patológiou a cieľmi hostiteľov, pričom každý z nich získal pozornosť ako jednotlivec. Na štvrtom a šiestom mieste sú xantomonády s relatívne špecifickými cieľmi pre plodiny, konkrétne *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, jeden z najzávažnejších patogénov ryže, a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, pôvodca bakteriálnej choroby manioku (CBB). Na piatom mieste sa umiestnili patovary *Xanthomonas campestris*, ktoré spôsobujú choroby rôznych plodín na celom svete. Na siedmom mieste je *Erwinia amylovora*, ktorá spôsobuje známe ochorenie okrasných drevín, ovocných stromov a kríkov ohňovzdornosť. Toto ochorenie má významnú vedeckú históriu a pretrvávajúci hospodársky význam. *Xylella fastidiosa* má právom miesto v prvej desiatke na ôsmej pozícii, pretože je spojená s viacerými dôležitými chorobami plodín a stromov. Má tiež dôležité vedecké tvrdenie, že je prvým fytopatogénom (mimo rastlinných vírusov), ktorého genóm bol sekvenovaný. V prípade položky na deviatom mieste bolo rozhodnuté zoskupiť dva druhy *Dickeya*, konkrétne *Dickeya dadantii* a *solani*, keďže *Dickeya* prilákala značné množstvo hlasov, z ktorých mnohé boli jednoducho označené ako *Dickeya* spp. Názov *Dickeya solani* síce nebol oficiálne prijatý, ale je jasné, že *Dickeya* spp. spôsobujú hospodársky významné choroby, najmä zemiakov. Poslednou položkou na desiatom mieste je *Pectobacterium carotovorum* (zahŕňajúca aj *P. atrosepticum*), ktorá si zaslúži miesto v Top 10 kvôli hospodárskym stratám spojeným s chorobami spôsobenými mäkkou hnilobou, ale je zodpovedná aj za niekoľko vedeckých míľnikov. To je okrem niektorých dlhodobých translačných prielomov, ako je účasť na liečbe niektorých leukémií. Ďalšie baktérie, ktoré treba jednoznačne spomenúť sú *Clavibacter michiganensis* (*michiganensis* a *sepedonicus*), *Pseudomonas savastanoi* a *Candidatus Liberibacter* (pv. *asiaticus*).

#### ***Pseudomonas syringae* patovar**

Hospodársky vplyv *P. syringae* sa zvyšuje, pričom sa obnovujú staré choroby vrátane bakteriálnej škvrnitosti rajčiakov (pv. *tomato*) a objavujú sa nové infekcie s celosvetovým významom, ako napríklad rakovina pagaštanu konského (pv. *aesculi*). Európska príručka chorôb rastlín opisuje 28 patogénov, z ktorých každý napáda iný druh hostiteľa. Do tohto zoznamu môžeme teraz pridať pv. *aesculi*. Niekoľko patogénov spôsobuje na stromoch dlhodobé problémy, často v podobe deformácií

a rakoviny (napr. *savastanoi* a *morsprunorum*). Infekcie jednoročných plodín sú sporadickejšie a ich vypuknutie je často spôsobené výsevom kontaminovaného osiva. Mnohé správy zdôrazňujú, že *P. syringae* sa prenáša semenami, ale je to pozoruhodne prispôsobivý patogén, ktorý sa objavuje na niektorých zdanlivo bizarných miestach, napríklad vo vodách pri topení snehu. Po vzniku nových infekcií, za priaznivých podmienok zrážok a teplôt, sú epidémie chorôb často zničujúce, ako to bolo pozorované v prípade hálkovej choroby fazule spôsobenej pv. *phaseolicola*.

Výskum molekulárnej biológie virulencie a obrany rastlín proti *P. syringae* priniesol nové poznatky o patogénnosti mikroorganizmov nielen v súvislosti s rastlinami, ale aj so všeobecnejším významom pre ľudské choroby. Patovary *phaseolicola* a rajčiak sa ukázali ako vynikajúce modely pre základné štúdie bakteriálneho napadnutia a obrany rastlín. Pozoruhodnými príkladmi sú objavy týkajúce sa génového zoskupenia pre hypersenzitívnu reakciu a patogenitu (hrp), ktoré kódujú sekrečný systém typu III, obchodovanie s efektormi a ciele hostiteľa na potlačenie obrany. *Pseudomonas syringae* je lídrom v oblasti vplyvu vysoko výkonných sekvenačných technológií na naše chápanie patogenity. Doteraz možno neočakávanou črtou je, že patovary kolonizujúce silne nepríbuzné rastliny sa tesne zoskupujú, napríklad pv. *savastanoi* (oliva) a pv. *phaseolicola* (fazuľa) ležia v tom istom klane. Genomická analýza, ktorá bola iniciovaná, má pravdepodobne najväčší potenciál na odhalenie determinantov hostiteľskej špecificity. Po dokončení väčšieho počtu genomických sekvencií by sa malo získať ďalšie poznanie o stále záhadnej úlohe efektorových proteínov a toxínov pri definovaní hostiteľského rozsahu v rámci druhu. Patovary *Pseudomonas syringae* predstavujú nielen hlavnú skupinu baktérií patogénnych pre rastliny, ale pravdepodobne by sa dostali aj na vrchol rebríčka patogénov všetkých čias vrátane húb a oomycét. Výskum efektorovej biológie vláknitých patogénov je do značnej miery nasledovaný pokrokom dosiahnutým v prípade *P. syringae*.

### ***Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* je pravdepodobne najničivejšou rastlinnou patogénnou baktériou na svete. Jedným z dôvodov je, že druh *R. solanacearum* sa skladá z veľmi veľkej skupiny kmeňov, ktoré sa líšia svojím geografickým pôvodom, hostiteľským spektrom a patogénnym správaním. Táto heterogénna skupina sa v súčasnosti považuje za "komplex druhov", ktorý bol rozdelený do štyroch hlavných fylotypov (fylogenetické zoskupenie kmeňov). Druh ako celok má veľmi široký hostiteľský areál, infikuje 200 druhov rastlín vo viac ako 50 čel'adiach a je pôvodcom hnedej hniloby zemiakov, bakteriálneho vädnutia rajčiakov, tabaku, baklažánu a niektorých okrasných rastlín, ako aj hnedej hniloby banánov.

*Ralstonia solanacearum* je pôdny patogén, ktorý infikuje rastliny prostredníctvom rán, koreňových špičiek, alebo trhlín v miestach výskytu bočných koreňov. Baktéria následne kolonizuje kôru koreňa, napáda xylémové cievy a cez cievny systém sa dostáva do stonky a nadzemných častí rastliny. *Ralstonia solanacearum* sa môže v xyléme rýchlo množiť až do veľmi vysokej hustoty buniek, čo vedie k príznakom vädnutia a odumieraniu rastlín.

Priamy hospodársky vplyv *R. solanacearum* je ťažké vyčíslit', ale patogén je mimoriadne škodlivý vzhľadom na svoje široké geografické rozšírenie a hostiteľský

areál; len na zemiakoch je každoročne zodpovedný za straty vo výške približne 1 miliardy USD na celom svete. Výskyt tejto choroby je obzvlášť dramatický pre poľnohospodárstvo v mnohých rozvojových krajinách v medzitropických oblastiach, v ktorých sa *R. solanacearum* endemicky vyskytuje. V oblastiach, v ktorých má tento organizmus karanténny štatút, je tiež zodpovedný za významné straty z dôvodu regulačných opatrení na eradikáciu a obmedzenia ďalšej produkcie na kontaminovanej pôde. Manažment ochorenia zostáva obmedzený a je sťažený schopnosťou patogénu prežívať roky vo vlhkej pôde, vodných nádržiach, na rastlinných zvyškoch, alebo v asymptomatických hostiteľoch burín, ktoré fungujú ako rezervoáre inokula. Šľachtenie na rezistenciu, hoci je v niektorých prípadoch účinné, je sťažené veľkou rozmanitosťou patogénnych kmeňov.

Ako koreňový a cievny patogén je *R. solanacearum* modelovým systémom na štúdium bakteriálnej patogenity. Táto baktéria bola jedným z prvých rastlinných patogénnych genómov, ktoré boli kompletne sekvenované, a vývoj patosystémov s modelovými rastlinami, ako je *Arabidopsis*, alebo strukovina *Medicago truncatula*, uľahčili genetické a molekulárne štúdie rastlinných aj bakteriálnych partnerov. Patogenita *R. solanacearum* závisí od systému sekrécie typu III a od prvého opisu fenotypu hrp mutantov sa na túto tému uskutočnilo mnoho štúdií. Bolo identifikovaných a charakterizovaných mnoho ďalších faktorov patogenity, ktorých expresiu riadi atypická quorum-senzorová molekula štrukturálne príbuzná s rodinou difúzných signálnych faktorov (DSF).

Budúci výskum v tejto oblasti bude zahŕňať lepšie pochopenie molekulárnych základov, ktoré sú základom adaptácie tejto všestrannej skupiny kmeňov na takú rozmanitú škálu hostiteľov. Ďalšou dôležitou úlohou, ktorou sa treba zaoberať, je, ako by sa naše rastúce poznatky o sofistikovaných mechanizmoch vyvinutých *R. solanacearum* na podporu náchylnosti rastlín mohli využiť na vytvorenie nových a trvalých ochranných stratégií na boj proti tejto ničivej chorobe.

### ***Agrobacterium tumefaciens***

Pred viac ako sto rokmi identifikovali *Agrobacterium tumefaciens* ako pôvodcu nádoru korunovej hálky, jedného z najzávažnejších ochorení rastlín, ktoré postihujú rôzne druhy plodín na celom svete. V prírode táto baktéria prenášaná pôdou vyvoláva neoplastické výrastky na poranených miestach hostiteľských rastlín a vážne obmedzuje úrodu a rastovú silu plodín. Tento škodlivý účinok *A. tumefaciens* nepochybne prispel k hnacej sile dlhodobého výskumu agrobaktérií. *A. tumefaciens* však nie je len ďalším fytopatogénom, ale má veľmi vzácnu vlastnosť: schopnosť genetickej transformácie.

Významný objav prišiel koncom 70. rokov minulého storočia, keď Mary-Dell Chilton a Eugene Nester so svojimi kolegami dokázali, že špecifický úsek DNA (dnes známy ako T-DNA) bakteriálneho plazmidu vyvolávajúceho nádory (Ti) je prítomný v genóme infikovaných rastlinných buniek. Tento prelomový objav vrhol svetlo na *Agrobacterium* ako na prvý organizmus schopný prenosu génov medzi jednotlivými organizmami. Odvtedy sa veľa zistilo o molekulárnych mechanizmoch, ktoré sú základom genetickej transformácie sprostredkovanej *A. tumefaciens*, ktorá sa ukázala ako veľmi zložitý proces regulovaný mnohými bakteriálnymi a hostiteľskými faktormi. Stručne povedané, *A. tumefaciens* vníma fenolové zlúčeniny vylučované z poranených rastlinných tkanív a aktivuje expresiu niekoľkých efektorov, označovaných ako proteíny



virulencie (Vir). Niektoré z týchto faktorov sprostredkujú tvorbu jednovláknovej kópie T-DNA (T-strand) a jej transport do hostiteľskej bunky prostredníctvom sekrečného systému typu IV. Okrem T-vlákná sa do rastlinných buniek prenáša aj niekoľko vírusových proteínov. Tieto exportované efekty spolu s viacerými hostiteľskými faktormi uľahčujú jadrový import reťazca T a jeho následnú integráciu do hostiteľského genómu. Nakoniec sa z integrovanej T-DNA exprimujú gény zapojené do biosyntézy auxínu a cytokinínu, čo vedie k abnormálnej proliferácii buniek v infikovaných tkanivách a k tvorbe nádorov, t. j. korunových hállok.

Hoci sa podrobnosti o jej molekulárnej podstate ešte len objavujú, objav genetickej transformácie rastlín sprostredkovanou baktériou *Agrobacterium* otvoril novú éru molekulárnej biológie rastlín. V roku 1983 Chilton a jeho kolegovia oznámili, že upravenú T-DNA nesúcu cudzí gén možno preniesť do rastlín tabaku a udržiavať ich prostredníctvom regenerácie. Od tejto prvej demonštrácie transgénnych rastlín sa dosiahol značný koncepčný a technický pokrok, vďaka ktorému sa genetické inžinierstvo rastlín sprostredkované agrobaktériami stalo uskutočniteľnejším v každodennej praxi základného výskumu, ako aj biotechnológií. Napríklad príchod binárnych vektorov, systému dvoch samostatných replikonov, ktoré obsahujú T-DNA a gény virulencie a fungujú v *Escherichia coli* aj *A. tumefaciens*, výrazne uľahčil manipuláciu s T-DNA. Vďaka neuveriteľne širokému spektru hostiteľov, ktoré v laboratórnych podmienkach zahŕňa väčšinu eukaryotických organizmov, vysokej účinnosti a sofistikovanej modernej transformačnej technológii je *A. tumefaciens* v súčasnosti obľúbeným transformačným prostriedkom na genetickú manipuláciu väčšiny rastlinných druhov vrátane modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana*, ako aj mnohých druhov húb.

*Agrobacterium tumefaciens* neprestáva udivovať rastlinných biológov a patológov. Aj po 100 rokoch výskumu stále objavujeme nové mechanizmy, ktoré sú základom interakcií *A. tumefaciens* s jeho hostiteľmi, a ešte len začíname chápať, aký je tento patogén skutočne šikovný. Nedávne štúdie napríklad odhalili, že *A. tumefaciens* dokáže zvrátiť obranné mechanizmy hostiteľa na aktívnu podporu infekcie. V dohľadnej budúcnosti bude preto *A. tumefaciens* naďalej slúžiť nielen ako silný nástroj pre genetické inžinierstvo rastlín, ale aj ako vynikajúci modelový organizmus na dešifrovanie interakcií medzi hostiteľom a patogénom.

### ***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae***

Bakteriálna listová škvrnitosť (BLB) spôsobená baktériou *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) sa vyskytuje v tropických aj miernych oblastiach. BLB sa vyskytuje aj v Austrálii, Afrike, Latinskej Amerike, Karibiku a USA. Boli zaznamenané straty úrody vo výške 10 – 50 % v dôsledku BLB. Výskyt BLB je najčastejší počas monzúnového obdobia v juhovýchodnej Ázii a Indii. Ryža sa začala pestovať v USA (Severná Karolína) pred viac ako 200 rokmi a v iných častiach USA sa pestuje už viac ako 100 rokov. Hoci počas histórie pestovania ryže v USA sa na ryži vyskytlo, alebo vyvinulo mnoho chorôb, Xoo sa v USA neuchytila. Klimatické podmienky v oblastiach pestovania ryže v USA a postupy pestovania ryže v USA nie sú priaznivé pre dlhodobé prežívanie, alebo šírenie Xoo. Z týchto dôvodov predstavuje Xoo pre poľnohospodárstvo USA nízke riziko.

BLB sa účinne kontroluje používaním rezistentných odrôd ryže. Keďže však Xoo má schopnosť exprimovať efekty, ktoré potláčajú niektoré obranné reakcie hostiteľa,

často sa táto rezistencia nakoniec prekoná. Gény rezistencie triedy receptorov rozpoznávajúcich vzory, ktoré nie sú RD, zvyčajne poskytujú dlhodobú rezistenciu, pretože rozpoznávajú konzervované mikrobiálne znaky, ktoré po mutácii ochromujú virulenciu patogénu. Kontrola choroby zlúčeninami medi, antibiotikami a inými chemickými látkami sa neukázala ako účinná.

*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* je tyčinkovitá gramnegatívna baktéria. Produkuje žltý rozpustný pigment nazývaný xantomonadín a extracelulárny polysacharid (EPS). EPS je dôležitý pri ochrane baktérií pred vysychaním a pri tlmení šírenia vetrom a dažďom. *Xoo* sa šíri zavlažovacími vodnými systémami, striekajúcim, alebo vetrom roznášaným dažďom, ako aj kontaminovaným ryžovým strniskom z predchádzajúcej sezóny, ktoré je najdôležitejším zdrojom primárneho inokula. *Xoo* infikuje listy ryže zvyčajne cez hydatódy na špičke listu, porušené trichómy, okraje listov a rany v listoch, alebo koreňoch, množí sa v medzibunkových priestoroch a vstupuje do xylémových ciev. V priebehu niekoľkých dní po infekcii bakteriálne bunky a EPS vyplnia xylémové cievky a vytečú z hydatód a na povrchu listov vytvoria guľôčky exsudátu, ktorý je charakteristickým znakom choroby a zdrojom sekundárneho inokula.

Podobne ako *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), aj *Xoo* produkuje celý rad faktorov virulencie vrátane EPS, extracelulárneho enzýmu a efektorov typu III, ktoré sú nevyhnutné pre virulenciu.

Sekvencie genómu troch kmeňov *Xoo* (MAFF311018, KACC10331, PXO99A) boli dokončené a sekvenovanie genómu ďalších ôsmich kmeňov *Xoo* sa pripravuje. Porovnávacia genomická analýza rôznych kmeňov *Xoo* odhalila veľké množstvo genomických prestavieb a rekombinácií efektorových génov podobných transkripčnému aktivátoru (TAL), ako aj veľké množstvo inserčných sekvenčných prvkov (IS). Viaceré genetické štúdie naznačili, že aktivita IS elementov a rekombinácia medzi efektorovými génmi TAL prispeli k rôznorodej štruktúre *Xoo*. Porovnávacia analýza genomickej sekvencie uľahčila pochopenie rozmanitosti a evolúcie *Xoo*. Kompletné sekvencie genómu tiež uľahčili vývoj markerov, ktoré sú užitočné pre epidemiologické štúdie.

### ***Xanthomonas campestris* patovar**

Patovary *Xanthomonas campestris* spôsobujú agronomicky významné choroby na celom svete. Medzi najvýznamnejšie z týchto patogénov patria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), pôvodca čiernej hniloby krížikov, ktorý postihuje všetky pestované kapustovité rastliny, *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), teraz preklasifikovaný na *X. euvesicatoria*, pôvodca bakteriálnej škvrnitosti papriky a rajčiakov, a *X. campestris* pv. *malvacearum* (*Xcm*, teraz *X. axonopodis* pv. *malvacearum*), ktorý spôsobuje škvrnitosť listov bavlny. Choroby spôsobené týmito baktériami sú obzvlášť závažné v oblastiach s teplým a vlhkým podnebím, hoci čierna hniloba je hospodársky dôležitá aj v oblastiach s miernym podnebím, napr. v Cornwalle a iných západných oblastiach Spojeného kráľovstva. *Xcc* je dôležitá aj ako producent EPS xantánu, ktorý sa používa ako potravinárska prísada a vo farmaceutickom a ropnom priemysle.

Štúdie týchto baktérií mali značný vedecký vplyv, ktorý sa neobmedzil len na disciplínu molekulárnej patológie rastlín. Práca na *Xcm* poskytla prvý dôkaz hypotézy, že interakcie medzi bakteriálnymi patogénmi a rastlinami riadi gén za gén.

Práca na *Xcv* stanovila genetický základ spúšťania odolnosti voči chorobám v paprike, čo viedlo k izolácii génov špecifikujúcich avirulenciu na kultivaroch papriky obsahujúcich gény odolnosti Bs1, Bs2, alebo Bs3 (pre bakteriálnu škvrnitosť). AvrBs3 je paradigmatickým členom veľkej rodiny efektorových proteínov TAL typu III u *Xanthomonas* spp. Následne sa zistilo, že tento efektorový proteín sa premiestňuje do jadra rastlinnej bunky, kde ovplyvňuje expresiu génov väzbou na promótoxy rastlín. Bol určený "kód", ktorým sa riadi rozpoznávanie promótorov väčšinou efektorov tejto rodiny. Znalosť tohto kódu poskytuje veľký potenciál pre biotechnológiu, napr. prostredníctvom inžinierstva promótorov s políčkami pre efektoxy TAL na riadenie expresie génov rezistencie, alebo umožnením vytvárania vlastných špecifik väzby DNA.

Práca na *Xcc* viedla k identifikácii génov zapojených do biosyntézy xantánu a génového klastra Rpf, ktorý riadi syntézu extracelulárnych enzýmov a xantánu a prispieva k virulencii. Štúdie funkcie produktov génu Rpf viedli k objaveniu signalizačného systému medzi bunkami sprostredkovaného DSF, ktorý bol následne identifikovaný ako cis-nenasýtená mastná kyselina. Rpf gény zapojené do syntézy a vnímania DSF sú zachované u všetkých xantomonád vrátane *Xylella fastidiosa* a *Stenotrophomonas* spp., ktorých niektoré kmene sú nozokomiálnymi patogénmi pre ľudí. Okrem toho signalizácia DSF riadi virulenciu u niektorých, ale nie u všetkých týchto baktérií, hoci presná úloha sa u jednotlivých organizmov líši. RpfG, regulačný proteín zapojený do prenosu signálu DSF, obsahuje doménu histidín-asparágová kyselina-glycín-tyrozín-prolín (HD-GYP). Štúdie na *Xcc* ako prvé stanovili regulačnú funkciu regulátora s HD-GYP doménou a jeho enzymatickú aktivitu ako fosfodiesterázy rozkladajúcej druhého posla cyklický di-guanozínmonofosfát (di-GMP). Tieto pozorovania prispeli k pochopeniu signalizácie cyklického di-GMP v mnohých organizmoch, keďže doména HD-GYP je široko konzervovaná v baktériách vrátane rastlinných, živočíšnych a ľudských patogénov.

### ***Xanthomonas axonopodis***

Rod *Xanthomonas* v súčasnosti zahŕňa 20 druhov vrátane *X. axonopodis*. V rámci *X. axonopodis* bolo definovaných šesť odlišných genomických skupín s mnohými patogénmi spôsobujúcimi hospodársky významné choroby na rôznych agronomicky významných hostiteľských rastlinách.

Maniok (*Manihot esculenta*) je základnou potravinou takmer 600 miliónov ľudí v tropických oblastiach sveta. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) je pôvodcom CBB, závažného ochorenia endemického v tropických a subtropických oblastiach. Táto listová a cievna choroba vážne postihuje produkciu manioku na celom svete. Straty dosahujú 12 % až 100 % úrody aj sadivového materiálu. V posledných rokoch bol v rôznych regiónoch Afriky a Ázie zaznamenaný výrazný opakovaný výskyt tejto choroby. *Xam* vyvoláva širokú kombináciu symptómov vrátane uhlovitých lézií na listoch, škvrnitosti, vädnutia, exsudátov na stonke a rakoviny stonky. Odolnosť hostiteľa je stále najúčinnnejším spôsobom kontroly tejto choroby. Na kontrolu choroby CBB sa však nevyvíja žiadna šľachtiteľská stratégia. Doteraz boli identifikované len dva gény rezistencie manioku voči CBB. Obranné reakcie rastlín na *Xam* boli dobre charakterizované. Genomické nástroje pre maniok, ako napríklad rozsiahla databáza značiek exprimovaných sekvencií (EST) a manioková mikroarray, boli vyvinuté a použité na štúdie expresie *Xam* v rastlinách.

Patogenita *Xam* čiastočne závisí od sekrečného systému typu III, ktorý prenáša efekторы do rastlinných buniek. Silný vplyv na patogenitu *Xam* bol preukázaný v prípade malého počtu efektorov vrátane efektorov podobných transkripčným aktivátorom. V rôznych krajinách Afriky a Južnej Ameriky boli zaznamenané rôzne patotypy *Xam* a štúdie využívajúce metódy DNA fingerprintingu ukázali, že populácie patogénu *Xam* sú variabilné v rámci Afriky, Južnej Ameriky a Ázie, ako aj medzi nimi. V Kolumbii sa preukázala existencia geografickej diferenciácie kmeňov *Xam* v rôznych ekozónach. Výmena kontaminovaného materiálu manioku prispela k migrácii kmeňov a následne ovplyvnila genetickú štruktúru populácií *Xam*. Klimatické zmeny môžu tiež ovplyvniť genetickú diverzitu a štruktúru populácií *Xam*.

*Xam* sa považuje za karanténny organizmus vo všetkých krajinách, ktoré pestujú maniok. Na rýchlu identifikáciu kmeňov *Xam* sa použil jednoduchý a rýchly postup, ktorý sa dá ľahko použiť na certifikáciu rastlinného materiálu.

Nedávno bolo na Univerzite de los Andes (Bogota, Kolumbia) dokončené sekvenovanie genómu *Xam* (kolumbijský kmeň CIO151) a v súčasnosti prebieha anotácia prostredníctvom francúzskeho konzorcia *Xanthomonas*. Prístup k tomuto a ďalším genómom *Xam* by mal otvoriť nové aplikácie pre komparatívnu a funkčnú genomiku *Xam* a urýchliť vývoj nových techník molekulárnej typizácie užitočných pre epidemiologické a fylogenetické štúdie *Xam*, ako aj diagnostických primerov. Na zlepšenie našej schopnosti bojovať proti tejto hospodársky významnej chorobe rastlín je potrebné vykonať ešte veľa práce.

### ***Erwinia amylovora***

*Erwinia amylovora* spôsobuje ohnivku jabloní, hrušiek, dule, ostružín, malín a mnohých voľne rastúcich a pestovaných okrasných rastlín. Choroba sa vyskytuje sporadicky, ale občas je veľmi ničivá, najmä pre mladé ovocné stromy, ktoré môžu byť úplne usmrtené infekciou, ktorá obopína kmeň, alebo podnož. Patogén je rozšírený v oblastiach mierneho pásma, v ktorých sa darí ružovitým rastlinám. Pôvodne bol opísaný ako *Micrococcus amylovorus* a potom ako *Bacillus amylovorus*, pričom sa mylne predpokladalo, že ničí škrob. Je gramnegatívny, tyčinkovitý a pohyblivý s peritrichiálnymi bičikmi. Začiatkom 20. storočia bola premenovaná na *Erwinia amylovora* a zostáva typovým druhom rodu. Blízko príbuzné baktérie, ktoré vyvolávajú symptómy pripomínajúce ohnivku, najmä, ale nie výlučne, na hruškách, boli opísané ako nové druhy, napr. *E. pyrifoliae* a *E. piriflorinigrans*.

*Erwinia amylovora* má pre fytopatológov veľký historický význam, pretože bola prvou baktériou, u ktorej sa jasne preukázalo, že spôsobuje choroby rastlín, krátko po priekopníckej práci Pasteura a Kocha o bakteriálnych patogénoch ľudí a zvierat koncom 19. storočia. Preto sa *E. amylovora* oprávnene označuje za "hlavnú fytopatogénnu baktériu".

Symptómy ohnivej plesne boli prvýkrát zaznamenané v sadoch v blízkosti New Yorku. Odtiaľ sa patogén rozšíril na západ a na ďalšie kontinenty, najmä v 20. storočí. Hoci je *E. amylovora* v súčasnosti rozšírená, naďalej platia prísne karanténne predpisy proti preprave rastlinného materiálu z ruží, ktoré majú zabrániť zavlečeniu *E. amylovora* do oblastí bez výskytu, alebo potenciálne bez výskytu patogénu.

Manažment škvrnitostí je založený na sanitácii, kultúrnych postupoch a používaní obmedzeného počtu baktericídov a biologických kontrolných prípravkov, najmä na boj proti škvrnitosti kvetov. Analýza materiálov testovaných na kontrolu

v posledných rokoch na východe USA dospela k záveru, že napriek viac ako dvom storočiam poznatkov a "obrovskému výskumnému úsiliu zostáva účinná kontrola nepolapiteľným cieľom". Okrem toho streptomycín, ktorý bol zavedený pred viac ako 50 rokmi, zostáva najúčinnším kontrolným materiálom v oblastiach, v ktorých sa vyskytujú citlivé kmene *E. amylovora*. V mnohých oblastiach však prevládajú rezistentné kmene, alebo predpisy zakazujúce používanie antibiotík v rastlinnej výrobe znemožňujú použitie streptomycínu. Vývoj genetickej rezistencie, najmä u podpníkov a podpníkov jabloní, je prísľubom do budúcnosti.

Je zaujímavé, že genóm *E. amylovora* patrí k najmenším spomedzi doteraz sekvenovaných rastlinných patogénnych baktérií, má len 3,89 Mb. Jeho malá veľkosť je v súlade s tým, že nemá nástroje na rozkladanie rastlinných buniek, ktoré sú spoločné pre väčšinu ostatných fytopatogénnych baktérií, napr. enzýmy rozkladajúce bunkovú stenu a nízkomolekulárne toxíny. Zdá sa, že jej najdôležitejšími patologickými nástrojmi sú zložky ostrova patogenity hrp a exopolysacharidy amylovoran a levan. Sekrečné proteíny typu III DspA/E a HrpN sú nevyhnutné pre patogenitu, zatiaľ čo približne 20 ďalších proteínov, ktoré vylučujú, alebo regulujú expresiu proteínov Hrp, tiež zohráva úlohu. Amylovoran a levan sa podieľajú na tvorbe biofilmu a patogenite. Nedávno boli sprístupnené genómy niekoľkých kmeňov a druhov úzko príbuzných s *E. amylovora*. Bioinformatické porovnania nepochybne odhalia ďalšie genetické základy virulencnej schopnosti patogénu spály.

### ***Xylella fastidiosa***

*Xylella fastidiosa* (Xanthomonadales, Xanthomonadaceae) je gramnegatívna, neflagelárna, xylémovo obmedzená a výživná patogénna baktéria, ktorá sa spája s viacerými dôležitými chorobami rastlín vrátane Pierceovej choroby viniča (PD), pestrofarebnej chlorózy citrusov (CVC) a spálenia listov mandlí (ALSD). Ďalšími hostiteľskými druhmi tejto baktérie sú brest, dub, oleander, javor, platan, káva, broskyňa, moruša, slivka, hruška a pekan. V rode existuje len jeden druh, ale rôzne kmene boli dobre charakterizované ako patotypy, pričom boli zaznamenané krížové infekcie medzi rôznymi hostiteľmi a kmeňmi, ale bez rozvoja symptómov ochorenia.

*Xylella fastidiosa* bola prvým fytopatogénom, ktorého genóm bol kompletne sekvenovaný. Veľkosť genómu sa medzi jednotlivými kmeňmi mení od 2475 do 2731 kb a pozostáva z kruhového chromozómu a plazmidov.

*Xylella fastidiosa* nemá sekrečný systém typu III, a preto sa predpokladá, že tento patogén neprenáša efekторы do rastlinných buniek na vyvolanie reakcie hostiteľa. Túto hypotézu podporuje skutočnosť, že v xylémových cievach sa nachádzajú len vlákna a odumreté bunky a patogén sa do tohto tkaniva dostáva prostredníctvom svojho vektora, ostrostrelca (Homoptera, Cicadellidae). *X. fastidiosa* má však aktívne sekrečné systémy typu I a typu II, ktoré by mohli byť spojené s efluxnou pumpou, resp. sekréciou hydrolytických enzýmov, čo umožňuje laterálny pohyb baktérie cez membrány jamiek a trávenie bunkových stien rastlín.

Rozvoj symptómov pri ochoreniach spôsobených baktériou *X. fastidiosa* je úzko spojený so schopnosťou baktérie šíriť sa, kolonizovať a blokovat' xylémové cievy. Kolónie rastú v biofilmoch, ktoré môžu upchať xylémové cievy a obmedziť transport vody a živín. Rôzne virulencie, ktoré vykazujú kmene *X. fastidiosa*, sú často spojené s rozdielmi v ich schopnosti šíriť sa, kolonizovať a blokovat' xylémové cievy. Píly typu I a IV sa podieľajú na pohyblivosti a migrácii a na prichytení a tvorbe biofilmu. Biofilmy

sú pre tento patogén dôležité na prežitie v prostrediach s vysokou turbulenciou, rozdielnym tlakom a slabou dostupnosťou živín, ako sú xylémové cievy a predžalúdky hmyzu.

### ***Dickeya (dadantii and solani)***

V roku 1995 bola *Erwinia chrysanthemi* presunutá do nového rodu *Dickeya* a rozdelená na šesť druhov: *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. zea*, *D. chrysanthemi*, *D. paradisiaca* a *D. dieffenbachiae*. Odvtedy sa ukázalo, že niektoré kmene nepatria do žiadneho z týchto druhov a môžu predstavovať nové druhy, napr. Všetky druhy *Dickeya* spp. spôsobujú hospodársky významné choroby na rôznych hostiteľských rastlinách na celom svete, vrátane 10 jednoklíčnolistových a 16 dvojklíčnolistových čeľadí. *D. dadantii* a "*D. solani*" tu však boli vybrané z dvoch veľmi odlišných dôvodov.

*Dickeya dadantii* spôsobuje ochorenie najmä v tropickom a subtropickom prostredí a má široký okruh hostiteľov vrátane senpólií a zemiakov. Dôvodom jeho zaradenia je skutočnosť, že kmeň *D. dadantii* 3937 (Dda3937) je už viac ako 25 rokov kmeňom *Dickeya*, ktorý sa používa na molekulárne štúdie. Tieto štúdie prispeli k pochopeniu bakteriálnej patogenézy rastlín vrátane úlohy exoenzýmov a katabolizmu cukrov, transportu železa, sekrécie a regulácie, pričom doplnili súvisiace štúdie na iných "mäkkých hnilobných erwíniách" (vrátane *Pectobacterium carotovorum* a *P. atrosepticum*). K ďalším nedávnym oblastiam štúdia patrí obrana rastlín a reakcia patogénu na obranu, patogenéza u kyskavky hrachovej a interakcia medzi fytopatogénmi a ľudskými patogénmi na rastlinách. Dostupnosť sekvencie genómu Dda3937, anotovanej prostredníctvom medzinárodného konzorcia, v kombinácii s funkčnou genomikou a prístupmi systémovej biológie prehľbuje naše poznatky o tomto a príbuzných patogénoch.

Názov "*D. solani*" zatiaľ nebol oficiálne prijatý. Avšak náhly vzostup významu tohto "druhu" v európskej produkcii zemiakov ho robí hodným zaradenia. Tento "druh" bol prvýkrát rozpoznávaný na zemiakoch okolo roku 2005, pravdepodobne prenosom hostiteľa z okrasnej rastliny, a odvtedy sa rozšíril do mnohých oblastí pestovania zemiakov v Európe a mimo nej. Okrem toho sa zdá, že v niektorých regiónoch vytlačil existujúce patogény "mäkkej hniloby", pravdepodobne v dôsledku svojej zvýšenej agresivity a/, alebo spôsobu infekcie. V roku 2010 sa Škótsko stalo prvou krajinou, ktorá zaviedla legislatívu v snahe udržať svoj semenársky priemysel bez tohto patogénu; táto stratégia bola zatiaľ úspešná. *D. solani* spôsobuje choroby pri rôznych teplotách, ktoré sú vhodné pre súčasné európske podnebie, ale v teplejších podmienkach vykazuje aj zvýšenú agresivitu, čo vyvoláva obavy, že zmena klímy by mohla v budúcnosti viesť k zvýšeným problémom s chorobami. O biológii *D. solani* sa vie málo, ale vedci (vrátane tých, ktorí skúmajú Dda3937) spolupracujú na lepšom pochopení biológie tohto patogénu a jeho kontroly.

### ***Pectobacterium carotovorum (a P. atrosepticum)***

*Pectobacterium carotovorum* (*Pcc*) a *Pectobacterium atrosepticum* (*Pca*) boli pôvodne klasifikované ako poddruh *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a poddruh *Erwinia atroseptica*. Tieto druhy (, alebo poddruhy) patrili do skupiny erwínií s mäkkou hnilobou a sú taxonomicky úzko príbuzné s *Erwinia chrysanthemi* (nedávno preklasifikovaná na viacero druhov *Dickeya*).

*Pectobacterium carotovorum* je geograficky široko rozšírená, zatiaľ čo *Pca* je zväčša obmedzená na chladnejšie podnebie. *Pcc* je etiologickým pôvodcom chorôb spôsobených mäkkou hnilobou viacerých plodín a *Pca* má osobitný význam pri komerčne významnej chorobe čiernej nohy zemiakov v oblastiach mierneho pásma. Tieto pektobaktérie mäkkej hniloby boli dôležitými "modelovými" patogénmi v začiatkoch genetickej analýzy fytopatogenézy. Ich taxonomická príbuznosť s *E. coli* (čeleď Enterobacteriaceae) umožnila jednoduchý prenos, alebo vývoj mnohých genetických nástrojov z *E. coli*, ktoré umožňujú molekulárnu analýzu virulencie. Na základe tejto genetickej príťažlivosti sa uskutočnili prvé štúdie o štruktúre a virulencných úlohách enzýmov rozkladajúcich rastlinnú bunkovú stenu (PCWDE); najmä rôznych pektináz, celuláz a proteáz. Rozsiahlo sa skúmala centrálna katabolická cesta degradácie a asimilácie rastlinného pektínu patogénom. Okrem toho analýza úloh PCWDE vo virulencii viedla k objavu systémov vylučovania enzýmov (sekrečné dráhy typu I a typu II) a k zásadnému poznaniu, že systémy vylučovania proteínov fungujú spoločnými mechanizmami v molekulárnej patogenéze rastlinných a živočíšnych patogénov. Toto uznanie spoločných tém u rastlinných a živočíšnych patogénov je v súčasnosti všeobecne rozšírené.

Okrem úlohy syntézy a sekrécie PCWDE vo virulencii analýza mechanizmov regulácie PCWDE u *Pcc* odhalila fenomén "quorum sensing", prostredníctvom ktorého patogén riadi tvorbu determinantov virulencie v závislosti od hustoty bakteriálnej populácie. Zásadný význam quorum-sensingu pektobakteriálnej patogenézy potvrdili štúdie na geneticky modifikovaných rastlinách. Kontrola faktorov virulencie v závislosti od hustoty, modulovaná voľne difúznymi medzibunkovými signálnymi molekulami N-acyl homoserín laktónu, je v súčasnosti dobre známou vlastnosťou rôznych rastlinných a živočíšnych patogénov. Okrem toho sa ukázalo, že *Pcc* ako jedna z prvých baktérií produkuje kyselinu 1-karbafen-2-em-3-karboxylovú, ktorá patrí do triedy karbapenémových  $\beta$ -laktámových antibiotík, a produkcia tohto antibiotika je regulovaná spolu s faktormi virulencie PCWDE prostredníctvom quorum sensing. Transkriptomické štúdie in planta ukázali, že quorum sensing zohráva počas infekcie rastlín zásadnú úlohu pri kontrole niekoľkých stoviek génov kódujúcich rôzne produkty ovplyvňujúce fyziológiu patogenézy rastlín. Tieto gény kódujú vlastnosti, ako sú viaceré dráhy sekrécie proteínov (vrátane strojov typu II, III, IV a VI), produkcia sekundárnych metabolitov a zaujímavý výber proteínov s neznámou funkciou. Štúdie o regulácii PCWDE tiež preukázali kľúčovú úlohu posttranskripcnej kontroly génovej expresie prostredníctvom systému RsmAB, ďalšieho regulačného systému, ktorý sa preukázal aj u iných rastlinných a živočíšnych patogénov

*Pectobacterium atrosepticum* bol prvým enterobakteriálnym fytopatogénom, ktorý bol genomicky sekvenovaný, čo v tom čase odhalilo rôzne neočakávané predpokladané vlastnosti patogénu vrátane vlastníctva sekrečných mechanizmov typu IV a VI, produkcie nových sekundárnych metabolitov toxínov a schopnosti fixácie dusíka. Okrem toho sekvencia genómu poukázala na fascinujúce evolučné vzťahy medzi týmto enterobakteriálnym rastlinným patogénom a taxonomicky príbuznými živočíšnymi patogénmi. Predovšetkým sa ukázalo, že *Pca* nesie sériu genomických ostrovov, z ktorých niektoré sú zjavnými lokusmi virulencie, a gény ekologickej adaptácie získané horizontálnym prenosom. Genomické informácie sú teraz k dispozícii pre kmene *Pcc* a iné "bývalé druhy *Erwinia*", ktoré sú teraz preradené do rodu *Dickeya*.

Ekologické štúdie *Pcc* (a *Pca*) boli klasicky fenomenologické. Nedávne štúdie však ukázali dôležitú úlohu špecifických proteínov pri možnom ekologickom šírení *Pcc* hmyzími vektormi, ako je napríklad *Drosophila*. Je zaujímavé, že z tejto interakcie s fytopatogénom profituje aj mucha prostredníctvom stimulácie vrodeneho imunitného systému hmyzu.

Napokon, okrem ich vplyvu na poľnohospodárstvo by sme nemali ignorovať dlhodobý translačný význam *Pectobacterium* spp. Napríklad periplazmatická l-asparagináza z mäkkých hnilobných *Pcc* sa klinicky používa pri liečbe akútnych lymfocytárnych leukémií a v minulosti sa niektoré príbuzné rekombinantné *Erwinia* spp. považovali za možné nástroje na biotechnologickú výrobu vitamínu C.

## 2.2 Hubové patogény rastlín

Na prvom mieste je huba *Magnaporthe oryzae*, ktorá môže mať ničivé účinky, pretože viac ako polovica svetovej populácie sa spolieha na ryžu ako hlavný zdroj kalórií; mnohí však tiež zdôraznili, ako sa tento patogén vyvinul v modelový systém na štúdium interakcií medzi rastlinami a patogénmi. *Botrytis cinerea*, ktorá sa umiestnila na druhom mieste, má jednoznačne vplyv v mnohých oblastiach kvôli širokému spektru hostiteľov a spôsobuje vážne škody pred zberom aj po ňom. *Puccinia* spp., spôsobuje tri rôzne choroby hrdz, ktoré napádajú pšenicu a spolu sú zoskupené na treťom mieste. Na štvrtom a piatom mieste sú dva druhy *Fusarium*, ale s kontrastnými hostiteľskými oblasťami, pričom *F. graminearum* spôsobuje významné škody prevažne na obilninách a niekoľkých neobilných druhoch a *F. oxysporum* má širokú hostiteľskú oblasť, s vážnymi stratami na tak rozmanitých plodinách, ako sú rajčiaky, bavlna a banány. Patogény obilnín však majú naďalej významné zastúpenie, pričom *Blumeria graminis* je na šiestom mieste a *Mycosphaerella graminicola* na siedmom. *Colletotrichum* spp., na ôsmom mieste, sú členmi významného rodu rastlinných patogénov, ktorých taxonómia sa môže označovať ako premenlivá. Navrhovaný počet druhov v rámci rodu sa pohybuje od 29 do viac ako 700 v závislosti od taxonomickej interpretácie. *Colletotrichum* spp. dlho slúžili ako modelový systém pre hemibiotrofné patogény s krátkou biotrofnou fázou, po ktorej nasleduje prechod k rozvetveniu tkanív a nekrotrofnému vývoju. Je zaujímavé, že *Ustilago maydis* a *Melampsora lini* tvoria deviatu a desiatu pozíciu. Obe sú v súčasnosti vyvinuté ako modelové systémy, ktoré sú ľahko sledovateľné a poskytujú dôležité poznatky o molekulárnej podstate rastlinnej imunity a infekčných procesov.

### ***Magnaporthe oryzae***

*Magnaporthe oryzae*, vláknitá askomycétna huba, ktorá je pôvodcom choroby ryže, najničivejšieho ochorenia ryže na svete. Jej význam podčiarkuje skutočnosť, že približne polovica svetovej populácie je odkázaná na ryžu ako základný kalorický príjem. Infekciu podliehajú všetky listové pletivá, avšak infekcia metliny môže viesť k úplnej strate zrna. Typické sú straty vo výške 10 – 30 %, hoci regionálne epidémie môžu byť ničivé. Okrem toho je táto huba veľmi ľahko ovplyvniteľná genetickou a molekulárno-genetickou manipuláciou. Preto sa *M. oryzae* vďaka svojmu agronomickému významu a sledovateľnosti stala významným modelom pri štúdiu interakcií medzi hostiteľom a hubovým patogénom. Hoci rezistencia hostiteľa je ekonomicky najvýhodnejším a environmentálne najšetrnejším postupom na zvládnutie



tejto choroby, huba rýchlo prekonáva rezistenciu voči blastom a kultivary sa zvyčajne stávajú neúčinnými v priebehu 2 – 3 rokov. *Magnaporthe oryzae* je súčasťou komplexu druhov, ktoré môžu spôsobovať ochorenia na rôznych trávach a príbuzných druhoch vrátane plodín, ako je jačmeň, pšenica a proso. V Južnej Amerike sa objavili nové kmene pšenice, čo zvyšuje obavy, že táto huba predstavuje vážnu hrozbu pre celosvetovú produkciu pšenice. Poznanie biológie, genetickej rozmanitosti a prispôsobivosti tohto patogénu je kľúčové pre vývoj nových a trvalých stratégií na zvládnutie tejto a príbuzných ničivých hubových chorôb.

Objavenie Guy11, plodného kmeňa Mat1-2 z Francúzskej Guyany, pred viac ako 20 rokmi podnietilo prudký nárast vedeckého záujmu o tento patogén ryže. Možnosť vykonávať genetické analýzy viedla ku klonovaniu a charakterizácii niekoľkých génov pre hostiteľskú a kultivarovú špecifickosť. V súčasnosti sa veľké úsilie zameriava na klonovanie a charakterizáciu mnohých génov avirulencie a zodpovedajúcich génov rezistencie voči ryži, ktoré boli geneticky identifikované. Vývoj genetických markerov, ako sú MAGGY, MGR583 a MGR586, z repetitívnych prvkov poskytol prostriedky nielen na vytvorenie cenných genetických máp pre *M. oryzae*, ale aj molekulárne nástroje na hodnotenie populačnej diverzity a evolúcie línií, čo sú cenné poznatky pre šľachtenie a včasné uvoľnenie rezistentných odrôd.

Rané štádiá infekcie boli u *M. oryzae* podrobne preskúmané. Podobne ako mnohé iné hubové rastlinné patogény, aj *M. oryzae* vytvára apresórium, špecializovanú infekčnú bunku. Na infekciu je potrebný primeraný vývoj tejto bunky; niekoľko účinných fungicídov, ako napríklad tricyklazol, ktoré inhibujú melanizáciu apresória, blokuje prenikanie do hostiteľa. Schopnosť indukovať apresórium ex planta a vykonávať funkčné analýzy génov cieľným vyradením génov umožnila získať prístup k mnohým základným molekulárnym procesom. Získali sa značné poznatky o vnímaní environmentálnych signálov, reakciách na hladovanie, signálnych dráhach buniek, vytváraní turgorového tlaku, recyklácii bunkového obsahu (autofágia) a kontrolných bodoch bunkového cyklu, ktoré regulujú a riadia vývoj tejto špecializovanej bunky.

Za posledných šesť rokov po zverejnení sekvencie genómu kmeňa 7 – 15 (derivát kmeňa Guy11) sa výrazne rozšírili genomické zdroje pre *M. oryzae* a príbuzné druhy a v súčasnosti zahŕňajú viac ako 30 genómov z kmeňov z celého sveta, ako aj rôzne súbory transkriptómových údajov a vznikajúce súbory proteómových údajov. Skoré preskúmanie týchto údajov odhalilo dramatické rozdiely v obsahu génov a organizácii repetitívnych prvkov. Ďalšie štúdie odhalili základné poznatky o obrane hostiteľa a mechanizmoch umlčovania génov. S nástupom nových technológií sekvenovania sa štúdie populačnej biológie a fylogenomické analýzy *M. oryzae* môžu v blízkej budúcnosti výrazne rozšíriť a poskytnúť hlboký pohľad do evolúcie fytopatogenézy.

### ***Botrytis cinerea***

*Botrytis cinerea* Persoon, známa ako pleseň sivá, môže infikovať viac ako 200 druhov rastlín. Táto huba sa považuje za typického nekrotrófa, ktorý na dosiahnutie infekcie kooptuje dráhy programovanej bunkovej smrti hostiteľa. V sekvenciách genómu dvoch kmeňov *B. cinerea* sa nepodarilo identifikovať "silver bullets", jedinečné znaky, ktoré ju odlišujú od iných patogénnych a nepatogénnych húb. Dostupnosť sekvencie genómu a rôznych molekulárných nástrojov prispeli k tomu, že *B. cinerea*

je najrozsiahlejšie študovaným nekrotrofným hubovým patogénom. Tieto štúdie významne posunuli naše chápanie infekčných stratégií *B. cinerea*, avšak len veľmi málo absolútne zásadných determinantov virulencie bolo identifikovaných pomocou prístupov kandidátskych génov.

*Botrytis cinerea* je najničivejšia na zreľých, alebo starnúcich tkanivách dvojkľúčolistových hostiteľov. Keď sa zmení fyziológia hostiteľa a prostredie je pre ňu priaznivé, táto huba niekedy zostáva dlhší čas v pokoji, než začne hniť tkanivá. K napadnutiu môže dôjsť od štádia semenáčikov až po dozrievanie produktov. Po zbere zdanlivo zdravých plodín môže dôjsť k vážnym škodám. Zobierané komodity sa môžu pokaziť v maloobchodnom reťazci, počas skladovania, prepravy na vzdialené trhy, alebo počas vystavovania v maloobchode.

Náklady na škody spôsobené *Botrytis* je veľmi ťažké odhadnúť, pretože hostiteľské spektrum je široké. Náklady sú rozptýlené, pretože k poškodeniu *Botrytis* dochádza v rôznych fázach výrobného a maloobchodného reťazca. Nie sú k dispozícii žiadne spoľahlivé údaje o škodách spôsobených *Botrytis* počas pestovania plodín, ale musia byť obrovské. Napriek čoraz účinnejšiemu uplatňovaniu biologickej kontroly v niektorých plodinách zostáva aplikácia fungicídov bežnou metódou kontroly *Botrytis*. Priemerné náklady na chemickú kontrolu *Botrytis* (všetky plodiny, všetky krajiny) sú približne 40 ha. Náklady na fungicídy špecificky zamerané proti *Botrytis* ("botryticidy") predstavujú 540 miliónov EUR, čo predstavuje 10 % svetového trhu s fungicídmi. Segment vína a stolového hrozna predstavuje 50 % hodnoty celkového trhu s botryticídmi, pričom solanínová zelenina, tekvice, jahody a okrasné rastliny tvoria 5 až 9 %. Náklady na širokospektrálne fungicídy účinné aj proti *B. cinerea* nie sú známe. Rezistencia voči fungicídom je čoraz problematickejšou otázkou, keďže značná časť populácie húb je odolná voči fungicídom. Bola zaznamenaná viacnásobná rezistencia, ktorá je väčšinou spôsobená zvýšenou expresiou génov ABC transportéra.

V Austrálii, Čile a Južnej Afrike sú hlavnou príčinou zníženia zisku výdavky na kontrolu hniloby *Botrytis*. Odhady pre ostatné krajiny sa nepodarilo získať. Tieto výdavky zahŕňajú prevažne chemikálie, ale nezahŕňajú straty spôsobené nedostatočným ošetrovaním (ekologické poľnohospodárstvo, poľnohospodárstvo s nízkymi vstupmi), neúspešným ošetrovaním (rezistencia voči fungicídom), alebo stratou kvality (množstvo fungicídov presahujúce vývozné požiadavky; kvalita hrozna nedostatočná pre vysokokvalitné vína).

Približne 15 – 20 % zväzkov ruží a gerber, s ktorými sa obchodovalo na holandských kvetinových aukciách, obsahovalo zistiteľnú infekciu *Botrytis*, čo viedlo k skráteniu životnosti takýchto zväzkov vo váze o 3 dni. Strata príjmov len pre pestovateľov ruží sa odhaduje na 1,3 milióna EUR. Tieto údaje nezahŕňajú kvety, ktoré boli infikované pred zberom a nedostali sa na aukciu, ani kvety, ktoré sa pokazili počas prepravy k maloobchodníkom a stali sa nepredajnými. Skrátenie trvanlivosti (ovocie), alebo životnosti vo váze (kvety) je vážnym problémom kvality. Spotrebitelia pociťujú ekonomické straty, keď plody zhnijú skôr, ako sa skonsumujú, alebo keď ruže nevydržia uspokojivo dlho. Z ekonomického hľadiska sa strata, ktorú pociťujú spotrebitelia, často neberie do úvahy, pretože výrobcovia a maloobchodníci získali príjem. Nespokojní zákazníci však môžu niekoľko týždňov upustiť od ďalšieho nákupu výrobku, čo je účinok, ktorý sa ťažko zahŕňa do odhadov hospodárskych strát. Oficiálne údaje o nákladoch na sivú pleseň na mäkkom a okrasnom ovocí sa preto musia považovať za podhodnotené.

*Botrytis cinerea* je výnimočný patogén, pretože môže byť občas prospešný. Za špecifických klimatických podmienok môže *B. cinerea* spôsobiť ušľachtilú hnilobu bobúľ hrozna, ktoré sa používajú na výrobu sladkých vín (Sauternes, Tokaj). Najprestížnejšie vína z botrytídy sa predávajú za ceny do 500 € za fľašu. Napriek tomu je celkový vplyv *B. cinerea* negatívny, a to aj vo vinárskom priemysle.

Celkové celosvetové výdavky na kontrolu *Botrytis* (kultivačné opatrenia, botryticídy, širokospektrálne fungicídy, biokontrola) ľahko prekročia 1 miliardu EUR ročne. Vplyvy strát výrobkov, ku ktorým dochádza napriek kontrole choroby, a straty kvality počas maloobchodného reťazca sú pravdepodobne oveľa vyššie.

### ***Puccinia* spp.**

Na pšenici sa vyskytujú tri choroby, a to hrdza (čierna) stonková (spôsobená *Puccinia graminis* f. spp. *tritici*) (*Pgt*), hrdza (žltá) plevová (*P. striiformis* f. spp. *tritici*) (*Pst*) a hrdza (hnedá) listová (*P. triticina*) (*Pt*). K ničivému potenciálu týchto hrdzí prispieva ich plodná sporulácia, účinné šírenie, patogénna variabilita a rozšírené pestovanie pšenice, často v priaznivom prostredí. Z historického hľadiska bola najznámejšia hrdza stonková, ktorá poškodzuje úrodu pšenice. Tejto choroby sa obávali už v starovekom Ríme, kde sa vykonávali rituály ("Robigalia") na záchranu úrody pred hrdzou.

*Pgt*, *Pst* a *Pt* sú obligátne, biotrofné bazídiomycétne huby s makrocyclickým, heteroidným životným cyklom. Obligátne biotrofné huby diferencujú špecializované infekčné štruktúry, účinne potláčajú obranné reakcie hostiteľa a získavajú živiny tvorbou špecializovaných živných štruktúr, nazývaných haustória, ktoré sa nachádzajú vo vnútri rastlinných buniek.

Stonková hrdza sa často rozmnožuje opakovaním urediniálnych štádií na pšenici obyčajnej a tvrdej, jačmeni a tritikale. Bazídiospóry však môžu infikovať alternatívne hostiteľské rastliny, ako je *Berberis vulgaris*, a tak poskytnúť primárne inokulum pre pšenicu a nové kombinácie virulencie v dôsledku pohlavného prerozdelenia génov.

K významným a opakovaným neúspechom úrody spôsobeným hrdzami došlo v Severnej Amerike v rokoch 1904 až 1962. Závažné epidémie sa vyskytli aj v Európe a Číne, menej často sa vyskytovali vo východnej Európe, Indii, Austrálii, Mexiku, Čile, Etiópii a Južnej Afrike. V mnohých prípadoch došlo k prenosu spór vetrom, čím sa vytvorili nové línie. V poslednom čase sa silné a rozsiahle epidémie hrdzí pripisujú novým a agresívnejším variantom prispôbeným teplejšiemu prostrediu. Objasnenie kompletného životného cyklu *Pst* a sekvencie genómu tohto patogénu sú významným krokom k lepšiemu pochopeniu virulencie, a tým aj k šľachteniu na trvalú odolnosť.

Prvé epidémie stonkovej hrdze iniciovali štúdie o patogénnej variabilite, epidemiológii a genetike hostiteľa a patogénu v *Pgt*. Špecializácia *Pgt* na rôzne varianty mala veľký vplyv na šľachtenie a produkciu pšenice. Mnohé odrody chránené jednotlivými génmi sa stali náchylnými na hrdzu stonkovú, často s ničivými účinkami "boom-and-bust".

Výskyt rasy Ug99 *Pgt* vo východnej Afrike s virulenciou pre Sr31, bežne používaný gén rezistencie, obnovil výskum stonkovej hrdze. V rámci línie Ug99 bolo zaznamenaných sedem variantov, ktoré sa líšia virulenciou pre Sr21, Sr24, Sr31 a Sr36. V dôsledku svojej adaptačnej schopnosti, zdatnosti a vlastností virulencie

(90 % svetovej pšenice je náchylných) bola skupina rás Ug99 uznaná za hlavnú hrozbu pre potravinovú bezpečnosť.

Spolu s pokrokom v detekcii, genetickom mapovaní a riadení génov a lokusov kvantitatívnych znakov (QTL) poskytujúcich rezistenciu voči Ug99 sa dosiahol významný pokrok v pochopení molekulárneho základu patogenity *Pgt*. Pokračujúci výskum v oblasti sledovania a analýzy rás spolu s genomikou patogénov umožní objavenie, charakterizáciu a využitie udržateľných stratégií riadenia odolnosti. Uvoľnenie a prijatie široko adaptovaných rezistentných odrôd je nevyhnutné pre budúcu a účinnú kontrolu hrdze na celom svete.

### ***Fusarium graminearum***

Askomycéta *Fusarium graminearum* (teleomorf *Gibberella zeae*), ktorá patrí do radu Hypocreales, je vysoko deštruktívny patogén všetkých druhov obilnín. Lokálne *F. graminearum* koexistuje a spoluinfikuje s inými druhmi *Fusarium*. Najväčšie hospodárske straty vznikajú pri infekcii kvetných tkanív. Toto ochorenie znižuje najmä kvalitu zrna, nie úrodu, a jeho výsledkom je zrnko kontaminované mykotoxínmi. Vo všetkých hlavných regiónoch pestovania obilnín na celom svete bol zaznamenaný opätovný výskyt epidémií fuzárií. Ak sa infikované zrnko obilnín skladuje, alebo prepravuje pri príliš vysokej vlhkosti, dochádza v období po zbere k rastu huby a zvyšuje sa obsah mykotoxínov.

Zrnko kontaminované mykotoxínmi je často nebezpečné pre ľudskú spotrebu, krmivo pre zvieratá, alebo na sladovnícke účely. V Európe, USA a iných regiónoch boli zavedené prísne horné limity pre špecifické hladiny mykotoxínov v obilí a potravinách. *Fusarium graminearum* produkuje niekoľko trichotecénových mykotoxínov, z ktorých najdôležitejšie sú deoxynivalenol (DON), acetylované deriváty DON, nivalenol a fytoestrogén zearalenón. DON sa viaže na peptidyltransferázový proteín v ribozóme a inhibuje transláciu proteínov. Rôzne prírodné izoláty (označované ako chemotypy) produkujú rôzne typy mykotoxínov.

Kontrola fuzáriových infekcií kvetov je naďalej problematická. U väčšiny druhov obilnín sú identifikované zdroje rezistencie len čiastočne účinné a sú založené hlavne na QTL. Niektoré azolové fungicídy sú mierne účinné, ale pokrytie postrekom a načasovanie aplikácií zostáva zložitým. Minimalizácia po sebe nasledujúcich plodín obilnín a zaorávanie pod akýmkoľvek infikovanými zvyškami zostáva najlepšou metódou na zníženie tlaku choroby na miestnej úrovni. Čoraz častejšie sa objavujú správy o infekcii *Fusarium graminearum* v iných druhoch plodín v striedaní, napr. v sóji a cukrovej repe.

V súčasnosti existujú vynikajúce genetické, biochemické, molekulárno-genetické, genomické, transkriptomické zdroje a zdroje zbierok izolátov *F. graminearum*. Genóm neobsahuje repetitívne sekvencie a obsahuje nízku úroveň duplikovaných génov, ale medzi kmeňmi existuje vysoká úroveň polymorfizmu. Po zarovnaní na genetickú mapu sa rozpozná "dvojrychlostný" genóm s diskretnými oblasťami s vysokou rekombináciou a vysokým počtom jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), ktoré sa nachádzajú v blízkosti telomér a v strede štyroch veľkých chromozómov. Porovnanie so sekvenovanými genómami *F. verticillioides* a *F. oxysporum* f. spp. *lycopersici* naznačuje, že miesta s vysokou diverzitou v genóme *F. graminearum* boli výsledkom udalostí fúzie chromozómov predkov.

Priama náhrada génu záujmu selektovateľným markerom prostredníctvom homologickej rekombinácie je v súčasnosti pomerne jednoduchá. Produkcia mykotoxínu DON prispieva k vzniku ochorenia na kvetnom tkanive pšenice. V neprítomnosti DON sa aktivuje silná obranná reakcia hostiteľa v pletive a kolonizácia hyfami je obmedzená na kvetenstvo. Syntéza DON je prísne regulovaná najmenej tromi transkripčnými faktormi: TRI6, TRI10 a TRI15. V súčasnosti je známych ďalších 160 faktorov patogenity/virulencie, ktoré prispievajú k infekcii kvetov obilnín, pričom väčšina z nich funguje po penetrácii.

Nedávne opätovné skúmanie biológie procesu infekcie kvetov pšenice odhalilo, že existuje značná fáza bezpríznakovej infekcie, v ktorej hýfy postupujú extracelulárne medzi živými bunkami hostiteľa. Vysoká expresia génov TRI sa zisťuje na postupujúcej fronte a potom sa znižuje. Hostiteľské bunky odumierajú až pri intracelulárnej invázii hýf a rozsiahla degradácia bunkových stien rastlín je relatívne neskorý proces. Tieto zistenia naznačujú, že *F. graminearum* využíva skrytý prístup na uľahčenie úspešných kvetných infekcií.

### ***Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum* Schlecht. je všadeprítomný pôdny patogén, ktorý spôsobuje vädnutie ciev širokého spektra rastlín. Medzi charakteristické príznaky choroby patrí hnednutie ciev, epinastia listov, zakrpatenie, postupné vädnutie, defoliácia a odumieranie rastlín. Komplex druhov *F. oxysporum* zahŕňa rôzne formy (f. spp.), ktoré spoločne infikujú viac ako 100 rôznych hostiteľov a vyvolávajú vážne straty na plodinách, ako sú okrem iného melón, rajčiak, bavlna a banán. *Fusarium oxysporum* je tiež novým patogénom ľudí, ktorý môže spôsobiť invazívne infekcie u pacientov s oslabenou imunitou.

Na rozdiel od pozoruhodne širokého hostiteľského spektra na úrovni druhov spôsobujú jednotlivé izoláty *F. oxysporum* ochorenie len na jednom, alebo niekoľkých druhoch rastlín. Táto dichotómia fascinovala a zároveň májala celé generácie rastlinných patológov. Fylogenetické štúdie naznačujú, že rôzne izoláty danej formy specialis, ktoré infikujú tú istú hostiteľskú rastlinu, vznikli počas evolúcie nezávisle. Keďže *F. oxysporum* nemá známy pohlavný cyklus, mechanizmus, ktorým tieto nové patogénne línie vznikli v inak odlišných genetických prostrediach, zostával dlho nepochopiteľný. Analýza kompletnej sekvencie genómu patogénnej formy rajčiaka *F. oxysporum* f. spp. *lycopersici* (*Fol*) nedávno odhalila prítomnosť genomických oblastí špecifických pre líniu (LS), vrátane štyroch celých chromozómov, ktoré sa nenachádzajú u iných druhov *Fusarium*, ako sú napríklad patogény obilnín *F. graminearum* a *F. verticillioides*. Prenos dvoch LS chromozómov z *Fol* do nepatogénneho izolátu mu umožnil spôsobiť ochorenie na rastlinách rajčiaka. To naznačuje, že horizontálny prenos malých chromozómov by mohol byť príčinou vzniku nových patogénnych línií. Sekvencie genómu z ďalších izolátov *F. oxysporum* poskytnú neoceniteľné nástroje na ďalšie skúmanie tejto hypotézy.

Dominantné gény rezistencie rastlín (R) voči rôznym *F. oxysporum* boli identifikované u viacerých plodín. Interakcia medzi rajčiakom a *Fol* bola použitá na štúdium molekulárneho základu rezistencie a náchylnosti na chorobu. Tieto štúdie viedli k identifikácii klasického systému gén za gén s najmenej tromi génmi avirulencie húb, z ktorých niektoré môžu fungovať ako elicitory aj supresory rastlinnej imunity založenej na génoch R.

Neobvyklá schopnosť jediného izolátu *Fo1* spôsobovať ochorenia na rastlinách rajčiakov aj na myšiach s oslabenou imunitou poskytuje jedinečný model na štúdium trans-kingdomálnej patogenity húb. Genetická analýza s použitím cielených mutantov odhalila, že signálne komponenty, ktoré sú nevyhnutné pre infekciu rastlín rajčiaka, ako napríklad mitogénom aktivovaná proteínkináza (MAPK), alebo malý G-proteín, sú pre virulenciu u myší nepotrebné. Iné, ako napríklad transkripčný faktor PacC, ktorý reaguje na pH, sú potrebné na virulenciu v myšom modeli, ale nie v rastlinách. Tieto výsledky naznačujú, že *F. oxysporum* využíva zásadne odlišné stratégie infekcie rastlín a cicavcov. Ďalšie štúdie sa zaoberajú prítomnosťou spoločných mechanizmov virulencie, ktoré sú potrebné na oboch typoch hostiteľov.

Nedávne pokroky smerom k pochopeniu genetického základu patogenity u *F. oxysporum* zahŕňajú skríniny inzerčnej mutagenézy v celom genóme, ktoré okrem iného viedli k objaveniu hlavného regulátora patogénneho vývoja, identifikácii konzervovanej dráhy dusíkovej odpovede regulujúcej invazívne rastové funkcie a charakterizácii nového transmembránového senzora mucínového typu. Budúce štúdie v systéme *F. oxysporum* budú naďalej prinášať nové poznatky o molekulárnych mechanizmoch patogénnosti húb.

### ***Blumeria graminis***

*Blumeria graminis* je askomycéta patriaca do radu Erysiphales. Spôsobuje múčnatku trávovú a napadá pšenicu a jačmeň, ktoré patria medzi hlavné poľnohospodárske plodiny na celom svete. Plesňové infekcie obilnín znižujú úrodu zrna a musia sa kontrolovať, aby sa zabezpečila ekonomická rentabilita produktu. Kontrola sa dosahuje nasadením fungicídov a odrôd rastlín odolných voči chorobám. Tieto kontrolné opatrenia je potrebné neustále revidovať, aktualizovať a rozvíjať z dôvodu vzniku rezistencie voči fungicídom, meniacich sa regulačných obmedzení a vývoja kmeňov plesní schopných prekonať rezistenciu hostiteľa.

Huby radu Erysiphales vykazujú širokú škálu hostiteľských špecifik, od širokej polyfágie pozorovanej u mnohých dvojkľúčolistových plesní až po extrémne úzke hostiteľské spektrum *B. graminis*, kde „formae speciales“ *tritici* a *hordei* môžu infikovať len pšenicu, resp. jačmeň. Iné Erysiphales spôsobujú plesne, ktoré postihujú mnohé iné vysokohodnotné ovocie a zeleninu vrátane rajčiakov, uhoriek, hrozna a jahôd. Ich biológia, etiológia a patológia sú vo všeobecnosti podobné ako u plesní obilnín. Všetky múčnatky sú striktné obligátne biotrofné patogény: sú absolútne závislé od živej hostiteľskej rastliny.

Epidémie sú spôsobené rýchlym sledom asexuálnych cyklov, ktoré začínajú prístátím konídií prenášaných vzduchom na povrchu hostiteľa. V priebehu niekoľkých minút konídie vyklíčia. *Blumeria* na rozdiel od iných plesní vytvára najprv krátku primárnu zárodočnú trubicu určenú na snímanie povrchu. Po niekoľkých hodinách sa z konídie vyvinie sekundárna zárodočná trubica, ktorá sa septuje a diferencuje na predĺžené, háčikové apresórium, z ktorého cez kutikulu a epidermálnu bunkovú stenu hostiteľa preniká kolík. Z kolíka sa vyvinie komplexné multidigitálne haustórium obklopené perihauustoriálnou matrix a špecializovanou membránou hostiteľa. Podobne ako u iných obligátnych biotrofných patogénov je haustórium určené na výživu a kontrolu imunity a metabolizmu hostiteľa. Živiny pochádzajúce z rastlín sa prenášajú do hýf rastúcich na povrchu rastliny. Do 3 dní od inokulácie sa zo špecializovaných buniek stielky vyvinú konídiofóry, ktoré produkujú masy konídií: rovnomenný "prášok"

týchto plesní. Na konci vegetačného obdobia hostiteľa sa kompatibilné kmene spájajú a vytvárajú chasmotécie, ktoré slúžia aj ako oddychové štruktúry na prežitie nepriaznivých podmienok.

Genómy jačmeňa a iných múčnatiek majú veľkosť >120 Mb, t. j. sú oveľa väčšie ako genómy príbuzných Ascomycota. Je to spôsobené mimoriadnym rozšírením retrotranspozónov. Rozšírenie genómu je na jednej strane sprevádzané čiastočnou stratou génov zapojených do sekundárneho metabolizmu, degradácie sacharidov a príjmu dusičnanov a na druhej strane masívnym rozšírením génov, o ktorých sa predpokladá, že kódujú proteínové efekторы. V súčasnosti sú známe dve triedy efektorov: EKA efekторы paralogické s génmi Avr1 a Avra10, ktoré sú úzko spojené s retrotranspozónmi, a konvenčnejšie malé vylučované proteíny, ktoré sú ďalej charakterizované ako vysoko špecifické pre jednotlivé línie.

Význam *B. graminis* teda vyplýva z jeho pretrvávajúcej a ústrednej úlohy pôvodcu ochorení významných obilnín a z toho, že je modelom na štúdium iných plesní a iných obligátnych biotrofných patogénov.

### ***Mycosphaerella graminicola***

Askomycéta *Mycosphaerella graminicola* (anamorfa *Septoria tritici*) patrí do radu *Dothideales* a spôsobuje chorobu pšenice *Septoria tritici* blotch (STB). Táto choroba je hlavným ekonomickým obmedzením produktivity pšenice, najmä v oblastiach s miernym podnebí. Infekcia pšenice *Mycosphaerella graminicola* sa začína rozšírením hýf na povrchu listov a preniknutím cez prieduchy bez diferenciácie apresória. Potom nasleduje dlhé obdobie bezpríznakovej medzibunkovej kolonizácie (> 7 dní), ktoré vrcholí tvorbou nekrotických lézií na listoch, v ktorých *M. graminicola* nepohlavne sporuluje. Táto posledná fáza zahŕňa prechod na nekrotrofnú výživu.

*Mycosphaerella graminicola* je osvedčeným modelovým organizmom na štúdium populačnej dynamiky a evolúcie patogénov. Dlhodobé súbory údajov (od roku 1843 do roku 2003) preukázali, že STB je ovplyvňovaná klimatickými zmenami vrátane zmien súvisiacich s priemyselnou revolúciou. Uvádza sa tiež, že až 90 % globálnej genetickej variability tejto huby sa môže vyskytovať v rámci jedného infikovaného pšeničného poľa. Takáto úroveň genetickej diverzity vyplýva z heterotalitného pohlavného rozmnožovacieho systému a tvorby askospór, ktoré každú sezónu iniciujú epidémie. Veľká časť ekonomických nákladov spôsobených *My. graminicola* vzniká nepriamo v dôsledku jej rýchlej evolúcie ako reakcie na selektívne tlaky vrátane odrôd pšenice odolných voči chorobám a trvalého používania fungicídov. Príkladom je rýchlosť, s akou sa v poľných populáciách *My. graminicola* vyvinula a rozšírila genetická mutácia poskytujúca rezistenciu voči strobilurínovej triede fungicídov, a rýchla evolúcia cieľového proteínu CYP51 ako reakcia na široké používanie určitých azolových fungicídov.

*Mycosphaerella graminicola* bola tiež predmetom intenzívnych genetických a genomických analýz. Nedávno boli publikované sekvencie genómu modelového izolátu spolu s príbuznými genómami získanými z divo rastúcich tráv. Tieto štúdie poukázali na existenciu 21 chromozómov, z ktorých osem najmenších je pre infekciu rastlín nepotrebných a líšia sa počtom a štruktúrou medzi jednotlivými izolátmi. To predstavuje najväčší počet doteraz zaznamenaných nepotrebných chromozómov u húb. Funkčná genomická analýza procesu infekcie rastlín identifikovala množstvo génov dôležitých pre signalizáciu prechodov k hyfálnemu rastu a prenikaniu do stomat.

Následná postpenetračná skrytá patogenéza je podporovaná redukovaným súborom génov pre enzýmy rozkladajúce bunkovú stenu a vysokou úrovňou expície vylučovaných efektorových proteínov, ktoré potláčajú aktiváciu obranných mechanizmov rastlín. Toto počiatkové vyhybanie sa obrane rastlín odráža mechanizmus typický skôr pre obligátne biotrofy. Nasleduje však akútna aktivácia obranných mechanizmov rastlín, ktorá zahŕňa smrť hostiteľských buniek, keď huba prejde na nekrotrofnú kolonizáciu. To predstavuje zaujímavý mechanizmus pre budúcu analýzu, ktorý zahŕňa počiatkový "úskok", po ktorom nasleduje následný "únos" signalizácie obrany rastlín, ktorý môžu zdieľať aj iní členovia rodu *Mycosphaerella*, ktorý zahŕňa najväčší počet rastlín-patogénnych húb.

### ***Colletotrichum* spp.**

*Colletotrichum* je jedným z najrozšírenejších a najdôležitejších rodov rastlinných patogénnych húb. Prakticky každá plodina pestovaná na celom svete je citlivá na jeden, alebo viac druhov *Colletotrichum*. Tieto huby spôsobujú antraknózu, škvrnitosť nadzemných častí rastlín a hnilobu po zbere úrody. Príslušníci tohto rodu spôsobujú veľké straty na hospodársky dôležitých plodinách, najmä na ovocí, zelenine a okrasných rastlinách. Škody spôsobené *Colletotrichum* spp. sa vzťahujú na dôležité základné potravinové plodiny vrátane banánov, manioku a ciroku, ktoré pestujú samozásobitelia v rozvojových krajinách v tropických a subtropických oblastiach. Je obzvlášť úspešný ako pozberový patogén, pretože latentné infekcie, ktoré sa začínajú pred zberom, sa aktivizujú až po uskladnení plodov, alebo po ich objavení sa na trhových pultoch. V dôsledku ochorenia *Colletotrichum* môže dôjsť k strate až 100 % skladovaného ovocia.

*Colletotrichum* je nepohlavný rod, zaradený do skupiny Fungi imperfecti. Patrí medzi Coelomycetes a produkuje svoje konídie v acervulách. Napriek významnému vývoju zostáva taxonómia rodu *Colletotrichum* v stave zmien. V súvislosti so systematikou hubových patogénov tohto rodu existuje mnoho nejasností a v závislosti od kritérií sa počet druhov môže pohybovať od 29 do viac ako 700. Jedným z najzamotanejších druhov je *C. gloeosporioides*. Napríklad 594 druhov *Colletotrichum* preklasifikoval von Arx ako synonymá *C. gloeosporioides*.

V dôsledku svojho významu ako patogénu, jedinečného vnútrobunkového hemibiotrofného spôsobu života a jednoduchosti, s akou sa dá kultivovať a manipulovať, má *Colletotrichum* dlhú a významnú históriu ako modelový patogén pre základné, biochemické, fyziologické a genetické štúdie. Napríklad fenomén patogénnej variability (rasová/kultivárna špecifickosť) bol prvýkrát rozpoznaný u *C. lindemuthianum*. *Colletotrichum* na fazuli bolo modelom pre mnohé z prvých štúdií fytoalexínov. V 70. a 90. rokoch 20. storočia sa väčšina prác, ktorými sa stanovil a charakterizoval fenomén systémovej získanej/indukovanej rezistencie (SAR), vykonala s použitím modelového patosystému *Colletotrichum* - uhorka. Boli klonované kľúčové gény cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP), MAPK a RAS/malých G-proteínov a signálnych dráh sprostredkovaných vápnikom. Funkcia týchto génov, najmä počas klíčenia konídie a vývoja apresória, bola charakterizovaná u viacerých druhov *Colletotrichum*.

Väčšina druhov *Colletotrichum* spočiatku vytvára infekciu prostredníctvom krátkej biotrofnej fázy spojenej s veľkými intracelulárnymi primárnymi hýfami, hoci niektoré druhy sa opisujú ako subkutikulárne, napr. *C. capsici*. Neskôr huba prejde



do deštruktívnej, nekrotrofnej fázy spojenej s užšími sekundárnymi hýfami, ktoré sa rozvetvujú po celom tkanive hostiteľa. Molekulárne detaily, ktoré riadia hemibiotrofný spôsob života (známy aj u iných druhov húb, napr. *Magnaporthe*), sú už dlho predmetom záujmu fytopatológov. Na identifikáciu čakajú najmä faktory regulujúce prechod od biotrofie k nekrotrofii. Nedávno dokončená sekvencia *C. graminicola* (Vaillancourt et al., Department of Plant Pathology, University of Kentucky, Lexington, Kentucky) spolu s niekoľkými ďalšími pripravovanými druhmi *Colletotrichum* sľubuje rozšírenie našich poznatkov o tomto dôležitom fytopatogéne húb.

### ***Ustilago maydis***

Kukuričné múčnatky nie sú hospodársky významnou, alebo ničivou chorobou. Preto sa *Ustilago maydis* z tohto dôvodu nedostala do prvej desiatky. Hoci jej príznaky na kukurici môžu byť pomerne dramatické, vo väčšine prípadov infekcie zostávajú lokálne, nešíria sa, a preto nie sú spojené s vážnymi stratami na úrode kukurice. Práve naopak, poľnohospodári v Mexiku infikujú kukuricu umelo, aby mohli zbierať infikované klasy na prípravu tradičného pokrmu Huitlacoche, ktorý bol populárny už v predšpanielskych časoch.

V čom spočíva príťažlivosť tejto huby a prečo sa stala modelom pre biotrofné, rastlinné patogénne bazídiomycéty? *Ustilago maydis* možno pestovať v kultúre na definovaných médiách, huba je haploidná, rastie pučaním a vytvára kompaktné kolónie na platniach, ktoré možno replikovať. To boli vlastne niektoré z dôvodov výberu tejto huby pre prvé štúdie homologickej rekombinácie. Na kolonizáciu hostiteľa a rozvoj symptómov môžu byť infikované sadenice kukurice. Symptómy sa môžu vyvinúť na všetkých nadzemných častiach rastlín kukurice za 5 - 6 dní a infekčný cyklus je ukončený približne za 2 týždne. Typické pre plesne je, že patogénny vývoj sa rovná pohlavnému vývoju a bezpodmienečne sa vyžaduje párenie a tvorba dikaryotického vlákna. Tieto kroky sa dajú reprodukovať v laboratóriu až po vytvorenie apesórií na vhodných hydrofóbných povrchoch. Proteíny riadiace tieto udalosti sú známe: feromóny a feromónové receptory, ako aj heterodimérny transkripčný faktor vytvorený po splynutí buniek, ktorý spúšťa regulačnú kaskádu. Tieto poznatky umožnili vytvoriť haploidné solopatogénne kmene, ktoré spôsobujú ochorenie bez potreby partnera na párenie. Takéto kmene umožňujú priame genetické skriningy a výrazne znižujú prácu pri reverzných genetických prístupoch. Homologická rekombinácia je úžasne účinná a využíva štyri dominantné selektovateľné markery. Medzi nástroje patria regulované promotory na štúdium esenciálnych génov a rôzne metódy farbenia na vizualizáciu huby počas biotrofného rastu a k dispozícii sú fluorescenčné proteíny na zobrazovanie expresie génov v živých bunkách a vizualizáciu subcelulárnych štruktúr. Od roku 2006 je k dispozícii ručne anotovaná a kurátorovaná sekvencia genómu s veľkosťou 20,5 MB. Genom je "chudobný" a obsahuje málo opakujúcej sa DNA. Transkripčné profily boli stanovené pre najdôležitejšie vývojové štádiá húb a reakcie rastlín. To podnietilo prístupy reverznej genetiky a umožnilo identifikovať zoskupené gény kódujúce vylučované efekty, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu počas kolonizácie hostiteľa, a určiť, ktoré tkanivo môže byť infikované. Z analýzy genómu tiež vyplynulo, že *U. maydis* je bližšie príbuzný s človekom ako s kvasinkami a mnohé proteíny sú spoločné len pre *U. maydis* a *Homo sapiens*. Patria sem proteíny, ktoré sa podieľajú na základných princípoch diaľkového transportu, mitózy, motorickej organizácie mikrotubulov a homologickej rekombinácie. *Ustilago maydis* je preto

ideálnym hosťiteľom na štúdium takýchto procesov. Kam tento systém smeruje? Umožní stanoviť hierarchiu efektorového pôsobenia počas kolonizácie rastlín, poskytne pohľad na výživu húb počas kolonizácie rastlín a posluží ako plán pre komparatívne prístupy, ktoré pravdepodobne odhalia poznatky o evolúcii genómu aj o špecializácii hosťiteľa.

### ***Melampsora lini***

*Melampsora lini* (Ehrenb.) Desm., hubový patogén zodpovedný za ochorenie ľanu a ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) hrdzou, je zaujímavý z hospodárskych aj vedeckých dôvodov. Môže spôsobiť vážne straty na úrode semien, ako aj znížiť kvalitu vlákna v ľane pestovanom na výrobu ľanu; preto musia šľachtitelia venovať osobitnú pozornosť tomu, aby každá nová odroda uvoľnená pre pestovateľov bola geneticky odolná voči všetkým rasám hrdze v zemepisnej oblasti, v ktorej sa má pestovať.

Z vedeckého hľadiska sa *M. lini* dostala do popredia v roku 1942, keď Harold Flor oznámil výsledky štúdie dedičnosti, ktorá preukázala, že jednotlivé alelické génové páry určujú fenotyp avirulencie/virulencie na hosťiteľských líniách s konkrétnymi génmi rezistencie, čo ho viedlo k návrhu jeho dnes známej hypotézy "gén za gén". Tá hovorí, že "patogenita fyziologickej rasy *Melampsora lini* je určená patogénnymi faktormi špecifickými pre každý faktor rezistencie, ktorý má hosťiteľ". Následné početné štúdie dedičnosti s *M. lini*, ktoré vykonal Flor a iní, spolu so štúdiami dedičnosti hosťiteľa, poskytli značnú podporu modelu "gén za gén", ale odhalili aj určitú ďalšiu zložitosť v tom, že v niektorých prípadoch sa ukázalo, že dvojica inhibičných génov a dvojica génov avirulencie/virulencie interaguje, aby určila fenotyp virulencie/avirulencie na líniách hosťiteľa s konkrétnymi génmi rezistencie.

## **2.3 Vírusové patogény rastlín**

Medzi vírusy, ktoré sa výrazne prejavujú na základe svojho vedeckého významu, patria: vírus mozaiky tabaku (TMV), vírus mozaiky uhoriek (CMV), vírus mozaiky karfiolu (CaMV), vírus mozaiky stoklasu (BMV) a vírus zemiakov X (PVX). Hoci mnohé z týchto vírusov stále spôsobujú značné problémy z hľadiska hospodárskych strát v širokom spektre plodín, práve ich využitie ako vedeckých nástrojov ich postavilo do vysokých rolí dôležitosti pre vedcov. Je zaujímavé poznamenať, že v prípade vírusov, ako je PVX, sa situácia vyvíjala: hoci na začiatku predstavoval veľký problém spôsobujúci značné straty, certifikačné schémy a šľachtiteľské programy pôsobili na zníženie jeho vplyvu; okrem toho počiatkový záujem vedcov viedol k tomu, že v súčasnosti predstavuje vynikajúci modelový systém nielen z hľadiska virológie PVX, ale aj z hľadiska interakcií medzi rastlinami a vírusmi.

Väčšina vírusov sú jednobláknové RNA vírusy s pozitívnym zmyslom, hoci sú zastúpené aj iné formy genómov nukleových kyselín, napr. dvojbáknová DNA (dsDNA), ktorú reprezentuje CaMV, umiestnený pre vedecký záujem s neobvyklými translačnými stratégiami, použitím reverznej transkripcie pri replikácii a pokračujúcim záujmom a použitím CaMV promótorov pre štúdie molekulárnej biológie rastlín a transgenných plodín.

## Vírus tabakovej mozaiky (TMV)

*Tobacco mosaic virus* (TMV) bol v tejto ankete rastlinnej virologickej komunity zvolený za najdôležitejší rastlinný vírus. TMV je aj naďalej dôležitým výučbovým systémom pre učebňu a svoj status modelového systému si rozvíja a udržiava už viac ako 110 rokov, čo je výsledkom množstva vedeckých štúdií iniciovaných z potreby pochopiť, ako kontrolovať ochorenia tabaku vyvolané TMV.

Martinus Beijerinck ako prvý v roku 1898 definoval TMV ako malú infekčnú entitu. Jeho zistenia potvrdili a zopakovali iní na začiatku 20. storočia, ale bol to Henry A. Allard z amerického ministerstva poľnohospodárstva (USDA), ktorý vykonal veľmi pokrokové a starostlivé experimenty, aby preukázal, že mozaikové ochorenie tabaku nie je fyziologický účinok, alebo enzým - je to infekcia, vírus. Výskum zostal takmer na mŕtvom bode až do práce troch ústredných osobností virológie: Helen Purdy Bealeovej a Francisa O. Holmesa z Boyce Thompson Institute for Plant Research a Howarda H. McKinneyho z USDA. Zaviedli dnes už univerzálne nástroje, ako sú sérológia, lokálny test lézií/gény rezistencie a krížová ochrana. Zvyšok možno v istom zmysle považovať za komentár, alebo spresnenie ich zistení.

TMV sa tiež priamo podieľal na udelení najmenej dvoch Nobelových cien a mnohých "prvenstvách": prvá sekvenovaná RNA rastlinného vírusu, prvý definovaný pohybový proteín (MP), prvý dôkaz účinnosti transgénnej expresie plášťového proteínu (CP) na ochranu pred infekciou, prvé šľachtenie rastlín a molekulárny dôkaz interakcie gén-pre-gén rezistencie a nedávno prvá platforma na preukázanie princípu pre nanozariadenia a expresiu terapeutických monoklonálnych protilátok a iných farmaceuticky významných proteínov.

Čo rozhodlo o úspechu používania TMV? Na začiatku bol hnacím motorom ekonomický záujem, pretože tabak bol mimoriadne výnosnou plodinou. Preto bolo na začiatku 20. storočia impulzom určenie príčiny infekcie, detekcia a následná prevencia. Záujem o TMV však čoskoro presiahol praktické poznatky z oblasti rastlinnej patológie. TMV sa stal zdrojom hlbokej vedeckej zvedavosti s cieľom pochopiť fyzikálno-chemickú povahu vírusu, ktorú určil Wendell Stanley, Holmesov spolupracovník a spolupracovník Beala. Stanley bol výrazne ovplyvnený enzýmológmi, a preto TMV nesprávne definoval ako proteín, čo rýchlo napravili F. C. Bawden a N. W. Pirie, ktorí si uvedomili, že ide o ribonukleoproteín (RNP). Čoskoro potom sa vďaka prvým elektrónovým mikrofotografiám TMV stal viditeľnou entitou. V druhej polovici 20. storočia nasledovali ďalšie príkladné práce, ktoré ukázali: (i) že samotná RNA je infekčná; (ii) že štruktúra určená röntgenovou difrakciou vlákien rozlíšila interakcie medzi RNA a proteínom; (iii) že na víruse existuje diskretná oblasť na iniciáciu enkapsidácie; (iv) že tripletové kodóny kódujú špecifické aminokyseliny; (v) definícia sekvencie vírusu a otvorených čítacích rámcov (ORF); a (vi) biologicky aktívny klon cDNA. To priamo viedlo k nášmu pochopeniu replikácie a k paradigmaticky prevratným zisteniam, že MP sa viaže na TMV RNA a vytvára tenké vlákna RNP, ktoré sa môžu pohybovať cez plazmodesmaty, čo viedlo ďalšiu generáciu vedcov k novému chápaniu vírusov. Podobne expresia TMV CP v rastlinách viedla ku komerčnej produkcii transgénnych rastlín na krížovú ochranu proti vírusom a k poznaniu, že TMV sa stal aj objavom vďaka izolácii hostiteľského N-génu a prebiehajúcemu skúmaniu molekulárnych mechanizmov jeho pôsobenia. V poslednom čase sa rozšírila užitočnosť TMV, keďže sa použil na vývoj nových koncepcií počítačového ukladania údajov, na rozšírenie našich poznatkov o štruktúre vírusu a nosičoch malých molekúl

a na spresnenie našich poznatkov o lokálnej ekológii a zdatnosti mechanicky prenášaných vírusov. Okrem toho má rastlinná biológia veľký prínos z TMV, ktorý ukázal cestu k vypracovaniu funkčných interakcií medzi hosťiteľom a vírusom vrátane mechaniky pohybu medzi bunkami cez plazmodesmaty a prenosu RNP z jadra do cytosolu. Budúcnosť nášho "obľúbeného" vírusu sa zdá byť svetlá.

### **Vírus bronzovitosti rajčiakov (TSWV)**

Prvý opis choroby rajčiakov "škvrnité vädnutie" sa objavil v roku 1915 v Austrálii. Neskôr sa ukázalo, že chorobu prenášajú tripsy a spôsobuje ju vírus, ktorý bol pomenovaný Tomato spotted wilt virus (TSWV). Hoci bol vírus čoskoro zaznamenaný v mnohých ďalších krajinách, nedávne celosvetové rozšírenie tripsov strapky západnej (*Frankliniella occidentalis*), hlavného prenášača TSWV, viedlo v 80. rokoch 20. storočia k opätovnému rozšíreniu TSWV ako významného poľnohospodárskeho škodcu, pričom celosvetové straty sa do roku 1994 odhadovali na viac ako 1 miliardu USD ročne. Pretrvávajúci hospodársky význam TSWV je výsledkom: (i) jeho celosvetového rozšírenia a širokého spektra hosťiteľov (> 800 druhov rastlín) vrátane rajčiakov, papriky, šalátu, podzemnice olejnej a chryzantém; (ii) značných strát na úrode spôsobených infekciou a (iii) ťažkostí pri riadení vektorov háďatka, a teda aj vírusu. TSWV spôsobuje rôzne príznaky vrátane nekrotických/chlorotických prstencov a škvŕn na listoch, stonkách a plodoch, pričom skoré infekcie vedú k jednostrannému rastu, opadávaní listov pripomínajúcemu vaskulárne vädnutie, zakrpateniu, alebo úhynu. Neskoršie infekcie vytvárajú nepredajné plody s nápadnými chlorotickými/nekrotickými škvrnami, ktoré sa často objavujú až vtedy, keď plody dosiahnu plnú farbu. Pre TSWV boli vyvinuté nové integrované stratégie riadenia, pretože komplexný vzťah medzi vektorom a vírusom a rýchlosť prenosu obmedzujú účinnosť insekticídov.

TSWV si získava pozornosť aj pre svoju fascinujúcu biológiu, ktorá je výzvou pre manažment vírusu aj vektora. V 80. rokoch 20. storočia sa prvýkrát zistilo, že TSWV sa podobá vírusom z čeľade Bunyviridae, veľkej skupiny vírusov prenášaných väčšinou článkonožcami a infikujúcich stavovce. Následné molekulárne štúdie TSWV podporili vytvorenie rodu *Tospovirus* (pomenovaného podľa TSWV, typického a jediného pôvodného člena) v rámci čeľade Bunyviridae. Neskoršie štúdium a charakterizácia podobných vírusov, z ktorých niektoré boli predtým klasifikované ako izoláty TSWV, zaradili ~20 druhov (akceptovaných a predbežných) do dnešného rodu *Tospovirus*. TSWV a nedávno opísané *Tospovirusy* sú medzi rastlinnými vírusmi jedinečné tým, že virióny sú obalené v membráne odvodenej od hosťiteľa, ktorá je posiatá dvoma vírusovými glykoproteínmi, a obsahujú jednu negatívnu a dve ambisenzorické jednovláknové RNA enkapsidované vo viacerých kópiách vírusového nukleokapsidového proteínu. Podrobnosti o biológii TSWV sú opísané na inom mieste, ale dva aspekty sú dostatočne nové na to, aby sme ich spomenuli: i) virióny obsahujú vírusovú RNA-dependentnú RNA polymerázu, ktorá využíva mRNA hosťiteľskej bunky na základnú transkripciu vírusu prostredníctvom cap-snatching; a ii) tripsy môžu prenášať TSWV len vtedy, ak sú získané ako larvy, hoci larvy aj dospelí jedinci sú schopní prenášať.

TSWV sa replikuje vo svojich vektoroch, čo znamená, že tripy sú zároveň vektormi a mobilnými hosťiteľmi vírusu, a naznačuje, že TSWV a iné *tospovirusy* sa mohli vyvinúť z druhov infikujúcich tripy na druhy infikujúce tripy a rastliny. Takmer sto rokov po prvej správe a po 30 rokoch intenzívneho molekulárneho štúdia zostáva

TSWV jedným z 10 hospodársky najničivejších a vedecky najnáročnejších rastlinných vírusov.

### **Vírus žltej kučeravosti listov rajčiaka (TYLCV)**

Vírus žltej kučeravosti listov rajčiaka (TYLCV) spôsobuje jednu z najničivejších nových chorôb rajčiaka na svete. Vírus (rod *Begomovirus*, čeľaď Geminiviridae) prenáša múčnatka *Bemisia tabaci*. Od začiatku 60. rokov 20. storočia sa TYLCV rýchlo rozšíril z východnej časti Stredozemného mora do celej oblasti Blízkeho východu, strednej Ázie, severnej a západnej Afriky, juhovýchodnej Európy, karibských ostrovov, juhovýchodnej časti USA, Mexika, južných ostrovov Indického oceánu a Japonska. Vo vážne postihnutých regiónoch môže dôjsť k úplnej strate úrody. Obrovský hospodársky vplyv TYLCV a rýchle šírenie ochorenia TYLCV po celom svete vyvolali za posledných 30 rokov rozsiahly výskum zaoberajúci sa mnohými aspektmi vírusového ochorenia: molekulárnou biológiou, vzťahom medzi rastlinou, vírusom a vektorom, epidemiológiou, manažmentom ochorenia a šľachtením na odolnosť.

TYLCV bol prvým begomovírusom, u ktorého sa preukázalo, že má jednu genomickú zložku (monopartitnú), na rozdiel od doteraz známych begomovírusov, ako je ACMV, ktorý má dve genomické zložky (bipartitnú). Tak ako všetky geminivírusy, aj TYLCV má častice s rozmermi ~20 nm × 30 nm s dvojitou morfológiou. Jeho kruhový jednoláknový genóm DNA (2787 nukleotidov) je obalený kapsidou pozostávajúcou z dvoch spojených neúplných ikosaédrov s 22 kapsomerami, z ktorých každá obsahuje päť jednotiek 260-aminokyselinového CP (30,3 kDa). Genóm TYLCV obsahuje dva ORF: V<sub>1</sub> kóduje CP a V<sub>2</sub> kóduje proteín podobný pohybu (MP) s vlastnosťami supresora umlčovania RNA. Komplementárny zmysel genómu zahŕňa štyri ORF: C<sub>1</sub> kóduje proteín spojený s replikáciou (Rep), C<sub>2</sub> proteín transkripčného aktivátora (TrAP), C<sub>3</sub> proteín zosilňovača replikácie (REn) a C<sub>4</sub> determinant príznakov a pohybu. Vírusová DNA sa replikuje v jadrách infikovaných buniek podľa mechanizmu valiaceho sa kruhu, pričom využíva vlastné kódované proteíny a mechanizmus hostiteľskej bunky. Sekvenovanie a fylogenetické analýzy ukázali, že TYLCV zahŕňa komplex viac ako 10 druhov vírusov a ich kmeňov. Hlavnou príčinou diverzifikácie TYLCV môže byť rekombinácia medzi vírusmi/kmeňmi.

Rýchle šírenie vírusového ochorenia je spôsobené tlakom múčnatky a vysokou účinnosťou prenosu. Jediná múčnatka je schopná inokulovať rastlinu po 15-minútovom období získavania a 15-minútovom období inokulácie. Na poli môže dôjsť k inokulácii ihneď po presadení. Infikované sadenice zostanú zakrpatené a neprinesú plody. TYLCV sa môže okrem bielych mušiek prenášať aj štepením, agroinokuláciou a bombardovaním časticami s DNA. Neprenáša sa semenami. Vzťahy medzi begomovírusmi a múčnatkou sú zložité. TYLCV prenáša *B. tabaci* cirkulatívnym spôsobom. TYLCV a niektoré príbuzné vírusy ovplyvňujú niekoľko vlastností hmyzích patogénov: ovplyvňujú dlhovekosť a plodnosť *B. tabaci* a niekedy sa prenášajú transovariálne; ovplyvňujú transkriptóm múčnatky, aktivujú expresiu génov súvisiacich s imunitnou odpoveďou múčnatky.

Manažment TYLCV sa zvyčajne snaží kontrolovať populácie múčnatky častými postrekmi insekticídmi. Chemická kontrola je však náročná úloha z dôvodu rýchleho vzniku rezistencie voči väčšine insekticídov. Šľachtenie rajčiakov odolných voči TYLCV sa začalo v polovici 70. rokov 20. storočia a bolo vydaných niekoľko komerčných odrôd s primeranou odolnosťou. Šľachtenie zahŕňalo introgresiu rezistencie zistenej

v odrodách niekoľkých voľne rastúcich druhov rajčiakov (napr. *Solanum chilense*, *S. peruvianum*, *S. pimpinellifolium* a *S. habrochaites*) do domestikovaného rajčiaka (*S. lycopersicum*). Na chromozómoch rajčiaka bolo zmapovaných niekoľko lokusov úzko spojených s odolnosťou voči TYLCV, označovaných ako Ty-1 až Ty-5. Na základe koncepcie rezistencie spôsobenej patogénom, ktorá zahŕňa expresiu funkčných, ako aj nefunkčných vírusových génov, boli navrhnuté aj rôzne transgénne stratégie. Rezistencia voči vírusom sprostredkovaná RNA na základe antisense RNA a posttranslačného umlčovania génov je účinná, ale veľmi závislá od sekvencie.

### **Vírus mozaiky uhoriek (CMV)**

*Cucumber mosaic virus* (CMV) je typovým členom rodu *Cucumovirus* z čeľade Bromoviridae. Častice CMV majú ikosaedrický tvar a priemer 29 nm, pričom každá pozostáva zo 180 podjednotiek jednej CP s veľkosťou ~24 kDa a jednej z genomických RNA. Na základe podobnosti sekvencií nukleových kyselín možno kmene CMV všeobecne rozdeliť do dvoch hlavných podskupín označených ako I a II, pričom kmene podskupiny I sa delia na dve (A a B), alebo viac ďalších podskupín. Genom CMV obsahuje päť génov, ktoré sú exprimované buď z troch genómových RNA, alebo z dvoch subgenómových RNA. Proteíny 1a a 2a sa podieľajú na replikácii vírusu, ktorá prebieha na membránach tonoplastu, zatiaľ čo proteín 2b je supresorom umlčovania RNA, antagonistom iných obranných mechanizmov hostiteľa a efektorovým proteínom vírusovej rekombinácie. Proteín 3a a CP sú nevyhnutné pre pohyb z bunky do bunky aj na veľké vzdialenosti, čo sú procesy, ktoré ovplyvňujú všetky proteíny kódované CMV. Proteín 2b a CP sú exprimované zo subgenómových RNA, označených ako RNA 4A a RNA 4 v uvedenom poradí. RNA 4 sa balí spolu s RNA 3, zatiaľ čo usporiadanie balenia RNA 4A nie je známe, okrem toho, že ju balia len kmene CMV podskupiny II. RNA 5, ktorá je tiež balená len kmeňmi CMV podskupiny II, zodpovedá 3' nepreloženej oblasti RNA 2 a 3. Jej funkcia nie je známa.

CMV sa podrobne skúmal na molekulárnej úrovni, pričom mnohé výsledky týkajúce sa translácie a replikácie sa zhodujú s pozorovaniami vykonanými v prípade BMV. Začína sa objasňovať povaha rôznych interakcií medzi CMV a rastlinami. CMV podporuje aj satelitné RNA s veľkosťou približne 330 - 390 nukleotidov, z ktorých niektoré vyvolávajú smrteľnú nekrózu v rajčiaku, pričom niekoľko z nich vyvoláva chlorózu v tabaku, rajčiaku, alebo paprike, ale väčšina satelitných RNA oslabuje symptómy vyvolané CMV na väčšine testovaných hostiteľov. CMV synergicky interaguje s potyvírusmi, tobamovírusmi a PVX v solankovitých rastlinách, ako aj s potyvírusmi v hostiteľoch z čeľade tekvicovité.

Mozaiková choroba spôsobená vírusom CMV bola prvýkrát opísaná v roku 1916 a v priebehu rokov sa zistilo, že tento vírus infikuje mnoho druhov plodín. Pred dostupnosťou molekulárnych diagnostických techník a kvôli rozdielom medzi kmeňmi v typoch vyvolaných symptómov a v rozsahu hostiteľa bol CMV často nesprávne identifikovaný ako nový vírus, čo viedlo k vzniku najmenej 43 prezývok CMV. Na rozdiel od iných členov čeľade Bromoviridae majú kmene CMV veľmi široký spoločný hostiteľský rozsah, infikujú viac ako 1 200 druhov rastlín vo viac ako 100 čeľadiach vrátane ovocných plodín, zeleniny a okrasných rastlín, jednoklíčnolistových aj dvojklíčnolistových. Častice CMV prenáša viac ako 80 druhov mšíc z 33 rodov a bolo opísaných mnoho bezpríznakových, prezimujúcich hostiteľov burín. Prenos CMV semenami sa vyskytuje aj u mnohých burín, hoci s frekvenciou od < 1 % do 50 %. Tieto

faktory spoločne prispeli k úspechu CMV ako patogénu a jeho vplyvu na straty na úrode. Hoci sa straty na úrode plodín v jednotlivých rokoch na rôznych miestach líšia a je ťažké ich kvantifikovať, najmä ak ide o zmiešané infekcie, boli zaznamenané niektoré hodnoty priameho vplyvu na straty na úrode, napr. 25 % – 50 % rajčiakov v Číne a 60 % melónov a až 80 % papriky v Španielsku. V prípade prítomnosti nekrogénnej satelitnej RNA boli v Španielsku a Taliansku zaznamenané straty 80 % rastlín rajčiakov v 70 % pestovateľských oblastiach, pričom v niektorých oblastiach boli straty až 100 %. Každý rok sa opisujú ďalší hostitelia CMV a nové choroby. Zvýšená aktivita mšíc v severných oblastiach mierneho pásma môže viesť k ďalším epidémiám, najmä preto, že mnohé kontrolné opatrenia nie sú veľmi účinné. CMV nadobúda čoraz väčší význam aj v tropických a subtropických oblastiach, najmä tam, kde sa pestujú zmiešané plodiny. Kontrola CMV na poli prostredníctvom kontroly jeho vektora mšice nie je veľmi účinná, hoci v niekoľkých prípadoch sa využili gény rezistencie. Mnohé z týchto génov však slúžia na toleranciu a iné môžu byť prekonané rôznymi kmeňmi CMV. Rezistencia odvodená od patogénu ponúka najlepšiu nádej na trvalú odolnosť voči CMV, ale v súčasnosti tento prístup nie je politicky populárny.

### **Y vírus zemiaku (PVY)**

*Potato virus Y* (PVY, *Potyvirus*) má vláknité a ohybné častice. Genom ss(+)RNA s veľkosťou približne 9,7 kb kóduje veľký ORF a krátky ORF (PIPO) vložený do veľkého ORF. Na 5' konci RNA je kovalentne pripojený proteín spojený s vírusovým genómom (VPg) a na 3' konci je prítomný poly(A)n chvost. PVY prenáša viac ako 40 druhov mšíc (napr. *Myzus persicae*) neperzistentným spôsobom. Prvýkrát bola popísaná v 30. rokoch 20. storočia a infikuje široké spektrum hostiteľov najmä v rámci čeľade Solanaceae a je rozšírená po celom svete. Izoláty druhu PVY sú veľmi variabilné na biologickej, sérologickej a molekulárnej úrovni. Preto boli navrhnuté skupiny (napr. PVYO a PVYN) podľa symptómov vyvolaných počas infekcie. Izoláty PVYO vyvolávajú mozaiku na tabaku a zemiakoch a opadávanie listov na zemiakoch. Izoláty PVYN sú zodpovedné za čiastočnú/úplnú nekrózu listov infikovaných hostiteľov. V 80. rokoch 20. storočia boli na zemiakoch opísané varianty (napr. PVYNTN schopný vyvolať nekrózu hlúz zemiakov). PVY je známa už mnoho desaťročí ako hrozba pre sadivo, konzumné a spracované zemiaky.

Zemiaky sú štvrtou najvýznamnejšou potravinárskou plodinou na svete s úrodou 315 miliónov ton v roku 2006 a neustále rastúcim podielom (4,5 % ročne) na svetovej produkcii hlúz. V dôsledku nedostatku účinnej rezistencie voči izolátom PVY vyvolávajúcim nekrotické príznaky listov/hlúz v pestovaných odrodách a prenosu izolátov z rastliny na rastlinu prostredníctvom dcérskych hlúz je stratégia kontroly používaná na zníženie výskytu PVY založená najmä na certifikácii produkcie osiva. Napriek najnovším zlepšeniam v metódach detekcie a molekulárnej charakterizácie však rutinne používané postupy nedokážu presne charakterizovať izoláty zodpovedné za nekrózy hlúz. V dôsledku toho neexistujú účinné prostriedky na riadenie rizík epidémií spôsobených novými nekrotickými variantmi. V súčasnom kontexte vysoko konkurenčného medzinárodného trhu so zemiakmi v hodnote niekoľkých miliárd eur viedli nedostatky našich poznatkov o interakciách PVY a hostiteľa, ktoré sa podieľajú na vyvolaní príznakov nekrózy, ako aj diagnostických nástrojov k situácii, v ktorej sú nekrotické izoláty PVY stále potenciálne zodpovedné za obrovské agronomické a hospodárske straty.

PVY je tiež deštruktívny vírus v porastoch tabaku, ktorý spôsobuje zníženie výšky a zmenu chemického zloženia (napr. obsahu nikotínu) vysušených listov. Medzi ďalšie druhy plodín postihnuté vírusom PVY patrí paprika, pri ktorej bola pozorovaná 100 % miera infekcie, a rajčiak, kde nové kmene PVY spôsobujú vážne škody na úrode a kvalite plodov. Napokon sa ukázalo, že PVY silne ovplyvňuje aj plodiny s nižším hospodárskym dosahom [napr. petúniu v Európe.

### **Mozaikový vírus karfiolu (CaMV)**

*Cauliflower mosaic virus* CaMV sa stal stredobodom intenzívneho záujmu v rastlinnej virológii z niekoľkých dôvodov: i) bol to prvý rastlinný vírus identifikovaný ako DNA vírus; ii) je to prvý rastlinný vírus, ktorého genóm bol sekvenovaný; a iii) je to prvý rastlinný vírus, u ktorého sa preukázala replikácia reverznou transkripciou. Okrem toho je tento vírus jedinečný v tom, že používa osobitný spôsob translácie. Ďalej využíva fascinujúce stratégie na potlačenie obranných systémov svojich hostiteľov.

Je pozoruhodné, že začiatok výskumu CaMV sa začal objavením inkluzívnych teliesok obsahujúcich vírusu podobné častice v infikovaných rastlinách. Následne boli CaMV častice izolované z rastlín *Brassica* obsahujúcich takéto inkluzívne telieska. Bolo určitou senzáciou, že sa ukázalo, že tento vírus obsahuje DNA, pretože v tom čase sa vo všeobecnosti predpokladalo, že rastlinné vírusy sú RNA vírusy. Inkorporácia značeného tymidínu do inkluzívnych teliesok (t. j. do DNA) však bola pozorovaná už predtým.

Tieto objavy podnietili intenzívny výskum CaMV: sekvencia vírusu sa stala dostupnou ako jeden z prvých sekvenovaných genómov a bola potvrdená klonovaním genómu v infekčnej forme. Informácie z tejto sekvencie umožnili vyvodiť závery o ORF, ktoré tento vírus využíva pre svoj životný cyklus, ako aj o cis-elementoch, ktoré majú prvoradý význam pre výkonnosť vírusu. Tieto prvky zahŕňali promotory a polyadenylačné miesta, ako aj miesto pre väzbu primer-t-RNA. Následne boli izolované druhy mRNA 35S, 19S a 8S odvodené od vírusu.

Verzie vírusovej DNA boli identifikované ako kruhové dvojvláknové a niekedy uzlové variety, čo poukazuje na replikáciu sprostredkovanú reverznou transkripciou, ktorá v konečnom dôsledku vedie k tomu, že vírusový genóm obsahuje tri jednovláknové prekrývajúce sa časti, ktoré zostali po reverznej transkripcii. V jadrách však CaMV DNA existuje ako minichromozóm, t. j. superzvinutá kruhová dvojvláknová DNA pokrytá histónmi.

CaMV je pararetrovírus a nepoužíva ako pravé retrovírusy genomickú integráciu ako súčasť svojho životného cyklu. Vírusová genomická 35S RNA je terminálne nadbytočná (ako u retrovírusov), pretože pri prvom stretnutí obchádza polyadenylačný signál. Promótor je plne aktívny v neprítomnosti akéhokoľvek vírusového faktora. Okrem toho je vďaka zloženiu samostatných tkanivovo špecifických zosilňovacích prvkov aktívny spôsobom nezávislým od tkaniva. Práve tento dôvod spolu s jeho silou a väčšinou konštitutívnou povahou robí z promotora 35S univerzálny nástroj v transgenéze.

RNA 35S nie je len templátom pre reverznú transkripciu, ale slúži aj ako hlavná RNA pre transláciu. Pre eukaryotickú mRNA je nezvyčajná, je polycistrónna. Translácia sa uskutočňuje pomocou transaktivačného/viroplazmínového proteínu (TAV), ktorý sa viaže na translačný mechanizmus a zabraňuje tomu, aby ribozómy po translácii každého jednotlivého ORF odpadli. Ďalšia nezvyčajná translačná stratégia zahŕňa



posun vysoko štruktúrovaného 600 nukleotidov dlhého vodcu 35S RNA skenovaním ribozómov.

Jeden po druhom boli identifikované vírusové proteíny s výnimkou ORF VII, ktorý je nepotrebný. MOV je MP tvoriaci tubulárne štruktúry cez bunkové steny, cez ktoré sa transportujú vírusové častice. ITF je faktor prenosu na hmyz, ktorý sprostredkúva väzbu vírusových častíc na tyčinku mšice. Proteín asociovaný s viriónom (VAP) sa voľne spája s viriónom, viaže proteíny MOV aj ITF a je potrebný na ich pôsobenie. Vírusový CP GAG (názov prevzatý z retrovírusového "skupinovo špecifického antigénu") balí vírusovú DNA do ikosaedrickej častice, ktorá pri vstupe do bunky využíva jadrový cieľový signál proteínu GAG, aby sa dostala do jadra. Replikácia sa uskutočňuje pomocou polyproteínu POL, ktorý je príbuzný retrovírusu POL a je štiepený vlastnou proteázou na reverznú transkriptázu/RNázuH a proteázu. Multifunkčný TAV sa prekladá z RNA 19S, ktorá je riadená samostatným promótorom; je to štruktúrny prvok, ktorý tvorí inklúzne telieska potrebné na zostavenie vírusu, a mediátor polycistrónnej translácie. Okrem toho predstavuje faktor avirulencie rozpoznávaný systémom vrodenej imunity rastlín. V neposlednom rade sa ukázalo, že proteín TAV pôsobí ako tlmiaci supresor, ktorý zasahuje do tlmiacej dráhy RDR6/DCL4/DRB4. CaMV dáva vzniknúť obrovskému množstvu malých interferujúcich vírusových RNA s 21, 22 a 24 nukleotidmi, pričom väčšina pochádza z 8S dsRNA. Tieto neobmedzujú vírusovú replikáciu, ale môžu slúžiť ako návnada, ktorá odvádza umlčovací mechanizmus od vírusových promótorov a kódujúcich oblastí. Analýza CaMV umožnila nielen nahliadnuť do hlavných požiadaviek "života", ale poskytla nám aj poznatky o biológii rastlín vo všeobecnosti

### **Vírus africkej mozaiky manioku (ACMV)**

*African cassava mosaic virus* (ACMV), geminivírus, ktorý je pôvodcom mozaikovej choroby manioku. Príznaky vírusu na infikovanej hostiteľskej rastline sa pohybujú od miernych až po veľmi závažné a v niektorých prípadoch môžu viesť k úplnému zničeniu plodiny. Preto sa táto choroba stala prekážkou pre pestovanie manioku a jeho využívanie. Pôvodne bol zaznamenaný ako latentný vírus manioku a následne ako africký vírus mozaiky manioku, v súčasnosti existuje sedem odlišných afrických druhov a dva druhy rozšírené na indickom subkontinente, pričom všetky sú definované predovšetkým na základe sekvencie nukleotidov. Geminivírusy infikujúce maniok vykazujú intenzívne rekombinácie, ktoré sú príčinou ich rýchlej molekulárnej diverzifikácie, a tým aj ich schopnosti reagovať na zmeny prostredia. Nedávna pandémia mozaikovej choroby manioku postihla mnohé krajiny východnej a strednej Afriky a do roku 2005 spôsobila hospodárske straty v odhadovanej výške približne 1,9 – 2,7 miliardy USD. Napriek rozsiahlemu pestovaniu manioku v mnohých krajinách juhovýchodnej Ázie a v Južnej a Strednej Amerike boli geminivírusy infikujúce maniok hlásené len z Afriky a indického subkontinentu. Neprítomnosť ochorenia v niektorých hlavných pestovateľských oblastiach manioku na svete by mohla byť dôsledkom skutočnosti, že polyfágna múčnatka *B. tabaci* biotyp B, zodpovedná za prenos vírusu, nie je schopná účinne kolonizovať maniok v týchto častiach sveta.

Maniok (*Manihot esculenta*), ktorý pestujú poľnohospodári v Afrike, často na marginálnych pôdach, je nevyhnutný pre potravinovú bezpečnosť a tvorbu príjmov. Hoci je maniok tolerantný voči suchu a produktívny na chudobných pôdach, rozmnožuje sa vegetatívne stonkovými odrezkami, a preto je prispôsobovanie

a zavádzanie nových vylepšených odrôd s požadovanými vlastnosťami odolnosti voči chorobám a vírusom pomalé. Koreň manioku, ktorý je zdrojom potravy tejto plodiny, je objemný a ľahko podlieha skaze, ale napriek tomu tvorí základnú potravinu pre takmer 80 % africkej populácie. Hoci maniok poskytuje najmä sacharidy, má nedostatok bielkovín. Stravu je potrebné dopĺňať inými zdrojmi potravy, ako sú zelenina, strukoviny a obilniny. Zvýšený rast pestovania obilnín, ktoré sú v mnohých komunitách prispôbené miestnym podmienkam, predstavuje hrozbu pre budúci rozvoj manioku. Kasava sa venuje menej výskumu a vývoja ako iným základným plodinám, ako je ryža, kukurica a pšenica. Tento zjavný nedostatok vedeckého záujmu o maniok prispel k jeho nerovnomernému pestovaniu a následne umožnil rozvoj mozaikovej choroby manioku na úkor veľkých ľudských populácií.

ACMV bol jedným z prvých geminivírusov, ktoré boli molekulárne charakterizované. Analýzy odhalili prítomnosť dvoch podobne veľkých jednovláknových molekúl DNA, z ktorých každá obsahuje identickú nukleotidovú sekvenciu približne 200 nukleotidov, alebo spoločnú oblasť, z ktorej prebieha divergentná vírusová transkripcia. Spoločná oblasť obsahuje aj sekvencie potrebné na iniciáciu a ukončenie replikácie valivého kruhu, čo je mechanizmus, ktorým sa tieto vírusy replikujú. Z toho vyplýva, že obidve DNA sú potrebné na infekčnosť, a tým spĺňajú Kochov postulát. V nasledujúcich rokoch, po mnohých výskumoch v mnohých laboratóriách, boli identifikované funkcie mnohých ORF. DNA-A má gény potrebné na replikáciu vírusu a enkapsidáciu vírusovej nukleovej kyseliny. Druhá DNA, DNA-B, kóduje funkcie potrebné na presun vírusového genómu z jadra, miesta replikácie vírusu, do cytoplazmy a následne do neinfikovaných buniek na šírenie infekcie. Výskum ACMV sa v súčasnosti zaoberá tým, aké faktory riadia hostiteľský rozsah vírusu, čo má za následok jeho odlišnú a rôznorodú symptomatológiu, reguláciu a transkripciu génov vírusu, funkčnosť promótorovej oblasti geminivírusu a pochopenie toho, akú úlohu môže v týchto činnostiach zohrávať interferencia RNA.

### **Plum pox vírus (PPV)**

*Plum pox vírus* (PPV) spôsobuje šárku, najdôležitejšie vírusové ochorenie kôstkového ovocia. K tejto situácii prispieva päť faktorov, pričom prvé tri sú spoločné pre mnohé potyvírusy: (i) účinný prenos mnohými druhmi hmyzu, čo vedie k rýchlemu epidemickému šíreniu, ktoré sa ťažko kontroluje; (ii) závažnosť príznakov, ktorá môže viesť k 100 % produkčným stratám u najnáchylnejších odrôd; (iii) vegetatívne rozmnožovanie hostiteľa, ktorí umožňujú účinné šírenie v miestnom a globálnom meradle; (iv) všeobecná náchylnosť hostiteľov s veľmi malým počtom identifikovaných zdrojov rezistencie, čo do značnej miery zmarilo medzinárodné úsilie o šľachtenie rezistencie; a v) karanténny, alebo regulovaný štatút vo väčšine produkčných regiónov s následnými vysokými nákladmi na dohľad a eradikáciu, ale s obmedzenou účinnosťou pri zabraňovaní vstupu PPV do nezasiahnutých regiónov. Hoci sa PPV po väčšinu 20. storočia vyskytoval len v Európe, za posledných 20 rokov sa objavil v Afrike, Južnej a Severnej Amerike a Ázii, takže v súčasnosti sú v rôznej miere postihnuté takmer všetky hlavné produkčné oblasti. V mnohých krajinách existujú nákladné snahy o eradikáciu, alebo kontrolu. Hoci v niekoľkých prípadoch boli tieto snahy úspešné, vo všeobecnosti spomalili postup PPV, ale nezastavili ho. Celosvetové náklady na chorobu šárka a na jej kontrolu sa za posledných 30 rokov odhadujú na 10 miliárd USD. Tento hospodársky vplyv vysvetľuje, prečo PPV patrí medzi najlepšie

preskúmané potyvírusy, a to aj napriek technickým obmedzeniam, ktoré vyplývajú z drevnatosti jeho prirodzených hostiteľov. V priebehu rokov bol PPV jedným z rastlinných vírusov, pre ktoré sa ako prvé sprístupnili nové detekčné techniky vrátane enzýmovej imunisorbčnej analýzy (ELISA), polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a ďalších nových techník. Variabilita PPV sa tiež podrobne skúmala. Veľké úsilie konzorcia SharCo financovaného EÚ nedávno prinieslo informácie o sekvencii viac ako 800 poľných izolátov, čím sa PPV pravdepodobne stal potyvírusom, pre ktorý sú k dispozícii informácie o najväčšom počte izolátov. PPV tiež patrí medzi najlepšie preskúmané potyvírusy z hľadiska interakcií medzi rastlinami a vírusmi a je jedným z mála, pre ktoré je k dispozícii patosystém založený na *Arabidopsis*, čo ho robí veľmi atraktívnym pre genetickú identifikáciu génov citlivosti hostiteľa. PPV bol tiež na čele štúdia dvoch potyvírusových proteínov, helikázy CI. Mimoriadne aktívne bolo aj úsilie o vývoj transgénnych plodín odolných voči PPV, ktoré vyvrcholilo overením odolnosti transgéennej slivky HoneySweet prostredníctvom poľných pokusov a jej dereguláciou v USA, čím sa stala jednou z mála transgénnych plodín odolných voči vírusom, ktoré boli vyvinuté tak, aby sa mohli predávať. Boj proti PPV pokračuje a záujem o PPV sa v najbližších rokoch neznižuje. Kľúčovými témami budúcnosti budú pravdepodobne snahy o lepšie pochopenie a modelovanie jeho epidemického šírenia s cieľom zlepšiť úsilie o eradikáciu, alebo kontrolu na jednej strane a na druhej strane pochopenie jeho interakcií s jeho hostiteľmi s cieľom vyvinúť *Prunus* odolný voči PPV prostredníctvom translačného výskumu.

### **Brome mozaika vírus (BMV)**

*Brome mosaic virus* (BMV) je pozitívny RNA vírus, ktorý infikuje najmä trávy vrátane obilnín. Víroly BMV pozostávajú z približne 30 nm neobalených kapsíd s veľkosťou  $T = 3$ , ktoré obklopujú tri samostatne zapuzdrené genomické RNA. RNA1 a RNA2 kódujú dva faktory replikácie BMV RNA, vysoko multifunkčný, na membránu zameraný proteín 1a metyltransferáza/helikáza a polymeráza 2a. RNA3 kóduje vírusový MP a prostredníctvom subgenómovej RNA4 CP.

Hoci BMV zriedkavo spôsobuje významné straty na úrode, v prírode je veľmi úspešný a rozšírený na väčšine územia sveta. BMV bol úspešný aj v laboratóriu. Jeho vysoká úrodnosť, genetická a biochemická sledovateľnosť a ďalšie vlastnosti už dlho priťahujú rôznych výskumníkov, ktorých príspevky urobili z BMV široko užitočný model pre expresiu vírusových génov, replikáciu RNA, rekombináciu RNA, enkapsidáciu, interakcie medzi vírusom a hostiteľom a ďalšie procesy, ktoré sú príliš početné na to, aby sme ich tu plne rozoberali. Mnohé výsledky BMV sa ukázali ako relevantné pre všetky rastlinné vírusy a v niektorých prípadoch aj pre vírusy s pozitívnym reťazcom RNA.

Okrem iných zistení boli BMV RNA predmetom dôležitých skorých translačných štúdií. Tie zahŕňali prvú definíciu väzbového miesta pre eukaryotické ribozómy, ktorá odhalila väzbu eukaryotickej iniciácie translácie na 5'-konce mRNA. BMV tiež vytvoril prvý eukaryotický vírusový RNA-dependentný RNA polymerázový extrakt s výraznou špecifickosťou pre svoje príbuzné vírusové RNA, čo uľahčilo mnohé štúdie syntézy RNA. Včasné sekvenovanie genómov vírusov BMV, TMV a Sindbis odhalilo neočakávané zachovanie viacerých domén v ich proteínoch replikácie RNA, čím sa zaviedol koncept vírusových superrodín, ktoré pokrývajú rôzne ríše hostiteľov a morfológie viriónov.

BMV bol prvým rastlinným RNA vírusom, pre ktorý boli navrhnuté infekčné transkripty z klonovanej vírusovej cDNA. To umožnilo rekombinantnú manipuláciu DNA s vírusovým genómom na účely mechanistických štúdií a iných cieľov a odvtedy sa využíva *in vitro* a *in vivo* na reverznú genetiku mnohých iných RNA vírusov. Doplnenie týchto schopností, neskoršie demonštrácie, že BMV proteíny riadia vírusovo špecifickú replikáciu RNA, transkripciu, enkapsidáciu a rekombináciu v genetickej modelovej kvasinke *Saccharomyces cerevisiae*, uľahčili identifikáciu a štúdium vírusových a hostiteľských funkcií v mnohých infekčných procesoch. Štúdie kvasiniek a rastlín napríklad ukázali, že BMV indukuje nové membránou ohraničené mini orgány na replikáciu RNA. Viaceré znaky štruktúry, zostavovania a funkcie týchto replikačných komplexov a 3'koncov genomických RNA BMV podobných tRNA naznačujú, že pozitívne RNA vírusy, retrovírusy a dsRNA vírusy vznikli zo spoločného predka.

Medzi ďalšie významné štúdie BMV patrí okrem iného prvý dôkaz rekombinácie rastlinnej vírusovej RNA a podrobné analýzy funkcie promotora, enkapsidácie, nanotechnologických aplikácií a pohybu infekcie a hostiteľskej špecifickosti. BMV bol tiež prvým RNA vírusom vytvoreným na expresiu cudzieho génu a naďalej sa používa na riadenie expresie génov, umlčovanie atď. Prostredníctvom takýchto zavedených a nových prístupov bude BMV naďalej prispievať k lepšiemu pochopeniu, kontrole a praktickým aplikáciám vírusov a interakcií medzi vírusom a hostiteľom.

### **X vírus zemiaku (PVX)**

*Potato virus X* (PVX), typický člen rodu Potexvirus z čeľade Flexiviridae, bol opísaný v roku 1931 ako "vírus X zemiakov". Hoci sa význam infekcií spôsobených vírusom PVX pre úrodu plodín zmiernil prostredníctvom programov certifikácie osiva, štúdie o štruktúre, replikácii a šírení vírusu PVX posunuli naše chápanie expresie vírusových génov, interakcií medzi vírusom a hostiteľom, umlčovania génov a využívania vektorov na báze PVX na rôzne poľnohospodárske a biomedicínske aplikácie.

Ohybný charakter tyčinkovitého viriónu PVX a Flexiviridae bol výzvou pre určenie štruktúry tejto triedy vírusov. Napriek tomu biochemické a biofyzikálne prístupy poskytli modely, ktoré naznačujú, že častica ~515 nm × 13 nm sa skladá z jednovláknovej genómovej RNA s ~6400 nukleotidmi, ktorú enkapsiduje ~1270 identických 25-kDa CP podjednotiek v špirálovom usporiadaní. Štúdie montáže a demontáže boli dôležité aj pre rekonštitúciu častíc *in vitro* a pre poskytnutie poznatkov o remodelácii častíc pri translácii. Značná plocha povrchu tyčinkovitých častíc a umiestnenie N-konca CP na povrchu umožnili vývoj biokatalýzy na báze PVX, dodávanie nanočastíc a zobrazovanie epitopov.

Analýzy expresie genómu PVX definovali cis- a trans- funkcie pre replikáciu potexvírusu. Uzavretá a polyadenylovaná genómová RNA kóduje replikázu na syntézu vírusovej RNA, proteíny trojitého génového bloku (TGB) na pohyb vírusu z bunky do bunky a CP, ktorý funguje pri montáži, pohybe z bunky do bunky a ako elicitor pre rezistenciu PVX sprostredkovanú Rx. Replikáza preložená z genómu syntetizuje kópie vírusovej RNA s mínusovým a plusovým reťazcom a subgenómové RNA, ktoré sú templátmi pre preklad proteínov TGB a CP. Jedinečnou vlastnosťou replikácie PVX je, že okrem požiadaviek na lokalizované cis-aktívne prvky a štruktúry na vírusovej RNA sú pre celú syntézu RNA nevyhnutné interakcie na veľké vzdialenosti medzi

koncovými sekvenciami a komplementárnymi, konzervovanými vnútornými regulačnými prvkami, ktoré presahujú vzdialenosti až ~4400 nukleotidov.

Funkčné štúdie proteínov PVX TGB a ich interakcií s CP, replikázou, vírusovou RNA, endomembránami hostiteľa, aktívnym cytoskeletom a plazmodesmatami naznačujú komplexnú súhrnu interakcií vírusu a hostiteľa počas pohybu vírusu. Multifunkčný PVX TGBp1 reguluje limit vylúčenia veľkosti plazmodesmat a prepravuje virióny, CP/RNA RNP, alebo jednochvostové častice cez plazmodesmaty; tento proces uľahčujú TGBp2 a TGBp3. Na pohyb je potrebné aj potlačenie utlmenia sprostredkované TGBp1 a schopnosť TGBp1 remodelovať virióny a podporovať transláciu môže byť dôležitá počas transportu a po ňom.

Vývoj vektorov na báze PVX na expresiu v transgénnych rastlinách bol kľúčový pri objavovaní umlčovania RNA, potlačania umlčovania a mechanizmov rezistencie voči patogénom v transgénnych rastlinách. Amplikonové vektory PVX a vektory s amplikomom plus spolu s rôznymi iteráciami vektorov na báze PVX sa vo veľkej miere používali na štúdie expresie/umlčovania v rôznych systémoch a ukázali sa ako cenné platformy pre molekulárne poľnohospodárstvo.

### **3 Biologická kontrola chorôb rastlín pomocou prírodných a geneticky modifikovaných flourescenčných *Pseudomonas* spp.**

#### **3.1 *Pseudomonas* spp.**

Obavy o životné prostredie viedli k potrebe udržateľného využívania prírodných zdrojov. Tradičné poľnohospodárstvo má značný vplyv na pôdu a vodu. Je dôležité zmeniť niektoré poľnohospodárske postupy na ekologicky čistejšie techniky. Udržateľné poľnohospodárstvo poukázalo na mnohé prístupy a techniky na zníženie vplyvu na životné prostredie. Jednou z týchto stratégií je využívanie pôdnej mikrobioty na podporu rastu rastlín, kontrolu chorôb rastlín a biodegradáciu xenobiotík. Štúdie o vzťahu medzi koreňmi a mikrobiotou sú nevyhnutné na dosiahnutie životaschopných poľnohospodárskych aplikácií. Z týchto štúdií vyplýva, že jedným z najrozšírenejších mikroorganizmov v rhizosfére (oblasť okolo koreňov) sú flourescenčné *Pseudomonas* spp. Uvažuje sa o nich ako o alternatíve k agrochemikáliám na kontrolu chorôb rastlín a zvýšenie rozvoja rastlín.

Táto kapitola sa zaoberá hlavnými poznatkami o flourescenčných *Pseudomonas* spp. Sumarizuje a rozoberá významné aspekty tejto všeobecnej témy vrátane (i) rhizosféry ako mikrohabitat; (ii) taxonomických, genetických a ekologických aspektov flourescenčných *Pseudomonas* spp. v rhizosfére; (iii) mechanizmov podpory rastu rastlín a biologickej kontroly a (iv) komerčného využitia PGPR v poľnohospodárstve.

#### **3.2 Rhizosféra ako mikrohabitat**

Korene menia chemické a fyzikálne vlastnosti pôdy a vytvárajú z nej špecializované prostredie, ktoré zvyšuje spoločenstvo mikrobioty. Tento vplyv spoločenstva je dôležitý, pretože korene absorbujú vodu a živiny a patogény sa môžu

dostať do rastlín. Termín rhizosféra, bol pôvodne definovaný ako oblasť pôdy pod vplyvom koreňov rastlín. Následné štúdie dospeli k záveru, že rhizosféra sa skladá z troch rôznych oblastí: endorhizosféra, ktorá pozostáva z koreňových tkanív; rizoplane je dvojrozmerný povrch koreňa a ektorhizosféra, ktorá predstavuje priľahlú pôdu. Termínu endorhizosféra sa však vyhlo, pretože zo sémantického hľadiska by mohol určovať zónu ekologickej niky a nie presne niku vo vnútri rastliny. Okrem toho neexistuje štandardný termín a môže zamieňať presné určenie ekologickej niky a mikrobiálnych skupín na nej. Nakoniec autori navrhli odstránenie tohto termínu. V súčasnosti sú termíny rhizosféra a rizoplane na opis vonkajšej niky ku koreňom a na vymedzenie vnútornej niky sa termíny rozchádzajú. Mikrobiálne spoločenstvo sa zväčšuje z vonkajšej strany do vnútra koreňov.

Bližšie biochemické interakcie medzi mikroorganizmami a rastlinami súvisia s týmto prírastkom v spoločenstve. Baktérie, ktoré osídľujú vnútorné tkanivá koreňov, sa nazývajú endofytické baktérie. Existujú rôzne definície pojmu "endofytický mikroorganizmus". Endofytické mikroorganizmy, baktérie a huby, ktoré plne kolonizujú vnútorné tkanivá rastlín počas časti, alebo celého svojho životného cyklu bez toho, aby spôsobovali príznaky ochorenia. Táto definícia sa považuje za vhodnú na vymedzenie týchto mikroorganizmov.

Ako endofytické baktérie sa označujú rody baktérií, ako sú *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*. Tieto mikroorganizmy kolonizujú najmä koreňovú čiapočku, epidermis a kôru. Koreňová čiapočka produkuje sliz, ktorý chráni pred vysychaním a prilne k pôde a mikroorganizmom, ktoré ho môžu využívať ako zdroj živín. Množstvo a zloženie slizu závisí od druhu rastliny. V kukurici je polysacharid v podstate tvorený  $\beta$  1 – 4 glukánom s hydrofilnými polymérami galaktózy a fukózy a menším množstvom xylózy, arabinózy, galakturonových kyselín, niektorých fenolov a bielkovín. Fukóza, ktorá sa vyskytuje v hliene a vo vrstvách bunkových stien koreňových čiapočiek kukurice, je dôležitá v systémoch rozpoznávania symbiôzy hostiteľ - patogén. (napr. *Azospirillum lipoferum*).

Bunky uvoľnené z koreňovej čiapočky môžu mikroorganizmom dodávať aj živiny. Korene kukurice môžu uvoľniť približne 10 000 buniek za deň. Baktérie väčšinou kolonizujú epidermis a koreňové chĺpky. Tieto baktérie produkujú sliz, ktorý je podobný pektínu (kyselina polygalakturonová). Nachádzajú sa v medzibunkových priestoroch kôry a môžu prenikať do buniek. Saprophytické mikroorganizmy, ako *Pseudomonas fluorescens*, môžu kolonizovať odumreté kortikálne bunky koreňov hrachu. Dostupnosť živín je základom pre kolonizáciu koreňov. Táto dostupnosť je fotosyntetická translokácia z listov do koreňov, ktoré sa uvoľňujú do pôdy. Oddenok sa považuje za hlavný zdroj uhlíka do pôdy. Množstvo rhizodepozície sa mení v závislosti od druhu rastliny a podmienok prostredia. Materiály uvoľnené z rhizodepozície môžu byť malé organické zlúčeniny rozpustné vo vode, alebo komplexné zlúčeniny, ako sú flavonoidy. Tieto materiály sa delia na: exudáty rozpustné vo vode, ktoré vytekajú z koreňov bez zapojenia metabolickej energie; sekréty, ktoré sú vysokomolekulárne zlúčeniny závislé od metabolických procesov; lyzáty uvoľnené z autolýzy buniek, ktoré obsahujú bunkové steny, alebo dokonca celé bunky; a plyny, ako sú etylén a CO<sub>2</sub>. Tieto materiály vylučované z rhizosféry stimulujú a selektujú pôdne mikrobiálne spoločenstvá spojené s rhizosférou rastlín. Účinok rhizosféry nie je skupinovo špecifický a môže ovplyvňovať rôzne morfológické, fyziologické a taxonomické skupiny. Napriek tomu krátke gramnegatívne tyčinky predstavujú významnú časť

baktérií spojených s rhizosférou. Tieto organizmy sa veľmi rýchlo rozmnožujú, sú schopné využívať aminokyseliny a vo vode rozpustné cukry a sú odolné voči niektorým antibiotikám.

Všeobecne sa v rhizosfére vyskytujú najmä *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* a *Agrobacterium*. Skúmal sa katabolizmus flavonoidov v kmeni *P. putida*. Pozorovali, že kmeň bol schopný využiť širokú škálu flavonoidov vrátane flavonolov, flavónov a izoflavónov. Exudáty kukuričnej rhizosféry môžu mať vplyv na produkciu kyseliny indolactovej kmeňom *P. fluorescens*. Využitie exudátov mikroorganizmami, najmä aminokyselín a cukrov, môže byť dôležité pre vývoj a úrodu rastlín. Vplyv rhizosféry na pseudomonády sa zistil po dvadsiatich dňoch rastu sóje. Pozoroval sa výrazný nárast celkového spoločenstva fluorescenčných *Pseudomonas* a producentov fenazínu (antibiotík) po každom cykle, čo charakterizuje kumulatívny účinok.

### **Taxonomický status fluorescenčných *Pseudomonas***

Rod *Pseudomonas* patrí do podtriedy  $\gamma$  proteobaktérií a zahŕňa prevažne fluoreskujúce pseudomonády, ako aj niekoľko nefluoreskujúcich druhov. Fluorescenčnú skupinu *Pseudomonas* predstavujú: 1) fytopatogénne druhy pozitívne na cytochróm c oxidázu, ako sú *P. cichorii*, *P. marginalis* a *P. tolaasii*; 2) nefytopatogénne, nekrogénne kmene, ako sú *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* a druhy typu *P. aeruginosa*; 3) fytopatogénne nekrogénne fluorescenčné *Pseudomonas* spp. bez cytochróm c oxidázy: *syringae* a *P. viridiflava*. Skupinu nefluorescenčných *Pseudomonas* tvoria *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* a *P. pseudoalcaligenes*.

Táto téma sa konkrétne zameriava na fluorescenčné pseudomonády, pretože sa vyskytujú v mnohých prostrediach, najmä v rhizosfére rastlín. Mnohé štúdie sa týkajú týchto baktérií, ktoré dokážu zlepšiť rast a zdravie rastlín a podieľajú sa na prirodzenej supresivite niektorých pôd voči mnohým chorobám prenášaným pôdou, zatiaľ čo iné sa podieľajú na biodegradácii prírodných a človekom vytvorených toxických chemických zlúčenín. Fenotypová charakterizácia sa používa na zoskupovanie a identifikáciu baktérií podľa niektorých znakov, ako je morfológia, pigmentácia a reakcie na farbivá a výživové požiadavky. Nutričné vlastnosti sa skúmali v zbierke 267 nefytopatogénnych kmeňov *Pseudomonas* rôzneho pôvodu, medzi ktorými bolo 175 fluorescenčných *Pseudomonas*. Zistilo sa, že *P. fluorescens* a *P. putida* sú veľmi heterogénne. *P. putida* sa rozdelila na biotypy A a B, ktoré sa stali biovarmi A a B. *P. fluorescens* sa tiež rozdelila na 7 biotypov. Biotypy A, B, C, D a F sa potom nazývali biovary (bv. I až V) a z biotypov D a E sa stali *P. chlororaphis* a *P. aureofaciens*, ktoré sa potom zoskupili ako *P. chlororaphis*. *P. fluorescens*. V zahŕňa kmene, ktoré sa často nedajú klasifikovať, pretože nie sú identifikované vlastnosti, ktoré sú nevyhnutné na odlíšenie od ostatných biovarov. Tento systém viacerých biovarov odhaľuje vysokú fenotypovú heterogenitu a pravdepodobne odráža vysokú genomickú diverzitu.

Fenotypové štúdie odhalili vysokú variabilitu týchto dvoch druhov, čo viedlo k rozdeleniu na tieto biovary a podskupiny každého z nich. Na objasnenie skutočného taxonomického stavu týchto podskupín je dôležité genotypovo charakterizovať druhy a biovary. Hybridizačné štúdie DNA-rRNA viedli k vymedzeniu rodu *Pseudomonas* do piatich homologických skupín. Rod *Pseudomonas sensu stricto* zodpovedá homologickej skupine Palleroni sensu rRNA I a obsahuje všetky fluorescenčné druhy.

Rôzne štúdie ukazujú veľmi vysokú genomickú variabilitu v rámci biovarov *P. fluorescens* a *P. putida* a pravdepodobne niektoré biovary zodpovedajú nepopísaným druhom. Úroveň podobnosti rhizosférických izolátov identifikovaných ako *P. fluorescens*, alebo *P. putida* podľa fenotypových kritérií Palleroniho nebola nikdy vyššia ako 55 % v porovnaní s typovými kmeňmi *P. fluorescens* a *P. putida*. Budúce štúdie ekológie fluorescenčných pseudomonád si vyžadujú spoľahlivé, rýchle a lacné metódy na identifikáciu veľkého počtu izolátov. Na objasnenie taxonomického statusu tejto skupiny je potrebné opísať nové druhy v rámci odlišných druhov *P. fluorescens* a *P. putida*.

### 3.3 Genetická charakterizácia *Pseudomonas* spp.

Nukleotidové sekvencie rôznych génov, najmä malých podjednotiek (SSU) rRNA, sa široko využívajú na identifikáciu a klasifikáciu mikroorganizmov (165). Štúdium sekvencií SSU rRNA viedlo k mnohým zisteniam, ako napríklad Archaea, skupina prokaryotov, ktorá je oddelená od Baktérií. Tento gén sa používa najčastejšie. Jeho sekvencia je mozaikou vysoko konzervovaných oblastí popretkávaných variabilnými a hypervariabilnými úsekmi, ktoré ju robia vhodnou na návrh PCR primerov. Gén 16S rRNA z *Pseudomonas* spp. obsahuje 1492 nukleotidových pozícií, z ktorých 148 je variabilných a 65 pozícií z nich sa nachádza v troch hypervariabilných oblastiach. "Hypervariabilné oblasti *Pseudomonas* (hv)" boli definované ako: hv 1, pozície sekvencie génu *E. coli* 16S rRNA 71 - 95; hv 2, pozície sekvencie génu *E. coli* 16S rRNA 455 – 475; a hv 3, pozície sekvencie génu *E. coli* 16S rRNA 998-1043. Tieto pozície sa nachádzajú v oblastiach V1: špirála 6, V3: špirála 18 a V6: špirály P35-1 a P35-2. Oblasť hv1 sa považuje za jednu z najvariabilnejších sekvencií v 16S rRNA baktérií v celom fylogenetickom spektre a je užitočná na rozlišovanie vnútro druhových línií a rozoznávanie typových kmeňov niektorých druhov *Pseudomonas*.

Veľká databáza sekvencií 16S rRNA je dôležitá pre analýzu environmentálnych izolátov a rozpoznanie nových zdrojov diverzity. Napriek tomu existuje niekoľko úskalí pri používaní rDNA na štúdium biodiverzity. Veľkosť génu je konštantná, a preto by sa rôzne gény nedali ľahko oddeliť podľa veľkosti. Okrem toho, napriek tomu, že gény 16S majú hypervariabilné a mimoriadne informatívne oblasti. Často nie sú dostatočne divergentné na to, aby sa dali oddeliť v blízkych príbuzenských vzťahoch. Autorizovaných bolo približne 80 izolátov fluorescenčných *Pseudomonas* z rhizosféry mrkvy a šalátu vysadených v konzorciách. Fenotypová analýza ukázala, že prevažnú časť izolátov tvorili *Pseudomonas putida*. Napriek tomu genotypová analýza pomocou reštrikcie 16S génov nedokázala správne rozlíšiť izoláty, pretože profily boli veľmi podobné. Na vyriešenie týchto obmedzení pri charakterizácii izolátov z prostredia sa využívajú iné techniky. Oblasť nachádzajúca sa medzi génmi 16S a 23S (ITS1) rRNA je veľmi variabilná vo veľkosti a sekvencii aj v rámci úzko príbuzných taxonomických skupín. Vzor veľkosti môže charakterizovať rôzne spoločenstvá Eubacteria, alebo Archaea a veľmi rozdielna sekvencia umožňuje veľmi presnú detekciu druhovo podobných jednotiek pomocou PCR, oligosond, alebo hybridizácie dlhých DNA sond. Navrhol som sadu primerov špecifických pre *Pseudomonas*, ktoré umožnili amplifikáciu ITS1 spolu s významnou časťou 16S rDNA. Primery boli konzervované pre všetky testované sekvencie *Pseudomonas* a preukázali špecifickosť a účinnosť



pri amplifikácii 1100 až 1300 bp fragmentu pre *Pseudomonas* spp. Táto sada primerov bola testovaná na genotypovú charakterizáciu fluorescenčných *Pseudomonas* z agroekologického systému v štáte Rio de Janeiro. Boli izolované z rhizosféry šalátu a mrkvy. Rozlíšilo sa mnoho skupín, čo poukazuje na rozmanitosť tohto spoločenstva a niektoré skupiny boli úzko späté s rastlinami. Bolo možné pozorovať špecifickosť pre rastliny a časti rhizosféry.

Tieto výsledky naznačujú, že tieto izoláty dokážu lepšie prežívať a konkurovať v rhizosfére, a preto sú účinnejšie rhizobaktérie podporujúce rast rastlín (PGPR) a/alebo biologické kontrolné činitele (BCA). Prerušované repetitívne sekvenčné prvky DNA sú prítomné v genómoch prokaryot a môžu sa použiť ako miesta primerov na amplifikáciu genomickej DNA. Najpodrobnejšie sa skúmali tri rodiny repetitívnych sekvencií vrátane 35 - 40 bp repetitívnej extragennej palindromickej sekvencie (REP), 124 - 127 bp, enterobakteriálnej repetitívnej intergénnej konsenzuálnej sekvencie (ERIC) a 154 bp elementu BOX pozostávajúceho z troch podjednotiek (boxA, boxB a boxC). Tieto sekvencie sa nachádzajú v rôznych intergénnych pozíciách po celom chromozóme. Ukázalo sa, že REP, ERIC a BOX-PCR, označované súhrnne ako rep-PCR, sú užitočné na rýchlu molekulárnu charakterizáciu rastlinných patogénnych baktérií, ako sú *Xanthomonas* a *Pseudomonas*, najmä na úrovni patovaru. Izoláty pseudomonád z rhizosféry sóje pestovanej v brazílskej savanovej oblasti boli analyzované metódami BOX a ERIC - PCR. Zistilo sa, že väčšina z nich mala podobný profil ako kmeň 2-79 (*Pseudomonas fluorescens*). Tento kmeň bol charakterizovaný ako producent fenazínu (PCA-fenazín-1-karboxylová kyselina), antibiotika, ktoré sa podieľa na potláčaní choroby "Take-all" v pšenici. Fragmenty súvisiace so syntézou PCA génu získané pomocou PCR z izolátu vykazovali 96 % identitu s fragmentom fenazínového génu kmeňa 2-79. To naznačuje, že ide o rovnaký gén pre syntézu antibiotika. Tento výsledok je v súlade s hypotézou, že phz gény sú konzervatívne medzi *P. fluorescens*, *P. aureofaciens* a *P. chlororaphis*. Na analýzu diverzity pseudomonád sa používa mnoho ďalších prístupov.

### 3.4 Ekologické aspekty *Pseudomonas* v rhizosfére

Spojenie medzi mikroorganizmami a koreňmi môže byť prospešné, neutrálne, alebo škodlivé, ale účinky často závisia od pôdnych podmienok. Hlavným cieľom pri pochopení účinku rhizosféry je zvýšiť rovnováhu prospešných mikroorganizmov nad škodlivými. Napriek tomu je pre usadenie týchto organizmov potrebná vysoká schopnosť kolonizácie a konkurencie. Kolonizačný potenciál súvisí s podporou výživovej rovnováhy od koreňov k mikroorganizmami, ako aj s génmi súvisiacimi s kolonizáciou rhizosféry. Exudáty sú ľahko dostupné pre mikroorganizmy a zvyšujú ich počet a aktivitu v rhizosfére a konkurenčná schopnosť mikroorganizmov súvisí so schopnosťou mikroorganizmov využívať tieto vylučované zlúčeniny. Niektoré štúdie ukázali, že organické kyseliny tvoria nutričný základ kolonizácie rhizosféry. Defekt vo využívaní organických kyselín, ktoré tvoria hlavnú skupinu zložiek exudátu rajčiakov, má za následok zníženú konkurenčnú kolonizáciu rhizosféry rajčiakov, zatiaľ čo defekt vo využívaní cukrov nemá za následok kolonizačný defekt. Niektoré gény sa podieľajú na kolonizácii rhizosféry.

Sedem z génov indukovaných rhizosférou (rhi) má homológiu so známymi génmi, ktoré nie sú génmi *Pseudomonas*. Mikroorganizmy kolonizujú najmä bočné korene a staršie časti koreňa. Zaraďujú sa do skupín oportunistov, ktorí prevažujú na čerstvých koreňoch, a stratégov, ktorí sú viac špecializovaní a prevažujú na starších koreňoch. Táto posledná skupina baktérií sa označuje ako PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Týmto pojmom sa označujú baktérie dobre prispôbené prostrediu koreňov a rozlišujú sa pôdne baktérie, ktoré ich nie sú schopné kolonizovať. Mnohé rody baktérií sa označujú ako PGPR. Mnohí príslušníci rodu *Pseudomonas* vykonávajú prospešné účinky na rastliny. Medzi nimi *P. putida* a *P. fluorescens* sú fluorescenčné druhy *Pseudomonas*, ktoré predstavujú významnú časť týchto členov. O asociácii baktérií a koreňov sa intenzívne referuje. V niektorých štúdiách sa geneticky a fenotypovo charakterizovali kmene izolované z objemovej pôdy, rhizosféry, rhizoplánu a koreňového tkaniva z rajčiakov a ľanu. Došlo sa k záveru, že rastlina má selektívny vplyv na spoločenstvo fluorescenčných pseudomonád a intenzita selekcie sa líši v závislosti od rastliny. Väčšia časť izolátov ľanu sa líšila od izolátov vybraných z objemovej pôdy a rozdiel sa zväčšoval, keď sa pozoroval bližšie ku koreňom. Tento účinok bol menej významný pri koreňoch rajčiakov. Analýza koreňových tkanív ukázala, že hlavným druhom pseudomonád v ľane je *Pseudomonas putida* bv. A a v rajčiaku *P. fluorescens* bv. II.

Fluorescenčné *Pseudomonas* boli schopné konkurovať na rhizoplane kukurice. Zvýšenie počtu heterotrofných a celkového počtu gramnegatívnych spoločenstiev naznačilo túto konkurenčnú schopnosť. Okrem toho pozorovali, že 30 % izolátov bolo identifikovaných ako *P. fluorescens* a 50 % bolo klasifikovaných ako *P. putida*. Zistilo sa, že *P. putida* prevládala v spoločenstve pseudomonád osídľujúcich rhizosféry konzorciálneho pestovania šalátov a mrkvy. Prevalencia týchto organizmov súvisí s ich rýchlou kolonizačnou schopnosťou a schopnosťou produkovať sekundárne metabolity. Niektoré metabolity, napríklad antibiotiká, zohrávajú dôležitú úlohu pri prežívaní fluorescenčných pseudomonád. Fenazíny, skupina antibiotík produkovaných fluorescenčnými *Pseudomonas*, prispeli k prežitiu a schopnosti konkurencie kmeňa *P. fluorescens* 2-79 a kmeňa *P. aureofaciens* 30-84. Tieto antibiotiká majú vynikajúcu aktivitu proti rôznym mikroorganizmom vrátane viacerých húb a baktérií, ktoré sa bežne vyskytujú v rhizosfére pšenice, a zvýšili ich konkurenčnú schopnosť voči pôvodnej mikrobiote. Produkcia týchto metabolitov sa považuje za najdôležitejší mechanizmus kontroly chorôb rastlín.

Zdá sa, že proces denitrifikácie a produkcia pyoverdínu sa podieľajú na schopnosti pseudomonád konkurovať v rhizosfére. Mutanty s defektnou nitrátreduktázou a pyoverdínom boli v rhizosfére, alebo v objemnej pôde výrazne menej konkurencieschopné ako kmeň divokého typu. Kmene pseudomonád, ktoré mali oba gény pre proces denitrifikácie (*narG* a *nosZ*), by lepšie preživali v pôdnom prostredí. Toto pozorovanie sa potvrdilo vo výsledkoch získaných v laboratórnych experimentoch. Fluorescenčné celkové denitrifikátory *Pseudomonas* vykazovali najlepšiu kompetíciu v rhizosfére. O vplyve rastliny na mikrobiálne spoločenstvo sa uskutočnilo niekoľko štúdií. Vplyv na dynamiku, zloženie a aktivitu pôvodných bakteriálnych populácií, špeciálne zložiek, ktoré majú antagonistické pôsobenie.

## Mechanizmy podpory rastu rastlín a biologickej kontroly

V mnohých správach sa hodnotia pseudomonády ako rhizobaktérie podporujúce rast rastlín a/, alebo ako činidlá biologickej kontroly. Experimenty vykonané v laboratóriu, rastovej komore a v poľných podmienkach overovali účinnosť týchto mikroorganizmov. Rhizobaktérie podporujúce rast rastlín (PGPR) môžu priamo stimulovať rast rastlín, pretože môžu zlepšiť prísun živín, ako je dusík a fosfor, alebo produkciou fytohormónov. PGPR môžu nepriamo podporovať vývoj rastlín aj potláčaním patogénov sprostredkovaným rôznymi mechanizmami. Mnohé správy uvádzajú rôzne druhy PGPR, ktoré majú mechanizmus priameho zlepšovania vývoja rastlín. Kmene fluorescenčných *Pseudomonas* spp. a *Bacillus* spp. boli schopné stimulovať rast rastlín rôznymi vlastnosťami, ako je fixácia dusíka, rozpúšťanie fosfátov, produkcia organických kyselín a IAA (kyselina indolactová).

Viacerí výskumníci vybrali kmene *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* a *Pseudomonas*, ktoré v kultúre produkujú látky podobné giberelínu, a uviedli, že sú dôležité pre rastové reakcie rastlín. Látky podobné giberelínu a iné zlúčeniny podporujúce rast produkovali *Pseudomonas* spp. po inokulácii semien týmito kmeňmi sa pozorovala stimulácia rastu uhoriek. Pozitívne účinky PGPR na rast rastlín vždy súvisia s pozoruhodnými zmenami morfológie koreňov. Všeobecne sa predpokladá, že tieto vývojové reakcie sú stimulované fytohormónmi produkovanými baktériami. Spomedzi regulátorov rastu rastlín môže zohrávať významnú úlohu auxín, čo podporuje skutočnosť, že skrining mutantov *Arabidopsis thaliana* necitlivých na *Pseudomonas rhizobacteria* viedol k izolácii dvoch mutantov zmenených v transportéri Aux1 auxín influx. Je však potrebné vedieť, že účinok auxínu závisí od koncentrácie. Inokulácia zvyšujúcimi sa dávkami kmeňov *Pseudomonas* mala pozitívny výsledok do určitej koncentrácie, nad ktorou sa pozorovali škodlivé účinky. Potláčanie pôdnych patogénov rastlín je dôležitým nepriamym mechanizmom pre vývoj rastlín. Potláčanie škodlivých populácií v rhizosfére prebieha vo viacerých formách. Konkurencia o živiny dodávané koreňmi a semenami a obsadzovanie miest vhodných na kolonizáciu (vylúčenie ník) sú pravdepodobne zodpovedné za určitý stupeň potláčania chorôb väčšinou PGPR a u niektorých kmeňov majú primárny význam.

Biologická kontrola vlhnutia *Pythium* pomocou *P. putida* N1R, aplikovaná na semená sóje a hrachu, bola sprostredkovaná schopnosťou vybraných kmeňov dominovať na koreňoch rastúcich z inokulovaných častí semien, alebo osiva. Hoci to nie je jediný štandard používaný na definovanie úspešných kmeňov PGPR. Kolonizačná schopnosť niektorých PGPR súvisí s mechanizmom, ktorý sa podieľa na biokontrolnom pôsobení. Mechanizmus antibiôzy si vyžaduje vhodnú kolonizáciu zapojeného kmeňa (kmeňov), zatiaľ čo pri mechanizme indukovanej rezistencie môže na dosiahnutie úspešnej reakcie hostiteľskej rastliny stačiť menší počet buniek počas obmedzeného obdobia. Systémová získaná rezistencia (Systemic Acquired Resistance - SAR) je indukovaná, keď rastlina aktivuje svoj obranný mechanizmus ako odpoveď na primárnu infekciu patogénom počas interakcie medzi rastlinou a patogénom. K indukcii môže dôjsť prostredníctvom biotických faktorov (napr. infikovanie, alebo kŕmenie patogénom), alebo prostredníctvom chemických látok (napr. salicylátu). Indukovaná systémová rezistencia (ISR) je obranná reakcia rastlín na lokálnu prítomnosť a aktivitu rôznych biotických a abiotických činiteľov.

PGPR vyvolávajú obrannú reakciu rastliny na prítomnosť patogénu. Spôsobuje produkciu špecifických látok. Bakterizácia koreňov klinčekov pomocou *P. fluorescens* WCS417 výrazne znížila vädnutie spôsobené *Fusarium oxysporium* f. spp. *dianthi*. Po infekcii patogénom sa v rastlinách, ktoré dostali koreň – predošetrenie kmeňom WCS417, nahromadilo vyššie množstvo fytoalexínov odvodených od antranilátu dianalexínu (2-fenyl – 7 – hydroxy – 1,3 – benzoxazín – 4H – jeden) a skupiny diantramidov ako v neošetrených kontrolných rastlinách. ISR sa preukázala v red'kovke, tabaku, fazuli obyčajnej, uhorkách. Produkcia metabolitov, ako sú kyanovodíky, siderofóry, extracelulárne lytické enzýmy a antibiotiká, je primárnym mechanizmom biokontroly. Produkcia kyanovodíkov je hlavným faktorom antagonizmu *P. fluorescens* CHAO proti pôdnemu patogénu tabaku *Thielaviopsis basicola* a navrhuje sa, aby pôsobila priamo na patogén bez poškodenia rastliny. Syntézu HCN indukujú vysoké koncentrácie železa, zatiaľ čo podmienky s nízkym obsahom železa sú inhibičné.

Mnohé pôdne pseudomonády vylučujú molekuly označované ako siderofóry, ktoré s vysokou afinitou viažu železo. Tieto žltozelené fluoreskujúce siderofóry majú hydroxamátové, alebo fenolátové skupiny a sú klasifikované ako pyoverdíny, alebo pseudobaktíny. Konkurencia železa sprostredkovaná siderofórmami je dôležitá pre biologickú kontrolu. Produkcia siderofórov je hlavným mechanizmom, ktorým *P. putida* WCS358 kontroluje patogenézu *Fusarium* v klinčekoch a red'kovke. Biosurfaktanty sú ďalšou skupinou sekundárnych metabolitov produkovaných niektorými *Pseudomonas* spp.

Biosurfaktanty sú polyméry s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré znižujú povrchové a medzifázové napätie, a polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktoré sa viažu na povrchy. Niektoré z týchto zlúčenín majú antimikrobiálnu aktivitu, napríklad ramnolipidy (RHL) a peptidové biosurfaktanty. RHL vykazovali aktivitu proti zoospóram oomycét. Spôsobili imotilitu a lýzu zoospór za menej ako jednu minútu. Jeden kmeň *P. aeruginosa* produkoval RHL B, ktorý inhiboval klíčenie spór *Phytophthora capsici* a *Colletotrichum orbicularie* *in vitro*. *Pseudomonas* produkuje niektoré lipopeptidové povrchovo aktívne látky, ktoré sú schopné inhibovať rast mikroorganizmov. Viscisamid a tenzín produkované kmeňmi pôdných *Pseudomonas* inhibovali rast mycélia niektorých húb.

Pôdy možno z mikrobiologického hľadiska charakterizovať ako vodivé a supresívne pôdy. Konduktívne pôdy sa opisujú ako pôdy, v ktorých sa zistili fytopatogény rastlín. Potlačujúce pôdy sú definované ako pôdy, v ktorých sa patogén neusadzuje, alebo pretrváva; usadzuje sa, ale spôsobuje len malé, alebo žiadne škody, alebo sa patogén usadzuje a určitý čas spôsobuje chorobu, ale potom je choroba menej významná, hoci môže v pôde pretrvávať. Supresívne pôdy boli opísané pre rôzne rastlinné patogény). Mechanizmus supresie voči fuzáriovému vädnutiu súvisí s aktivitou mikroorganizmov, ako sú fluorescenčné pseudomonády, ktoré konkurujú patogénu. Existujú početné správy o antibiotikách produkovaných *Pseudomonas* spp. antibiotikum pyrrolnitrín bolo izolované z kultúr kmeňa *P. fluorescens*, ktorý inhiboval rast *Rhizoctonia solani*, *T. basicola*, *Alternaria* spp. a *Verticillium dahliae* "in vitro". Prežívanie semenáčikov bavlníka sa zvýšilo z 30 % na 79 % pri výsadbe do pôdy napadnutej *R. solani* ošetrením semien pred výsadbou kmeňom *P. fluorescens*, alebo pyrrolnitrínom. O rok neskôr ten istý autor izoloval ďalšie antibiotikum, pyoluteorín, produkované iným kmeňom *P. fluorescens*. Toto antibiotikum

bolo inhibičné voči *Pythium ultimum* a redukovalo ochorenie semenáčikov. Na rozdiel od pyrolnitrínu, ktorý aktívne pretrvával v pôde približne 30 dní, pyoluteorín bol rýchlo absorbovaný a inaktívovaný pôdnymi koloidmi.

Dva kmene izolované z koreňov pšenice rastúcej v pôde s potlačeným výskytom holožerov spôsobených *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* významne znížili výskyt ochorenia, keď boli zavedené ako prípravok na ošetrovanie osiva. Naznačili, že za toto zníženie sú zodpovedné antibiotiká produkované kmeňmi. V ďalších správach sa dospelo k záveru, že fenazíny a floriglucinoly inhibovali patogén *in vitro* a *in situ*. Mnohé správy poukazovali na účinnosť týchto antibiotík pri kontrole určitých chorôb rastlín. Nedávno bola kyselina D-glukónová najvýznamnejšou antifungálnou látkou produkovanou kmeňom *Pseudomonas* spp. kmeňom AN5 pri biokontrole vzídenia na koreňoch pšenice. To naznačuje, že s potláčaním choroby môžu súvisieť rôzne zlúčeniny a je potrebné ich priebežne skúmať. Produkcia fenazínu bola spojená so "syndrómom náhlej smrti" (SDS) spôsobeným *Fusarium solani* v sóji. Väčšia časť izolátov *Pseudomonas* z oblasti pestovania sóje bez výskytu SDS produkovala PCA, fenazín-1-karboxylovú kyselinu. Izoláty boli schopné inhibovať rast *Fusarium solani in vitro*. Bakteriálne druhy využívajú komplexné komunikačné mechanizmy nazývané quorum-sensing (QS), ktoré spájajú hustotu buniek s expresiou génov. Difúzne signálne molekuly označované ako autoinduktory, ako sú acyl-homoserínové laktóny, sa hromadia v extracelulárnom prostredí, dosahujú kritickú prahovú koncentráciu a aktivujú odpoveď, ktorá vedie k expresii génov. Na úrovni prahovej hustoty buniek baktérie produkujú látky, ktoré inhibujú šírenie patogénov; na druhej strane prospešné baktérie zodpovedné za fixáciu dusíka používajú QS na optimalizáciu tvorby uzlíkov na koreňoch rastlín. Ďalší pokrok a lepšie pochopenie QS v rhizosfére uľahčí využívanie bioinokulantov v oblasti zdravia pôdy, produktivity rastlín, bioremediačných stratégií až po environmentálne aplikácie. Pseudomonády asociované s rastlinami využívajú systémy quorum-sensing na reguláciu niektorých vlastností, ktoré by mohli ovplyvniť ich perzistenciu a životaschopnosť na povrchu rastlín.

Produkcia fenazínových zlúčenín, ako aj sekundárnych metabolitov je regulovaná systémami quorum sensing (QS). To sa pozoruje na kmeni *P. aureofaciens* 30-84, účinnom proti take-all, v ktorom existujú dva samostatné systémy QS, ktoré regulujú produkciu antibiotík a sekundárnych metabolitov, aktivitu exoproteáz a vlastnosti bunkového povrchu. Regulácia produkcie fenazínu je spojená s génmi *phzR* a *phzI*, ktoré patria do skupiny génov *luxI/luxR* a nachádzajú sa pred fenazínovým operónom. *PhzR* je transkripčný aktivátor expresie fenazínových génov, ktorý funguje ako odpoveď na akumuláciu difúzneho, acylovaného homoserínového laktónu (AHSL) závislého od hustoty bunky, ktorého syntéza vyžaduje *phzI*. Mutant *phzR* 30-84 neprodukoval fenazíny, ale bol doplnený plazmidom *phzR* divokého typu, ktorý môže fungovať *in trans* a aktivovať expresiu fenazínového génu. Dôkaz o difúznom autoinduktore vyplynul z pozorovania, že bezbunkový supernatant 30 – 84 divokého typu, alebo *E. coli* exprimujúcej gén 30 – 84 *phzI* produkoval predčasnú expresiu biosyntetických génov.

V iných analýzach úlohy AHSL v rhizosfére sa defektná populácia *phzI* kmeňa 30 – 84 obnovila na divoký typ expresie fenazínu, keď bola prítomná populácia exprimujúca *phzI*. Tieto výsledky ukázali, že AHSL aktivujú expresiu fenazínu a vyvolali hypotézu, že signály produkované heterológnyimi kmeňmi rhizosféry by mohli ovplyvniť načasovanie, alebo úroveň syntézy fenazínu PGPR produkujúcich antibiotiká *in situ*.

Prítomnosť pozitívnej autoregulačnej slučky, alebo systémov na detekciu kvorumu, ako sú rodiny luxI/luxR, sa zdala byť vhodná v prostredí, ako je rhizosféra, kde je dostupnosť živín prechodná. Keď sú populácie malé, alebo je substrát limitujúci, koncentrácie AHL by zostali pod úrovňou potrebnou na indukciu expície antibiotických génov, čím by sa šetrili zdroje na rast a udržanie. Ak sa dostupnosť živín zvýši a následne dôjde k nárastu populácií, koncentrácie AHL by mohli dosiahnuť úroveň a uhlík a energia by sa využili na produkciu antibiotík. Dôkaz o systéme QS v kmeni 30-84 pochádza z pozorovania, že gén *phzR* v trans-konverzii s chromozomálnou fúziou *phzR::lacZ* viedol k 3,5-násobnému zvýšeniu produkcie  $\beta$ -galaktozidázy. Priebežné analýzy kmeňov dôležitých pre biologickú kontrolu naznačujú, že biosyntéza antifungálnych sekundárnych metabolitov v *Pseudomonas* spp. je bežne riadená dvojzložkovým systémom pozostávajúcim zo sensorovej kinázy GacS a regulátora odpovede GacA. *gacS* je nové označenie pre skupinu konzervovaných génov v *Pseudomonas* spp. kódujúcich funkčne homologické príbuzné sensorové kinázy (napr. *apdA*, *lemA*, *pheN* a *repA*).

V *P. fluorescens* CHAO tento systém prísne kontroluje expresiu viacerých faktorov biologickej kontroly, ako sú Phl, HCN, pyoluteorín. Bakteriálny signál, ktorý zatiaľ nebol identifikovaný, spúšťa autofosforiláciu senzora GacS. Fosfátová skupina sa prenáša na regulátor odpovede GacA mechanizmom fosfo-relay. Expresujú sa tri gény, ktoré kódujú malé nekódujúce RNA RsmX, RsmY a RsmZ. Každá z týchto troch RNA špecificky viaže dva malé proteíny, RsmA a RsmE. V *P. fluorescens* tieto proteíny fungujú ako posttranskripčné represory typických génov biokontroly tým, že zasahujú do funkcie ribozómového väzobného miesta.

### **Komerčné využitie PGPR v poľnohospodárstve**

Komerčný vývoj tohto poľnohospodárskeho produktu musí spĺňať niekoľko kritérií: rozsiahle použitie na hlavných plodinách, kontrola kvality, chemické účinky a zloženie inokula. Pri vývoji biologickej kontroly a PGPR sa musí zohľadniť bezpečnosť produktu, výrobné náklady, účinnosť proti cieľovým organizmom a výmera a hodnota plodín, ktoré sa majú ošetriť. Mikroorganizmy by sa mali zväžiť na rozšírenie a komerčné využitie aj v prípade, že riešený problém s chorobou, alebo háďatkom môže byť špecifický pre relatívne malú geografickú oblasť, jednu plodinu, alebo pestovateľský systém, alebo niekoľko užívateľov, ako sú niektorí pestovatelia, spracovatelia, alebo komunity. V Kalifornii a Idahu boli PGPR účinné pri zvyšovaní výnosov zemiakov, cukrovej repy a reďkovky. Bude však potrebné otestovať kmene v iných regiónoch pestovania zemiakov, aby sa určila ich univerzálnosť. Diskutovalo sa o mnohých faktoroch, ktoré môžu ovplyvniť mikrobiálne spoločenstvá rhizosféry, a je pravdepodobné, že na účinnosť PGPR budú mať vplyv rôzne pôdy, odrody, klimatické podmienky atď.

Stratégie, ako napríklad používanie zmesí kmeňov a používanie hnojivých postrekov, napríklad močoviny, ktoré môžu zlepšiť kolonizáciu rhizosféry, môžu pomôcť prekonať niektoré problémy a zvýšiť konkurencieschopnosť prípravkov v rôznych pestovateľských oblastiach. Okrem fyzikálnych, environmentálnych, mikrobiálnych a odrodových faktorov, ktoré môžu ovplyvniť PGPR, sa musia preskúmať aj ďalšie vlastnosti, kým bude komerčná produkcia vo veľkom meradle praktická. Kmene *Pseudomonas* spp. môžu v kultúre mutovať a vo všeobecnosti strácajú životaschopnosť pri skladovaní počas niekoľkých týždňov. Akákoľvek mutácia,

alebo nedostatok životaschopnosti môže výrazne ovplyvniť výkonnosť a pre spoločnosť, ktorá výrobok predáva, by mohla mať katastrofálne následky. Účinná kontrola kvality bude určite nevyhnutná. Budú potrebné spoľahlivé testy na kontrolu účinnosti kmeňov. Vyvíjajú sa metódy na monitorovanie kvality inokulantov.

Mutácia blokuje biosyntézu antimikrobiálnych zlúčenín v kmeni *P. fluorescens* CHAO. Podarilo sa im kontrolovať mutanty a vyčistiť kontaminované kultúry pomocou určitých minerálov, ako sú zinok, meď, mangán, alebo riedenie médií. Na identifikáciu faktorov, ktoré riadia osud a výkonnosť inokulantov, sú potrebné analýzy v malom meradle vzhľadom na heterogenitu charakterizujúcu komplexné pôdne a rhizosférické prostredie. Priame farbiace techniky a pokročilá mikroskopia poskytli prvé podrobné jednobunkové obrazy kolonizácie koreňov týmito baktériami s použitím fluorescenčných protilátok, fluorescenčnej *in situ* hybridizácie a technológie markerových génov. Fluorescenčne značené protilátky sa s úspechom použili na detekciu kmeňov *Pseudomonas* kolonizujúcich korene pomocou imunofluorescenčnej mikroskopie. Technika fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) zameranej na rRNA ponúka možnosť neextrakčnej detekcie cieľových baktérií. Fluorescenčne značené oligonukleotidové sondy skonštruované na základe informácií o sekvencii 16S rRNA teda hybridizujú na špecifické sekvencie v ribozomálnej RNA fixovaných a permeabilizovaných cieľových buniek.

Napriek tomu len vo veľmi málo prípadoch poskytujú oligonukleotidové sekvencie zamerané na rRNA špecifickosť kompatibilnú s detekciou špecifického kmeňa *Pseudomonas*. Avšak pri použití techniky duálneho farbenia, pri ktorej imunofluorescenčné značenie rozlišuje špecifický kmeň *Pseudomonas*, sa technika FISH zdá byť vhodná na rozlišovanie medzi úrovňami rastovej aktivity v inokulovaných populáciách *Pseudomonas* v rhizosfére. Ďalším problémom je autofluorescencia pôdných častíc, ktorá môže maskovať špecifický fluorescenčný signál emitovaný označenými bunkami. Preto podrobnejšie štúdie *in situ* distribúcie jednotlivých buniek inokulantov *Pseudomonas* pomocou imunochemických metód a/, alebo FISH boli možné až s príchodom konfokálnej laserovej skenovacej mikroskopie (CLSM). Na odlíšenie introdukovaných *Pseudomonád* od pôvodných populácií sa bežne používa vkladanie markerových, alebo reportážnych génov. Niektoré z najobľúbenejších génov používaných ako markery, alebo reportéry kódujú enzýmy (luxAB, lacZ, luc, xylE, gusA), pričom v tomto prípade sa sleduje produkt reakcie katalyzovanej markerovým génom (bioluminiscencia, farba atď.).

Génový produkt sa dá zistiť aj imunochemickými technikami. Špecifické fyzikálne vlastnosti génových produktov môžu sprostredkovať ich detekciu. Ide o produkt génu *gfp*, ktorý je proteínom, ktorý po excitácii vyžaruje zelenú fluorescenciu. Ďalším dôležitým bodom, ktorý je potrebné zvážiť, je používanie pesticídov v pestovateľských systémoch. Väčšina fungicídov zrejme nemá vplyv na PGPR. Fungicídy používané na kúsky zemiakov, ako benomyl, kaptan, PCNB, nemali vplyv na kmene PGPR, ale mankozeb bol inhibičný pomocou testov *in vitro*. *Pseudomonas* spp. majú biochemický mechanizmus, ktorý im poskytuje veľa možností degradovať mnohé zlúčeniny. Bude však potrebné ďalšie testovanie, keďže sa nájdu nové kmene a testujú sa nové plodiny s rôznymi chemickými potrebami. Spočiatku sa pri bakterizácii semien využíval rast baktérií z kultivačných médií suspendovaných vo vode. Hoci sa v niektorých prípadoch zaznamenali rastové reakcie, problémy s týmto systémom vo veľkom meradle sú zjavné. Kmene môžu vo vodnej suspenzii

čoskoro odumrieť, a ak sa výsadba nevykoná bezprostredne po ošetrení, inokulum vyschne a populácie PGPR sa znížia. Boli vyvinuté pohonné látky PGPR a v porovnaní s metylcelulózou sa testovali viaceré komerčne dostupné gummy ako vhodné substráty pre PGPR. Zistilo sa, že usadenie PGPR na koreňoch a stimulačný rast závisí od nosiča. Medzi jednotlivými plodinami existuje variabilita, s ktorou sa stretne pri snahe vyvinúť prípravky na široké použitie.

Použitie fluorescenčných *Pseudomonas* ako PGPR a/, alebo biologických kontrolných činiteľov (BCA) si vyžaduje presné pochopenie interakcií medzi rastlinou a baktériami, medzi baktériami – mikrobiotou a ako biotický a abiotický faktor ovplyvňujú tento vzťah. V priebehu niekoľkých rokov moderné technológie, ako je imunofluorescenčná mikroskopia a reportérové gény, zlepšili štúdium inokulantov *Pseudomonas* v pôde a výrazne rozšírili poznatky o ich správaní v tomto prostredí. Napriek tomu je potrebné lepšie pochopiť reakciu rastlín na prítomnosť týchto vnesených baktérií (napr. prítomnosť vo vysokej koncentrácii, ako v inokulatoch). Dôležitým aspektom je charakterizácia rhizosférických populácií. Pochopenie dynamiky mikrobiálnych populácií by mohlo objasniť proces výberu úspešných kmeňov podporujúcich rast rastlín a/, alebo potláčajúcich choroby. Nedávny pokrok v štúdiách vnútrodruhovej a medzidruhovej signalizácie predstavuje dôležitú oblasť pre vedecký výskum, ako aj pre príslušné aplikácie. Pochopenie systémov quorum-sensing pri produkcii antifugálnych metabolitov a identifikácia promótorov, ktoré možno indukovať, alebo zvýšiť v rhizosfére, poskytujú nové prístupy pre vývoj nových biologických kontrolných činiteľov.

Ďalším dôležitým problémom je vplyv, ktorý môže masívne zavádzanie mikroorganizmov spôsobiť na pôdny ekosystém. Je dôležité vyhodnotiť možný vplyv na pôvodné spoločenstvá a z toho vyplývajúce účinky. Mnohé štúdie analyzovali vplyv a prežívanie a konkurenčnú schopnosť týchto mikroorganizmov. Mnohé stratégie na dosiahnutie kontroly chorôb rastlín pomocou mikroorganizmov ako biologických kontrolných činiteľov (BCA) priniesli významné úspechy. Listový biologický kontrolný prostriedok (*P. syringae* kmeň Cit7) a PGPR (*P. fluorescens* kmeň 89B-61) poskytli v poľných pokusoch významnú kontrolu bakteriálnej škvrnitosti a škvrnitosti rajčiaka. Tieto agronomické stratégie sú dôležité, pretože jedným z cieľov používania PGPR/BCA je, aby sa stali pre poľnohospodárov dôveryhodným a hodnotiteľným produktom. V dôsledku toho je neustále hľadanie nových prístupov na zlepšenie účinnosti PGPR/BCA úzko spojené s pochopením ekologických, genetických a biochemických vzťahov v ich biotope. Ide o stratégiu na dosiahnutie udržateľného poľnohospodárstva vo svete.

## **4 Mikrobiálna kontrola pozberových chorôb ovocia a zeleniny**

Značnú časť pozberových strát spôsobuje pozberová skaza ovocia a zeleniny. Odhaduje sa, že aj vo vyspelých krajinách je približne 20 - 25 % zozbieraného ovocia a zeleniny znehodnotených patogénmi počas pozberovej úpravy. V rozvojových krajinách sú pozberové straty často závažnejšie v dôsledku nedostatočných skladovacích a prepravných zariadení. Na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny sa používajú najmä syntetické fungicídy. Zdá sa však, že celosvetový trend



smeruje k obmedzeniu používania fungicídov na plodiny, a preto existuje silná snaha verejnosti a vedcov hľadať bezpečnejšie a ekologickejšie alternatívy na zníženie strát spôsobených hnilobou zberaných komodít. Spomedzi rôznych biologických prístupov je použitie mikrobiálnych antagonistov, ako sú kvasinky, huby a baktérie, pomerne sľubné a získava si popularitu.

Existujú dva základné prístupy využitia mikrobiálnych antagonistov na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny: (1) použitie mikroorganizmov, ktoré už existujú na samotnom produkte, ktoré možno podporovať a riadiť, alebo (2) tých, ktoré možno umelo zaviesť proti pozberovým patogénom.

#### 4.1 Prírodní mikrobiálni antagonisti

Prírodní antagonisti sú tie mikroorganizmy, ktoré sú prirodzene prítomné na povrchu ovocia a zeleniny a po izolácii sa používajú na kontrolu pozberových chorôb. Zistilo sa, že keď sa na agarové médium nanesú koncentrované výplachy z povrchu citrusových plodov, objavia sa len baktérie a kvasinky, zatiaľ čo po zriedení týchto výplachov sa na agare objavia viaceré plesne, čo naznačuje, že kvasinky a baktérie môžu potláčať rast húb. To teda naznačuje, že keď sa ovocie a zelenina umyjú, sú náchylnejšie na hnilobu ako tie, ktoré sa vôbec neumývajú.

#### 4.2 Umelo zavedení mikrobiálni antagonisti

Hoci prvým zaznamenaným použitím mikrobiálneho antagonistu bola kontrola Botrytisovej hniloby jahôd (*Fragaria x ananassa* Duch.) pomocou *Trichoderma* spp., prvou klasickou prácou bola kontrola hnedej hniloby kôstkovín pomocou *Bacillus subtilis*. Odvtedy bolo identifikovaných niekoľko antagonistov, ktorí sa používajú na kontrolu pozberových chorôb rôznych druhov ovocia a zeleniny. Umelé zavedenie mikrobiálnych antagonistov je pri kontrole pozberových chorôb ovocia a zeleniny účinnejšie ako iné prostriedky biologickej kontroly.

Bolo identifikovaných niekoľko mikrobiálnych antagonistov, ktorí boli umelo zavedení do rôznych zberaných komodít vrátane citrusových plodov, jadrového a kôstkového ovocia a zeleniny na kontrolu pozberových chorôb (Tabuľka 4.1). Napríklad účinná kontrola hniloby plodov citrusov bola pozorovaná s kvasinkami, ako sú *Pichia guilliermondii* Wiskerham, *Candida oleophila* Montrocher, *Candida sake* Saito and Ota, *Candida formata* Meyer a Yarrow, *Candida saitona* Nakase a Suzuki, *Debaryomyces hansenii* Lodder a Kre-Van Rij, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, *Pantoea agglomerans* (Ewing a Fife), *Saccharomyces cerevisiae* Hansen a *Metschnikowia fructicola* Kurtzman a Droby a *M. pulcherrima* Pittes a Miller. Kontrola hniloby citrusových plodov spôsobenej *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., a *Penicillium italicum* Wehmer bola tiež zaznamenaná pomocou bakteriálnych antagonistov, ako sú *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* Palleroni a Holmes, and *Pseudomonas syringae* Van Hall. Ukázalo sa tiež, že huboví antagonisti vrátane *Myrothecium roridum* Tode.:Fries a *Trichoderma viride* Persoon.:Fries, znižujú hnilobu citrusových plodov. *Trichoderma harzianum* Rifai bola účinná v boji proti antraknóze banánov a rambutánu (*Nephelium lappaceum* L.) a proti plesni sivej v hrozne, kivi a hruškách.

Biokontrolný potenciál mikrobiálnych antagonistov bol zaznamenaný aj na jadrovom a kôstkovom ovocí. Na jablkách a hruškách bola zaznamenaná kontrola hniloby spôsobenej *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. a *Penicillium expansum* Link pomocou bakteriálnych antagonistov *Pseudomonas cepacia* Burkh, *Pseudomonas syringae* Van Halt a *Pseudomonas fluorescens* Migula. Hniloba jablone bola kontrolovaná aj antagonistickými kvasinkami, ako sú *Candida sake* Saito a Ota, *Candida oleophila* Montrocher, *Candida saïtona* Nakase a Sutuki pozorovali, že *Cryptococcus infirmo-miniatu* (Okanuki) Phaff a Fell a *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner boli účinné pri kontrole hniloby jablone a hrušky spôsobenej *Botrytis cinerea* Pers: Fries a *Penicillium expansum* Link. Na kôstkovom ovocí rôzni mikrobiálni antagonisti znížili výskyt pozberových chorôb, ako sú hnedá hniloba, teplá pleseň, hniloba *Rhizopus* a hniloba *Penicillium*. Potenciál biokontroly niekoľkých ďalších mikrobiálnych antagonistov sa preukázal aj pri viacerých druhoch ovocia, ako sú banán, mango (*Mangifera indica* L.), liči (*Litchi chinensis* Sonn.), papája (*Carica papaya* L.), guajave (*Psidium guajava* L.), ananáse, hrozne, jahodách, avokáde, kivi (*Actinidia deliciosa* Ber.), jujube a zelenine, ako sú rajčiaky, kapusta (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), chilli (*Capsicum fruitsecence* L.) a zemiaky. Úspech niektorých z týchto mikrobiálnych antagonistov v laboratórnych štúdiách a pilotných testoch vykonaných v baliarňach vyvolal záujem viacerých agrochemických spoločností o vývoj a komercializáciu bioproduktov obsahujúcich mikrobiálnych antagonistov na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny. Niekoľko mikrobiálnych antagonistov bolo patentovaných a vyhodnotených na komerčné použitie, z ktorých ASPIRE, YieldPlus a BIOSAVE-110 sa používajú na celom svete na účinnú kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny.

**Tabuľka 4.1.** Mikrobiálni antagonisti používaní na úspešnú kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny

Antagonisti	Ochorenia (patogény)	Ovocie/zelenina
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Modrá pleseň ( <i>Penicillium expansum</i> ) a sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jablko
<i>Pantoea agglomerans</i>	Penicillium hniloba ( <i>Penicillium expansum</i> ) Zelená ( <i>Penicillium digitatum</i> ) a modrá pleseň ( <i>Penicillium italicum</i> ) Penicillium hniloba ( <i>Penicillium</i> spp.) Rhizopus hniloba ( <i>Rhizopus stolonifer</i> )	Jablko Citrus Citrus Hruška
<i>Penicillium</i> spp. (oslabené kmene)	Penicillium hniloba ( <i>Penicillium</i> spp.)	Ananás
<i>Penicillium frequentans</i> Westling	Hnedá hniloba ( <i>Monilinia</i> spp.)	Broskyňa
<i>Pestalotiopsis neglecta</i> (Thuemen) Steyaert	Antraknóza ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> )	Marhuľa
<i>Pichia anomala</i> (Hansen) Kurtzman	Penicillium hniloba ( <i>Penicillium</i> spp.) Hniloba koruny ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Citrus Banán
<i>Pichia guilliermondii</i>	Modrá pleseň ( <i>Penicillium expansum</i> ) Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> ) Zelená pleseň ( <i>Penicillium digitatum</i> ) Rhizopus hniloba ( <i>Rhizopus stolonifer</i> ) Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jablko Jablko Citrus Hrozno Hrozno

	Antraknóza ( <i>Colletotrichum capsici</i> (Syd.) Butler a Bisby)	Čili
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Rajčiak
	Alternaria hniloba ( <i>Alternaria alternata</i> )	Rajčiak
	Rhizopus hniloba ( <i>Rhizopus nigricans</i> )	Rajčiak
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroter) Migula	Bakteriálna mäkká hniloba ( <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> )	Kapusta
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Modrá pleseň ( <i>P. expansum</i> )	Jablko
	Mucor hniloba ( <i>Mucor piriformis</i> )	Jablko
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Hruška
	Modrá pleseň ( <i>Penicillium expansum</i> )	Hruška
	Zelená pleseň ( <i>Penicillium digitatum</i> )	Pomaranč
	Hnedá hniloba ( <i>Monilinia fructicola</i> )	Nektarinka
	Hnedá hniloba ( <i>Monilinia fructicola</i> )	Broskyňa
<i>Pseudomonas corrugata</i> Roberts a Scarlett	Hnedá hniloba ( <i>Monilinia fructicola</i> )	Broskyňa
	Hnedá hniloba ( <i>Monilinia fructicola</i> )	Nektarinka
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sivá pleseň ( <i>Botrytis mali</i> Ruehle)	Jablko
<i>Pseudomonas glathei</i>	Zelená pleseň ( <i>Penicillium digitatum</i> )	Citrus
<i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan) Migula	Mäkká hniloba ( <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> )	Zemiak
<i>Pseudomonas syringae</i>	Modrá pleseň ( <i>Penicillium expansum</i> )	Jablko
	Zelená a modrá pleseň ( <i>Penicillium digitatum</i> and <i>P. italicum</i> )	Citrus
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jablko
	Hnedá hniloba ( <i>Monilinia laxa</i> )	Broskyňa
<i>Pseudomonas</i> spp.	Hniloba koruny ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Banán
<i>Rhauella aquatilis</i>	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jablko
	Modrá pleseň ( <i>Penicillium expansum</i> )	Jablko
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Modrá pleseň ( <i>Penicillium expansum</i> )	Jablko
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jablko
	Alternaria hniloba ( <i>Alternaria alternata</i> )	Jujube
	Penicillium hniloba ( <i>Penicillium expansum</i> )	Jujube
	Modrá hniloba ( <i>Penicillium expansum</i> )	Hruška
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Hruška
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jahoda
<i>Trichoderma harzianum</i>	Antraknóza ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Banán
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Hrozno
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Kivi
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Hruška
	Antraknóza ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Rambutan
	Hnedá škvrna ( <i>Glioccephalotrichum microchlamydosporum</i> (Mey) Wiley a Simmons)	Rambutan
	Hniloba na konci stonky ( <i>Botryodiplodia theobromae</i> )	Rambutan
	Sivá hniloba ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jahoda
<i>Trichoderma viride</i>	Zelená hniloba ( <i>Penicillium digitatum</i> )	Citrus
	Hniloba na konci stonky ( <i>Botryodiplodia theobromae</i> )	Mango
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Jahoda
<i>Trichoderma</i> spp.	Kyslá hniloba ( <i>Geotrichum candidum</i> )	Citrus

	Hniloba ovocia spôsobená <i>Lasiobasidium theobromae</i> , <i>Phomopsis psidi</i> and <i>Rhizopus</i> spp.	Guava
	Hniloba ovocia ( <i>Lasiobasidium theobromae</i> and <i>Rhizopus</i> spp.)	Mango
<i>Trichosporon pullulans</i> (Lindner) Didlens a Lodder	<i>Alternaria</i> hniloba ( <i>Alternaria alternata</i> )	Čerešňa
	Sivá pleseň ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Čerešňa

### 4.3 Spôsob účinku mikrobiálnych antagonistov

Viacerí pracovníci preskúmali značné množstvo výskumov týkajúcich sa používania mikrobiálnych antagonistov. Mechanizmus, ktorými mikrobiálni antagonisti pôsobia na patogény, však ešte nie je úplne objasnený. Je dôležité pochopiť spôsob účinku mikrobiálnych antagonistov, pretože to pomôže pri vývoji niektorých ďalších prostriedkov a postupov na dosiahnutie lepších výsledkov známych antagonistov a pomôže to aj pri výbere účinnejších a žiaducejších antagonistov, alebo kmeňov antagonistov.

Na vysvetlenie biokontrolnej aktivity mikrobiálnych antagonistov bolo navrhnutých niekoľko spôsobov účinku (Table 4.2). Za hlavný spôsob účinku, ktorým mikrobiálne činidlá kontrolujú patogény spôsobujúce pozberovú hnilobu, sa stále považuje súťaž o živiny a priestor medzi patogénom a antagonistom. Okrem toho produkcia antibiotík (antibióza), priamy parazitizmus a prípadne indukovaná rezistencia sú ďalšie spôsoby pôsobenia mikrobiálnych antagonistov, ktorými potláčajú aktivitu pozberových patogénov na ovocí a zelenine.

#### Súťaž o priestor, živiny a miesto

Súťaž o výživu a priestor medzi mikrobiálnym antagonistom a patogénom sa považuje za hlavný spôsob účinku, ktorým mikrobiálni antagonisti potláčajú patogény spôsobujúce hnilobu zberaného ovocia a zeleniny. Aby mikrobiálny antagonista úspešne konkuroval patogénu v mieste poranenia, mal by byť lepšie prispôbený rôznym podmienkam prostredia a výživy ako patogén.

#### Priestor

Rýchla kolonizácia rany plodu antagonistom je rozhodujúca pre kontrolu hniloby a manipulácie vedúce k zlepšeniu kolonizácie zlepšujú biologickú kontrolu. Mikrobiálni antagonisti by teda mali mať schopnosť rásť rýchlejšie ako patogén. Podobne by mal mať schopnosť prežiť aj v podmienkach, ktoré sú pre patogén nepriaznivé. Biokontrolná aktivita mikrobiálnych antagonistov pri väčšine zberaných komodít sa zvyšovala so zvyšujúcimi sa koncentraciami antagonistov a znižujúcimi sa koncentraciami patogénu. Napríklad *Candida saïtona* bola účinná pri koncentrácii  $10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup> na kontrolu *Penicillium expansum* na jablkách. V inej štúdii sa uvádza, že v prípade *Candida saïtona* bola koncentrácia  $10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup> lepšia pri kontrole plesne modrej (*Penicillium expansum*) na jablkách. Tento kvalitatívny vzťah však do veľkej miery závisí od schopnosti antagonistov množiť sa a rásť v mieste rany. To sa preukázalo použitím mutanta *Pichia guilliermondii*, ktorý stratil svoju biokontrolnú aktivitu proti *Penicillium digitatum* na grapefruite a proti *Botrytis cinerea* na jablkách, aj keď sa na rany aplikovali koncentrácie až  $10^{10}$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Populácia buniek tohto

mutanta zostala v mieste rany počas inkubácie konštantná, zatiaľ čo populácia divokého typu sa v priebehu 24 hodín zvýšila 10- až 20-násobne.

## Upevnenie

Upevnenie mikrobiálneho antagonistu na hýfy patogénu sa zdá byť dôležitým faktorom potrebným na súťaženie o živiny, ako to dokazujú interakcie *Enterobacter cloacae* (Jordon) Hormaeche a Edwards a *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Lind a *Pichia guilliermondii* Wickerham a *Penicillium italicum* Wehmer. Štúdie *in vitro* vykonané na takýchto interakciách odhalili, že v dôsledku priameho pripojenia antagonistické kvasinky a baktérie prijímajú živiny rýchlejšie ako cieľové patogény, a tým zabraňujú klíčeniu spór a rastu patogénov.

**Tabuľka 4.2.** Navrhované spôsoby účinku niektorých mikrobiálnych antagonistov na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny

Komodita	Pozberová choroba	Antagonista
<i>I. Produkcia antibiotík</i>		
Jablko	Modrá pleseň	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	Mucor hniloba	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	Sivá pleseň	<i>Pseudomonas syringae</i>
Marhuľa	Hnedá hniloba	<i>Bacillus subtilis</i>
Čerešňa	Hnedá hniloba	<i>Bacillus subtilis</i>
	Alternaria hniloba	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Citrus	Kyslá hniloba	<i>Bacillus subtilis</i>
	Zelená pleseň	<i>Bacillus subtilis</i>
	Zelená pleseň	<i>Pseudomonas syringae</i>
	Hniloba na konci stonky	
Nektarinka	Kyslá hniloba	<i>Trichoderma spp</i>
	Hnedá hniloba	<i>Bacillus subtilis</i>
	Hnedá hniloba	<i>Pseudomonas corrupta</i>
Broskyňa	Hnedá hniloba	<i>Bacillus subtilis</i>
	Hnedá hniloba	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Hruška	Modrá pleseň	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	Sivá pleseň	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Slivka	Hnedá hniloba	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>II. Nutričná konkurencia (N) a/alebo indukcia rezistencie hostiteľa (HR)</i>		
Jablko	Modrá pleseň	<i>Pseudomonas cepacia (HR)</i>
	Sivá pleseň	<i>Acremonium brevae (HR)</i>
	Sivá pleseň	<i>Debaryomyces hansenii (N + HR)</i>
	Sivá pleseň	<i>Cryptococcus humicola Fricke (N)</i>
	Sivá pleseň	<i>Aureobasidium pullulans (N + HR)</i>
	Modrá pleseň	<i>Aureobasidium pullulans (N)</i>
Citrus	Modrá pleseň	<i>Aureobasidium pullulans (N + HR)</i>
	Zelená pleseň	<i>Debaryomyces hansenii (N + HR)</i>
	Modrá pleseň	<i>Debaryomyces hansenii (N + HR)</i>
Hrozno	Kyslá hniloba	<i>Debaryomyces hansenii (N + HR)</i>
	Sivá pleseň	<i>Debaryomyces hansenii (N)</i>
	Rhizopus hniloba	<i>Debaryomyces hansenii (N)</i>

	Sivá pleseň	<i>Aureobasidium pullulans</i> (N + HR)
	Modrá pleseň	<i>Aureobasidium pullulans</i> (N + HR)
	Rhizopus hniloba	<i>Aureobasidium pullulans</i> (N + HR)
Broskyňa	Rhizopus hniloba	<i>Enterobacter cloacae</i> (N)
Jahody	Sivá pleseň	<i>Cryptococcus laurentii</i> (N)
	Sivá pleseň	<i>Rhodotorula glutinis</i> (N)
Rajčiak	Rhizopus hniloba	<i>Debaryomyces hansenii</i> (N)
	Sivá pleseň	<i>Debaryomyces hansenii</i> (N)
	Alternaria hniloba	<i>Debaryomyces hansenii</i> (N)

Naopak, priama fyzikálna interakcia sa nezdala byť potrebná pre antagonistickú aktivitu *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud proti *Botrytis cinerea* Pers: Fries, *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* van Tieghem infikujúcim stolové hrozno (*Vitis vinifera* L.) a *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* na plodoch jablone (*Malus domestica* Borkh.). V týchto príkladoch nebol antagonizmus výsledkom priameho spojenia mikrobiálneho antagonistu (antagonistov) s hýfami patogénov, ale významnú úlohu pre antagonizmus mohli zohrávať iné mechanizmy, ako je antibiôza.

### Konkurencia o živiny

Výskumné práce vykonané v súvislosti s týmto spôsobom pôsobenia mikrobiálnych antagonistov podporujú hypotézu, že hlavnú úlohu v spôsobe pôsobenia *Pichia guilliermondii* proti *Penicillium digitatum* Pers: Fries) Sacc. v citrusových plodoch, *Enterobacter cloacae* proti *Rhizopus stolonifer* na broskyni [*Prunus persica* (L.) Batsch], *Cryptococcus laurentii* proti *Botrytis cinerea* na jabloni a *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison a *Cryptococcus laurentii* proti *Penicillium expansum* a *Botrytis cinerea*, resp. proti *Metschnikowia pulcherrima* Pitt a Miller na jabloni. *M. pulcherrima* konkuruje patogénom ako *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* na jabloni prostredníctvom vyčerpania železa. V dôsledku jej schopnosti potláčať pozberové choroby a odporučili ju ako potenciálnu kvasinku na kontrolu hniloby ovocia. Biokontrola plesne sivej (*Botrytis cinerea*) na jabloni pomocou *Metschnikowia pulcherrima* bola znížená, alebo úplne potlačená pridaním niekoľkých živín, čo naznačuje, že konkurencia o živiny zohráva úlohu v schopnosti biokontroly *Metschnikowia pulcherrima* proti *Botrytis cinerea*. Ďalej nepatogénne druhy *Erwinia*, ako napríklad *E. cyripedii* (Hori) Bergey, vykazovali antagonistickú aktivitu voči rôznym izolátom *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* (Jones) Bergey, pôvodcu mäkkej hniloby mnohých druhov zeleniny, ako je mrkva, rajčiaky (*Lycopersicon esculentum* L.) a paprika (*Capsicum annuum* L.), predovšetkým tým, že súťažili o živiny. Štúdiami *in vitro* sa preukázalo, že mikrobiálni antagonisti prijímajú živiny rýchlejšie ako patogény, usadzujú sa a inhibujú klíčenie spór patogénov v mieste rany.

### Populácie mikrobiálnych antagonistov

Úroveň kontroly, ktorú zabezpečujú mikrobiálni antagonisti, tiež veľmi závisí od počiatkovej koncentrácie antagonistov aplikovaných na miesto rany a od schopnosti antagonistu rýchlo kolonizovať miesto rany. Vo všeobecnosti sú mikrobiálni antagonisti najúčinnější pri kontrole pozberovej hniloby na ovocí a zelenine, ak sa aplikujú v koncentrácii  $10^7 - 10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup> a zriedkavo sú potrebné vyššie koncentrácie.

V súčasnosti sú k dispozícii len čiastkové údaje týkajúce sa interakcie medzi antagonistami a patogénmi z hľadiska súťaže o limitujúce živiny nevyhnutné pre patogenézu. Keď bude k dispozícii viac informácií týkajúcich sa špecifickosti konkurencie medzi antagonistami a patogénmi v ranách ovocia a keď budú charakterizované génové reakcie antagonizmu činiteľov biologickej kontroly, bude možné vyvinúť antagonistické škvrny s vyššou rýchlosťou transportu a/, alebo metabolizmu limitujúcich živín nevyhnutných pre patogenézu. To nám môže umožniť obísť niektoré obmedzenia mikrobiálnych antagonistov.

### **Produkcia antibiotík**

Produkcia antibiotík je druhým dôležitým mechanizmom, ktorým mikrobiálni antagonisti potláčajú patogény zberaného ovocia a zeleniny. Napríklad je známe, že bakteriálni antagonisti ako *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas cepacia* Burkholderia ničia patogény produkciou antibiotika iturínu. Takto produkovaný antagonizmus *Bacillus subtilis* bol účinný pri kontrole hubovej hniloby citrusov a *Monilinia fructicola* (Winter) pri broskyniach a čerešniach. Ďalej *Pseudomonas cepacia* inhibovala rast pozberových patogénov, ako sú *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* v jablkách, produkciou antibiotika pyrrolnitrínu. *Pseudomonas cepacia* bola účinná aj pri kontrole zelenej plesne (*Penicillium digitatum*) v citróne (*Citrus limon* L.) produkciou antibiotík. Podobne bakteriálny antagonista *Pseudomonas syringae* Van Hall kontroloval zelenú pleseň citrusov a sivú pleseň jablák produkciou antibiotika syringomycínu. Produkcia tohto antibiotika však nebola na ovocí a zelenine napriek rozsiahlemu úsiliu nikdy zistená, čo vyvoláva pochybnosti o úlohe antibiocy pri kontrole pozberových chorôb a naznačuje pôsobenie iného mechanizmu, ktorý nie je závislý od produkcie syringomycínu.

Hoci antibiocyza môže byť účinným nástrojom na kontrolu pozberových chorôb niektorých druhov ovocia a zeleniny, v súčasnosti sa kladie dôraz na vývoj neantibiotických mikrobiálnych antagonistov na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny. Výskumníci sa zameriavajú na izoláciu, hodnotenie, alebo vývoj takých antagonistických mikroorganizmov, ktoré kontrolujú pozberové choroby zberaných komodít mechanizmom konkurencie o priestor a živiny, priameho parazitizmu, alebo indukovanej rezistencie..

### **Priamy parazitizmus**

V literatúre je veľmi málo informácií o priamom parazitovaní mikrobiálnych antagonistov pri kontrole pozberových chorôb ovocia a zeleniny. Bolo však zistené, že zatiaľ čo bunky *Pichia guilliermondii* mali schopnosť prichytiť sa na hýfy *Botrytis cinerea* a *Penicillium*. Po odstránení buniek kvasiniek z hýf sa povrch hýf javil ako konkávny a v miestach prichytenia došlo k čiastočnej degradácii bunkovej steny *Botrytis cinerea*. Naopak, pri spoločnej kultivácii *Botrytis cinerea* s neantagonistickými kvasinkami sa vytvorila len voľná väzba na hubu bez jamiek v hýfách. Podobne *Candida saitonae* Nakase a Suzubi sa silne prichytila na hýfy *Botrytis cinerea* a spôsobila napučanie.

Mikrobiálni antagonisti tiež produkujú lytické enzýmy, ako sú glukonáza, chitináza a proteínázy, ktoré pomáhajú pri degradácii bunkovej steny patogénnych húb, uviedli, že priamy parazitizmus bol hlavným faktorom, ktorý umožnil *Pantoea agglomerans* (Ewing a Fife) Gavini et al. kontrolovať rozklad *Monilinia laxa* (Aderh.

a Ruhl.) Honey, alebo *Rhizopus stolonifer* na kôstkoviciach. Silná väzba mikrobiálneho antagonistu so zvýšenou aktivitou enzýmov rozkladu bunkovej steny môže byť teda zodpovedná za zvýšenie účinnosti mikrobiálnych látok pri kontrole pozberových chorôb ovocia a zeleniny. A väzba mikrobiálnych antagonistov na mieste zvyšuje ich potenciálnu aktivitu pri využívaní živín v mieste invázie; čiastočne ovplyvňuje aj prístup patogénu k živinám.

### Indukovaná rezistencia

Indukcia obranných reakcií v zozbieranom ovocí a zelenine mikrobiálnymi antagonistami bola navrhnutá a preukázaná ako ďalší spôsob účinku mikrobiálnych antagonistov na kontrolu ich pozberovej hniloby. Napríklad *Cryptococcus saitoana* indukoval aktivitu chitinázy a vytvoril štruktúrnu bariéru (papily) na bunkových stenách hostiteľa v jablku proti *Penicillium expansum*. Podobne *Aureobasidium pullulans* spôsobilo prechodné zvýšenie aktivity enzýmov 1,3-glukonázy, peroxidázy a chitinázy v ranách jablák, čo stimulovalo procesy hojenia rán a indukovalo obranné mechanizmy proti *Penicillium expansum*. Indukcia reakcií na odolnosť voči chorobám bola zaznamenaná aj v ananáse, avokáde a citrusových plodoch.

Mikrobiálni antagonisti vyvolali odolnosť zberaných komodít voči chorobám produkciou antifungálnych zlúčenín, ako napríklad v plodoch avokáda (*Persea americana* Mill), a akumuláciou fytoalexínov, ako napríklad scoparone a scopoletin v citrusových plodoch. Produkcia takýchto antifungálnych zlúčenín mikrobiálnymi antagonistami v hostiteľských bunkách pomáha indukovať obranný mechanizmus, a tým zabezpečuje biologickú kontrolu zberaných komodít. Hoci príčinná súvislosť medzi akumuláciou obranných reakcií hostiteľa a bioprotekciou antagonistickými kvasinkami ešte nebola jasne stanovená, výskyt vysokých hladín antifungálnych zlúčenín hostiteľa v chránenom tkanive naznačuje ich vplyv na odolnosť voči chorobám. Sú potrebné podrobné štúdie týkajúce sa dôsledkov indukovaných obranných reakcií v bioprotekcii mikrobiálnymi antagonistami. Pri poraneniach ovocia niektorí mikrobiálni antagonisti často produkujú veľké množstvo mimobunkového slizu pozdĺž bunkových stien hostiteľa. Predpokladá sa, že tento mimobunkový sliz sa podieľa na adhezii buniek a môže obsahovať aktívne chemické elicitory, ktoré poskytujú signály na rozpoznanie a následné reakcie, čím zabezpečujú obranný mechanizmus. Ďalej je známe, že oligosacharidové fragmenty polysacharidov bunkových stien kvasiniek sú aktívnymi elicitorami obranných reakcií hostiteľa.

## 4.4 Zavádzanie mikrobiálnych antagonistov

Na zavedenie mikrobiálneho antagonistu na účinnú kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny je potrebných mnoho faktorov. Z rôznych štúdií vyplýva, že mikrobiálny prostriedok by sa mal zaviesť do miesta poranenia pred príchodom patogénu. Napríklad *Trichoderma viride* Pers.: Fries bol účinný pri kontrole *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffith a Maubl v plodoch banánovníka (*Musa* spp.) len vtedy, keď bol zavedený 4 hodiny pred inokuláciou patogénu; inak nebol vôbec účinný. Ďalším faktorom, ktorý je rovnako dôležitý pre účinnosť mikrobiálneho antagonistu, je prítomnosť vlhkosti v miestach poranenia. Napríklad antagonistická kvasinka *Candida oleophila* Montrocher bola účinná pri kontrole *Botrytis cinerea*



v jabloni len vtedy, keď bola aplikovaná do čerstvých rán, ale keď neskôr v rane ovocia zaschla vlhkosť, stala sa limitujúcim faktorom pre rast kvasinky, a teda aj pre kontrolu. Okrem toho by mal mať mikrobiálny antagonista určité žiaduce vlastnosti, aby spĺňal základné požiadavky biologickej kontroly, ako sa uvádza ďalej.

#### 4.5 Kritériá pre ideálneho antagonistu

Potenciálny mikrobiálny antagonista by mal mať určité žiaduce vlastnosti, aby sa stal ideálnym bioagensom: Antagonista by mal byť: (a) geneticky stabilný; (b) účinný pri nízkych koncentráciách; (c) nenáročný na výživu; (d) schopný prežiť v nepriaznivých podmienkach prostredia; (e) účinný proti širokému spektru patogénov a rôznym zberaným komoditám; (f) odolný voči pesticídom; (g) neprodukuje metabolity škodlivé pre človeka; (h) nepatogénny pre hostiteľa; (i) pripraviteľný vo forme, ktorá sa dá účinne skladovať a vydávať; a (j) kompatibilný s inými chemickými a fyzikálnymi ošetreniami. Okrem toho by mal mať mikrobiálny antagonista adaptačnú výhodu oproti špecifickému patogénu. Napríklad *Rhizopus stolonifer* je citlivejší na nízku teplotu ako mnohé iné patogény. Preto by mal mať mikrobiálny antagonista na účinnú kontrolu schopnosť rásť, množiť sa a potláčať patogén pri nízkej teplote. Podobne bola *Candida oleophila* spolu s dikloranom účinná na zníženie výskytu *Penicillium expansum* a *Rhizopus rot* v nektárinke aj v podmienkach skladovania v riadenej atmosfére. Väčšina jadrového ovocia sa skladuje v chladiarenských skladoch. Preto by mal mať mikrobiálny antagonista schopnosť prežívať aj v podmienkach chladného skladovania, aby bolo možné uspokojivo kontrolovať ich choroby po zbere. Vzhľadom na tieto faktory sa v mnohých krajinách preorientovali výskumné práce na používanie mikrobiálnych antagonistov na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny. V súlade s tým bol izolovaný nový kmeň *Candida sake* Saito a Ota, ktorý kontroloval *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* a *Rhizopus stolonifer* aj v rôznych podmienkach skladovania. Avšak aj keď má antagonista všetky žiaduce vlastnosti, ekonomický faktor rozhoduje o tom, či sa má komercializovať, alebo nie. Ak pre výrobok neexistuje potenciálny trh, nemôže sa komercializovať.

#### 4.6 Antagonistické prípravky

Iba niekoľko mikrobiálnych antagonistov, o ktorých sa uvádza, že v laboratórnych podmienkach kontrolujú pozberové choroby ovocia a zeleniny, bolo komerčne využitých. Dôvodov môže byť mnoho, ale dve hlavné prekážky, ktoré tomu bránia, sú: (a) relatívna neúčinnosť antagonistov v porovnaní s chemickými kontrolnými postupmi a b) nedostatok ekonomických stimulov. Po identifikácii účinného antagonistu sa však začne hľadať metodika jeho prípravy, skladovania a aplikácie. Napríklad *Bacillus subtilis* (kmeň B-3) bol prvým organizmom patentovaným ako biokontrolný prostriedok po zbere kôstkového ovocia v USA. Uskutočnil sa pilotný test s použitím *Bacillus subtilis* v simulovaných komerčných podmienkach na kontrolu hnedej hniloby broskýň, pri ktorom sa bioagens účinne zapracoval do vosku bežne používaného na baliacej linke. Botrytisová hniloba bola týmto postupom účinne kontrolovaná, ale zistili sa značné rozdiely v kontrole, ktorú zabezpečovali rôzne

prípravky antagonistov. Na vývoj prípravkov mikrobiálnych antagonistov sú však potrebné priemyselné skúsenosti. Bolo vyvinutých a komercializovaných niekoľko komerčných produktov. Napríklad "BioSave" bol vyvinutý zo saprofytického kmeňa *Pseudomonas syringae* spoločnosťou "EcoScience" Corp., Orlando, USA, ktorý je veľmi užitočný na kontrolu modrej a sivej plesne na jablkách a hruškách (*Pyrus communis* L.). S cieľom vybudovať dôveru vo výrobok v rámci ovocinárskeho priemyslu sa tieto pilotné testy uskutočnili v komerčných baliarňach. K úspechu tohto výrobku prispela aj rozsiahla technická podpora a kontrola kvality. Komerčné využitie prípravku Biosave na kontrolu pozberových chorôb v rôznych kútoch sveta sa každým dňom zvyšuje. Spoločnosť Ecogen-Israel Partnership Ltd. vyvinula "Aspire" z kvasiniek *Pichia guilliermondii*, predtým označovaných ako *Debaryomyces hansenii*. Prvý výskum tohto výrobku a pilotný test vykonaný v komerčnej baliacej linke ukázal, že v kombinácii s 10-násobne zriedeným tiabendazolom (200 µg.ml<sup>-1</sup>) zabezpečuje 100 % kontrolu pozberových chorôb citrusov.

Podobný výskum sa uskutočnil s kvasinkovým antagonistom *Candida oleophila*, ktorý bol predtým opísaný ako *Candida sake*. Testy vykonané v komerčných baliarňach citrusov poskytli uspokojivú kontrolu zelených a modrých plesní a kyslej hniloby len v kombinácii s 10-násobne zriedeným tiabendazolom. Výskum a komerčný vývoj "YieldPlus" na biologickú kontrolu hniloby ovocia prebieha podľa rovnakého vzoru, aký bol opísaný pre "Aspire", alebo *Candida oleophila*. Vývoj "Avogreen" z tohto bacilu prebiehal mierne odlišným spôsobom v tom, že bol testovaný v teréne na biokontrolu. Bol pripravený z *Bacillus subtilis* a použitý v Južnej Afrike na kontrolu druhov *Cercospora* a antraknózy avokáda. V posledných rokoch boli vyvinuté ďalšie produkty, ako napríklad "Shemer", ktorý je účinný proti niektorým pozberovým chorobám ovocia.

#### 4.7 Kvasinky: Ako potenciálni mikrobiálni antagonisti

Mnohé druhy kvasiniek sa považujú za potenciálnych mikrobiálnych antagonistov a zaslúžia si osobitnú zmienku. Pri odporúčaní kvasiniek ako potenciálnych mikrobiálnych činiteľov na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny sa uvádza niekoľko pozitívnych bodov vrátane: a) kvasinky môžu kolonizovať povrch na dlhé obdobie aj v suchých podmienkach; b) kvasinky produkujú mimobunkové polysacharidy, ktoré zvyšujú ich schopnosť prežitia a obmedzujú rast patogénnych propagúl; c) môžu rýchlo využívať živiny a rýchlejšie sa množiť; d) najmenej na ne pôsobia pesticídy. Spomedzi rôznych kvasiniek vykazuje *Debaryomyces hansenii* široké spektrum biologickej aktivity proti mnohým patogénom. Nedávny výskum sa však zameril na použitie niekoľkých ďalších kvasiniek na kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny.

#### 4.8 Metódy aplikácie mikrobiálnych antagonistov

Po identifikácii, alebo výbere účinného a potenciálneho antagonistu je potrebné hľadať metódu, ktorá ho účinne použije na kontrolu, alebo potlačenie patogénu. Vo všeobecnosti sa mikrobiálni antagonisti aplikujú dvoma rôznymi spôsobmi, t. j. aplikáciou pred zberom a po zbere.

## Aplikácia pred zberom úrody

Vo viacerých prípadoch patogény napadnú ovocie a zeleninu na poli a tieto latentné infekcie sa stávajú hlavným faktorom hniloby počas prepravy, alebo skladovania ovocia a zeleniny. Preto je aplikácia mikrobiálnych antagonistických kultúr pred zberom často účinná na kontrolu pozberovej hniloby ovocia a zeleniny. Účelom predskladovej aplikácie je predkolonizovať povrch ovocia antagonistom bezprostredne pred zberom, aby rany spôsobené počas zberu mohli byť kolonizované antagonistom skôr, ako dôjde ku kolonizácii patogénom. Hoci sa tento prístup nemohol stať komerčne životaschopným z dôvodu slabého prežívania mikrobiálnych antagonistov v poľných podmienkach, v niektorých prípadoch bol však pomerne úspešný. Napríklad antagonisti *Cryptococcus infirmo-miniatius* (Okanuki) Phaff a Fell, *Cryptococcus laurentii* a *Rhodopholus glutinis* (Fresenius) Harrison aplikovaní na hrušky "d Anjou" a "Bosc" v teréne 3 týždne pred zberom znížili výskyt plesne sivej na hruškách "Bosc" z 13 % na 4 % a na hruškách "d Anjou" zo 7 % na takmer 1 %. *Candida sake* CPA-1 znížila výskyt modrej plesne na poranených jablkách takmer o 50 %, ak boli jablká inokulované antagonistom 2 dni pred zberom a inokuláciou *Penicillium expansum* a skladovaním v chlade počas 4 mesiacov. Hoci je ťažké kontrolovať choroby jahôd po zbere úrody aj pomocou fungicídov pred zberom, určité úspechy sa dosiahli pri poľnej aplikácii rôznych mikrobiálnych antagonistov, ako sú *Gliocladium roseum* Bainier, *Trichoderma harzianum* a *Epicoccum nigrum* Link. Najvyššia úroveň kontroly sa však dosiahla pri aplikácii pyrrolnitrínu, sekundárneho metabolitu produkovaného *Pseudomonas cepacia*. Aplikácia prípravku *Metschnikowia fructicola* Kurtzman a Droby pred zberom samotného, alebo v kombinácii s etanolom, alebo hydrogenuhličitanom sodným významne kontrolovala pozberové choroby hrozna v porovnaní s kontrolou. Postrek *Metschnikowia fructicola* Kurtzman a Droby pred zberom bol účinný aj pri kontrole hniloby plodov pred zberom a po zbere u jahôd. Podobne predskladová aplikácia prípravku *Aureobasidium pullulans* výrazne znížila výskyt skladových hnilob jahôd, hrozna, čerešní a jabĺk. A výskyt zelenej plesne (*Penicillium digitatum*) na grapefruite sa znížil predskladovým postrekom *Pichia guilliermondii*. V prípade citrusov aplikácia kvasinky *Pantoea agglomerans* CPA-2 pred zberom účinne kontrolovala pozberové hniloby v laboratórnych podmienkach. Podobne aplikácia *Cryptococcus laurentii* a *Candida oleophila* pred zberom úrody znížila výskyt skladovacích hnilob v hruške. Poľná aplikácia *Epicoccum nigrum* sa ukázala ako účinná pri kontrole hnedej hniloby po zbere úrody (*Monilinia* spp.) na broskyniach. Nedávno sa zistilo, že aplikácia rôznych koncentrácií *Pantoea agglomerans* pred zberom úrody bola účinná pri ochrane pomarančov (*Citrus sinensis* L. Obseck.) proti *Penicillium digitatum* počas skladovania. Zdá sa však, že tento prístup má ešte veľa obmedzení a v komerčnej praxi sa používa len pri avokáde.

## Aplikácia po zbere úrody

Z dostupnej literatúry vyplýva, že aplikácia mikrobiálnych antagonistov po zbere úrody je lepšou, praktickou a užitočnou metódou kontroly pozberových chorôb ovocia a zeleniny. Pri tejto metóde sa mikrobiálne kultúry aplikujú buď ako pozberové postreky, alebo ako ponorenie do roztoku antagonistu. Tento prístup je účinnejší ako aplikácia mikrobiálnych antagonistov pred zberom úrody a má niekoľko úspechov. Napríklad pozberová aplikácia *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Gliocladium roseum* a *Paecilomyces variotii* Bainier viedla k lepšej kontrole botrytisovej

hniloby na jahodách a alternariovej hniloby na citrónoch ako pred zberová aplikácia. Pri citrónoch bola pozberová aplikácia *Pseudomonas variotii* účinnejšia pri kontrole aspergillusovej hniloby ako ošetrenie iprodionom a pri zemiakoch (*Solanum tuberosum* L.) pozberová aplikácia *Trichoderma harzianum* účinne kontrolovala fusarióvu hnilobu ako ošetrenie benomylovým dipom. Niektoré kmene *Trichoderma* sú však patogénne pre podmienky zberu, čo obmedzuje ich možné použitie len na niekoľko kmeňov. Výrazné zníženie skladištnej hniloby sa dosiahlo tým, že sa niekoľko druhov kvasiniek dostalo do priameho kontaktu s ranami v šupke zberaných plodov. Napríklad priamy kontakt mikrobiálneho antagonistu a napadnutej šupky ovocia bol celkom užitočný na potlačenie patogénov, ako sú *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* u citrusov; *Botrytis cinerea* u jabĺk, *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* u hrušiek a *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* a *Alternaria alternata* u rajčiakov. Všetky patogény však nereagujú na daný antagonista podobným spôsobom.

#### 4.9 Zvýšenie biologickej účinnosti mikrobiálnych antagonistov

Mikrobiálni antagonisti, ak sa aplikujú samostatne, zvyčajne neprinášajú 100 % kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny. Na zvýšenie ich účinnosti a zvýšenie ich biologickej účinnosti boli užitočné tieto prístupy.

##### Manipulácie s fyzikálnym a chemickým prostredím počas skladovania

Ovocie a zelenina sa zvyčajne skladujú pri vopred stanovenej teplote, relatívnej vlhkosti a v kombinácii plynov počas rôznych období s hlavným cieľom zachovať kvalitu, aby sa splnili požiadavky trhu. Mikrobiálni antagonisti sa skrývajú na ich schopnosť rýchlo sa vyvíjať v požadovaných skladovacích podmienkach a vyberajú sa len tí mikrobiálni antagonisti, ktorí spĺňajú základné požiadavky. Úprava prostredia pri skladovaní však môže byť užitočnou stratégiou na zvýšenie účinnosti mikrobiálnych antagonistov, keďže je možné manipulovať s fyzikálnym a chemickým prostredím v prospech mikrobiálnych antagonistov pri skladovaní. Tieto manipulácie by však mali byť také, aby neovplyvňovali kvalitu produktu a aby boli vhodné na zavedenie mikrobiálneho antagonistu. Ovocie a zelenina sa často ošetrujú a/, alebo sa s nimi manipuluje vo vode pred, počas a po skladovaní, čo poskytuje vynikajúcu príležitosť na úpravu prostredia. Dusík je pravdepodobne limitujúcou živinou v prostredí bohatom na uhlík v ranách jabĺk a hrušiek, ktorý možno zvýšiť pridaním l-asparagínu a l-prolínu na zvýšenie populácie mikrobiálneho antagonistu *Pseudomonas syringae*. Toto ošetrenie úplne zabránilo hnilobe plesne modrej v porovnaní s 50 % hniloby v kontrole. Biologická účinnosť *Candida sake* proti *Penicillium expansum* na jablkách sa výrazne zvýšila prídavkom l-serínu a l-asparagínových dusíkatých zlúčenín. V chladiarenských skladoch prídavok molybdanu amónneho do *Candida sake* úplne eliminoval výskyt modrej plesne na hruškách a znížil závažnosť a výskyt ochorenia o viac ako 80 % na jablkách. Podobne aplikácia *Candida sake* ( $2 \cdot 10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) plus molybdén amónny (5 mM.l<sup>-1</sup>) výrazne znížila populáciu *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* a *Rhizopus stolonifer* na jablkách skladovaných pri 20 °C počas 7 dní a znížila výskyt modrej a sivej plesne o viac ako 90 % na jablkách skladovaných pri 1 °C počas 60 dní. Bola preukázaná prednostná stimulácia rastu biokontrolného činiteľa živným analógom 2-deoxy-d-glukózy (2 DOG). Vývoj antagonistov *Pseudomonas syringae*,

*Sporobolomyces roseus* Kluver a van Niel a *Candida saïtona* bol zvýhodnený pridaním 2 DOG. Kombinovaná aplikácia *Candida saïtona* a 2 DOG bola rovnako účinná ako fungicíd imazalil pri kontrole modrej plesne jabĺk a zelenej plesne pomarančov a citrónov. Postrek suspenzie *Candida saïtona* ( $10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) plus 2 DOG (0,2 %) na jablká 'Rome' a 'Empire' znížil hnilobu spôsobenú *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* účinnejšie ako pri použití tiabendazolu (TBZ). Na druhej strane, úroveň kontroly *Penicillium digitatum* na pomarančoch "Washington", "Valencia" a "Hamlin" bola v želateľnej miere, alebo nižšia ako ošetrovanie imazalilom. Účinnosť *Rhodotorula glutinis* proti *Penicillium expansum* sa zvýšila pridaním sideroforov. Prídavok siderofórov znižuje hnilobu sekvestráciou železa potrebného na klíčenie niektorých pozberových patogénov. Biologická účinnosť *Pseudomonas syringae* na kontrolu korunkovej hniloby a antraknózy sa výrazne zvýšila prídavkom nízkych dávok tiabendazolu, alebo imazalilu (250 µg.ml<sup>-1</sup>), ktoré priniesli kontrolu podobnú vyšším dávkam fungicídov.

### **Používanie zmesných kultúr**

Biologická kontrola pozberových chorôb pomocou mikrobiálnych antagonistov je alarmujúcou oblasťou a za posledné dve desaťročia zaznamenala veľký pokrok. Bolo však ťažké vybrať individuálny mikrobiálny kmeň so širokým spektrom aktivity proti hlavným pozberovým patogénom, ktorý by bol účinný pri použití na ovocí a zelenine. Preto sú potrebné kompatibilné kmene, ktoré poskytnú potrebné spektrum aktivity na účinnú kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny. Použitie zmesí mikrobiálnych antagonistov má určité výhody:

1. Rozšírenie spektra mikrobiálnej aktivity, ktoré vedie ku kontrole dvoch, alebo viacerých pozberových chorôb.
2. Zvýšenie účinnosti v rôznych situáciách, ako sú odrody, štádiá zrelosti a lokality.
3. Zvýšenie účinnosti a spoľahlivosti biokontroly, keďže zložky zmesí pôsobia prostredníctvom rôznych mechanizmov, ako je antagonizmus, parazitizmus a indukcia rezistencie u hostiteľa.
4. Kombinácia rôznych znakov biologickej kontroly bez prenosu cudzích génov prostredníctvom genetickej transformácie.

Zvýšenie biologickej účinnosti mikrobiálnych antagonistov môže byť spôsobené: lepším využitím substrátu, čo vedie k zrýchleniu rastu; odstránením látok inhibujúcich jeden organizmus druhým mikrobiálnym činiteľom; produkciou živín jedným mikroorganizmom, ktoré môže využiť iný mikroorganizmom; a vytvorením stabilnejšieho mikrobiálneho spoločenstva, ktoré môže vylúčiť iné mikroorganizmami vrátane patogénov. Pri výbere zložiek antagonistických zmesí je ďalej potrebné zohľadniť určité atribúty vrátane: (1) neprítomnosti antagonizmu medzi jedným mikrobiálnym antagonistom voči druhému a (2) výberu zložiek s pozitívnymi interakciami (mutualizmus), ktoré umožňujú efektívnejšie využívanie zdrojov. Praktický prístup k výberu zložiek zmesí spočíva v hodnotení činiteľov biologickej kontroly so zmesou mnohých antagonistov a v odstránení neúčinných, alebo nekompatibilných.

Použitie zmiešaných kmeňov mikrobiálnych antagonistov je náročná práca, pretože mikroorganizmy majú rôzne rastové návyky a požiadavky na výživu a kultúrne podmienky. Aj v tejto oblasti sa však dosiahli určité úspechy. Napríklad sa ukázalo, že kombinácia baktérií *Pseudomonas syringae* a kvasiniek *Sporobolomyces roseus* má

výraznú výhodu oproti každému z antagonistov pri kontrole *Penicillium expansum* na jabloni, a to pri znižovaní výskytu infekcií rán a pri obmedzovaní priemeru hniloby. Výhoda antagonistických dvojíc oproti jednému antagonistovi bola opísaná pri kontrole suchej hniloby spôsobenej *Fusarium* (*Gibberella pulcaris* Hohn a Desjardins) v skladovaných zemiakoch. Čiernu hnilobu ananásu (*Ananas comosus* L. Merrill) spôsobenú *Ceratomyces paradoxa* (Dade) Moreau bolo možné kontrolovať kvasinkou *Pichia guilliermondii*, jej kombinácia s piatimi izolátmi kvasiniek bola ešte účinnejšia a úroveň kontroly bola porovnateľná so súčasnou priemyselnou praxou držania plodov pri nízkej teplote (8 – 10 °C). Pomocou zmesi *Aureobasidium pullulans* ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) a *Bacillus subtilis* ( $10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) sa *Penicillium expansum* a *Botrytis cinerea* kontrolovali na úrovni, ktorú zabezpečoval fungicíd. Antagonistická zmes pozostávajúca z *Candida sake* CPA-1 ( $2 \cdot 10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) a *Pantoea agglomerans* ( $2 \cdot 10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) úplne kontrolovala priemer hniloby na hruške "Blanquilla" a priniesla maximálnu kontrolu modrej plesne na jablkách "Golden Delicious". V podmienkach prirodzenej infekcie bolo namáčanie hrozna do bunkovej suspenznej kultúry *Kloeckera* a *Candida* účinné pri kontrole hniloby spôsobenej hubou *Rhizopus*, ale nemalo žiadny účinok na hnilobu spôsobenú hubou *Aspergillus niger* počas skladovania.

Účinnosť antagonistu je ovplyvnená koncentráciou kvasinkových buniek v rane a počtom spór patogénu použitých na inokuláciu. Napríklad pri inokulácii rany vyššou koncentráciou spór *Botrytis* ( $10^6$  spór.ml<sup>-1</sup>) sa znížilo percento infekcie len pri najvyššej koncentrácii kvasiniek ( $10^9$  buniek.ml<sup>-1</sup>) a naopak. Podobne najlepšia aktivita spór *Trichoderma* sa dosiahla pri vyšších koncentráciách antagonistu a pri nižších úrovniach inokulácie patogénu. Na jabloni bolo pri aplikácii mikrobiálnych antagonistov v zmesiach kontrolované širšie spektrum patogénov ako pri aplikácii jednotlivých mikrobiálnych kmeňov. Na zemiakoch dvojice antagonistov účinne kontrolovali suchú hnilobu *Fusarium* v porovnaní s ich samostatným použitím. Zmiešané kultúry *Candida sake* a *Pantoea agglomerans* poskytli lepšiu kontrolu modrej a sivej plesne na jabloni aj hruške ako ich samostatné použitie. Veľmi nedávno bolo oznámené, že zmiešané kultúry *Metschnikowia pulcherrima* a *Cryptococcus laurentii* vykazovali väčšiu aktivitu biokontroly na plesni modrej (*P. expansum*) ako ktorákoľvek z kvasiniek aplikovaná samostatne, v kombinácii s uhličitanom sodným, alebo hydrogenuhličitanom v pilotnom teste vykonanom na citrusových plodoch v kontrolovanej atmosfére. Hoci použitie antagonistických zmesí ponúka účinnejšiu kontrolu, ekonomická životaschopnosť tohto prístupu sa javí ako hlavná prekážka jeho prijatia, keďže registrácia dvoch mikrobiálnych antagonistov spôsobí ďalšiu záťaž pre priemysel.

### **Pridanie nízkych dávok fungicídov do mikrobiálnych kultúr**

Niektoré fungicídy, ako napríklad imazalil a tiabendazol, boli mimoriadne účinné pri kontrole pozberových chorôb; je pomerne ťažké nájsť mikrobiálnych antagonistov, ktorí by boli rovnako účinní. Preto je potrebné venovať osobitné úsilie spôsobom, ako zvýšiť účinnosť mikrobiálnych antagonistov. Jedným z prístupov je kombinácia mikrobiálnych antagonistov s fungicídmi. Kompatibilita medzi mikrobiálnym antagonistom a syntetickým fungicídmi ponúka možnosť používať antagonistov v kombinácii so zníženým množstvom fungicídu. V súčasnosti sa týmto prístupom dajú účinne kontrolovať aj pozberové choroby ovocia a zeleniny. Boli napríklad vyvinuté niektoré prípravky na biologickú kontrolu, ktoré poskytujú takmer 100 % kontrolu pozberových chorôb, ak sa k nim pridajú aj nízke dávky syntetických fungicídov.

Aplikácia *Pichia guilliermondii* na citrusové plody v kombinácii s podstatne zníženou koncentráciou tiabendazolu (TBZ) znížila hnilobu *Penicillium digitatum* na podobnú úroveň, aká sa dosahuje pri aplikácii samotného TBZ v súčasnosti odporúčanej koncentrácii, čo pomáha udržiavať veľmi nízku úroveň chemických rezíduí v plodoch. Zmiešanie *Pseudomonas syringae* s nízkymi dávkami cypronidilu prinieslo účinnú kontrolu hniloby spôsobenej *Penicillium expansum* na jablkách a hniloba hrušiek v sklade sa výrazne znížila kombináciou nízkych dávok fungicídov s biokontrolným činidlom, tiež sa zaznamenala kontrola modrej plesne na jablkách a hnedej hniloby na hruškách, keď sa použili kvasinky s nízkou dávkou fungicídu. Podobne aj hniloba plodov na citrusoch bola účinne kontrolovaná pomocou *Candida oleophila* + tiabendazol, čo je porovnateľné s komerčným ošetrením fungicídmi. Pri modrej a sivej plesni na jablkách sa dosiahla viac ako 90 % kontrola ošetrením plodov *cypronidilom* (20 ‰) a *Pseudomonas syringae* ( $3 \cdot 10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup>). Podobne ošetrenie *Cryptococcus laurentii* + imazalil (25 ‰) bolo vysoko účinné pri kontrole skladovacích hnilob na jujube ako použitie samotného *Cryptococcus laurentii*, alebo *imazalilu*.

### **Pridanie prísad soli do mikrobiálnych kultúr**

Prísady soli tiež zlepšujú biologickú účinnosť niektorých mikrobiálnych antagonistov pri kontrole pozberovej hniloby ovocia a zeleniny. Spomedzi rôznych prísad soli sa pri použití s mikrobiálnymi antagonistami na účinnejšiu kontrolu pozberových chorôb ovocia a zeleniny zistilo, že veľmi úspešné sú chlorid vápenatý, propionát vápenatý, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, metabisulfit draselný, etanol a molybdén amónny atď. Účinnosť mikrobiálnych antagonistov však závisí od koncentrácie antagonistu, koncentrácie prídavnej soli, ich vzájomnej kompatibility a trvania a času, kedy sa aplikujú. Zvyčajne by sa kultúry mali aplikovať v dostatočnom predstihu pred začiatkom infekčného procesu.

### **Pridávanie živín a rastlinných produktov do mikrobiálnych kultúr**

Účinnosť mikrobiálnych antagonistov sa môže výrazne zvýšiť aj pridaním niektorých výživných látok, alebo prírodných rastlinných produktov. Napríklad prídavky dusíkatých zlúčenín, ako sú l-aspargin a l-prolín, a 2-deoxy-d-glukóza, analóg cukru, pomohli zvýšiť biologickú účinnosť mikrobiálnych antagonistov pri kontrole pozberovej hniloby niektorých druhov ovocia a zeleniny. Pri aplikácii do rán na ovocie kombinácia *Candida saïtona* a 2-deoxy-d-glukózy (0,2 %) kontrolovala hnilobu ovocia na jablkách, pomarančoch a citrónoch spôsobenú *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* a *Penicillium digitatum*, ako keď sa aplikovala samotná *Candida saïtona*, alebo 2-deoxy-d-glukóza. Ošetrenie broskýň *Cryptococcus laurentii* ( $1 \cdot 10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) samostatne, alebo v kombinácii s metyl jasmonátom (200 µM.l<sup>-1</sup>) inhibovalo priemer lézie hnedej hniloby a modrej plesne spôsobenej *Monilinia fructicola* a *Penicillium expansum*. Inhibičný mechanizmus bol spôsobený najmä rezistenciou vyvolanou v plodoch broskýň metyljasmonátom a *Cryptococcus laurentii*. Okrem toho priama inhibícia metyljasmonátu na *Penicillium expansum* zohrávala úlohu aj pri kontrole plesne modrej.

### **Použitie mikrobiálnych kultúr v spojení s fyzikálnym ošetrením**

Integrácia mikrobiálnych antagonistov s fyzikálnymi metódami, ako je vytvrdzovanie, alebo tepelné spracovanie, by mohla zvýšiť biologickú účinnosť

mikrobiálnych antagonistov. Napríklad biokontrola zelenej plesne pomocou *Pseudomonas glathei* Zolg a Ottow sa zvýšila, keď sa na citrusové plody aplikovalo teplo na spomalenie klíčenia konídií *Penicillium digitatum*. Ožarovanie jadrového, kôstkového a citrusového ovocia ultrafialovými (UV) lúčmi spolu s bioagensom bolo pomerne úspešné. Pri takýchto ošetrovaniach sa úloha UV lúčov na ovocie obmedzuje najmä na ich fyto-sanitárny účinok na zníženie prežívania propagúl patogénu. Uvádza sa, že účinnosť *Pichia guilliermondii* proti *Penicillium digitatum* sa zvýšila, keď sa pomarančové plody skladovali pri optimálnej nízkej teplote skladovania v kontrolovanej atmosfére. Ďalej sa uvádzalo, že pozberové choroby broskýň možno účinne znížiť, ak sa plody ošetrí horúcou vodou pri teplote 55 °C počas 10 s a potom sa naočkujú hubou *Candida oleophila*. Podobne sa uvádza, že broskyne ošetrené horúcou vodou a inokulované *Debaryomyces hansenii* by sa mohli skladovať dlhšie ako broskyne inokulované len *Debaryomyces hansenii*, a to predovšetkým znížením strát spôsobených hnilobou spôsobenou *Rhizopus*. V prípade jabĺk sa na kontrolu pozberových hnilob spôsobených *Penicillium expansum* a *Botrytis cinerea* použila integrácia mikrobiálnych antagonistov kvasiniek s máčaním v horúcej vode, alebo otláčaním.

#### **Použitie mikrobiálnych kultúr s inými prístupmi/prísadami**

Z výskumu vedcov vyplynuli niektoré ďalšie užitočné odporúčania na zlepšenie biologickej účinnosti mikrobiálnych antagonistov. Napríklad bol vyvinutý bioaktívny povlak pozostávajúci z *Cryptococcus saïtona* + glykochitosanu na kontrolu hniloby plodov jabloní. V laboratórnych štúdiách sa aktivita biokontroly *Candida saïtona* proti hnilobe jabĺk, citrónov a pomarančov spôsobenej *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* a *Penicillium digitatum* výrazne zvýšila pridaním glycochitínu. V poloprevádzkových podmienkach bol bioaktívny povlak lepší ako *Candida saïtona*, alebo samotný glykochitín v boji proti hnilobe pomarančov a citrónov a úroveň kontroly bola rovnaká ako pri použití imazalilu. Nisín, polypeptidové antibiotikum, zvýšil účinnosť *Candida oleophila* pri kontrole hniloby jabĺk spôsobenej *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum*. Podobne možno zvýšiť biologickú účinnosť mikrobiálnych antagonistov, ako sú *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichoderma harzianum* atď., na účinnú kontrolu pozberových hnilob na rôznych druhoch ovocia a zeleniny použitím prísad, ako sú kremík, metyl jasmonát, kyselina salicylová, kyselina giberelová, alebo namáčaním plodov do prípravkov na báze včelieho vosku, alebo laku.

### **4.10 Mikrobiológia minimálne spracovaného čerstvého ovocia a zeleniny**

Minimálne spracované čerstvé ovocie a zelenina (MPF) sú čerstvé, surové ovocie, alebo zelenina spracované s cieľom dodať výrobok pripravený na konzumáciu, alebo na použitie. Ovocie, alebo zelenina sa zvyčajne orezáva, lúpe, alebo v prípade potreby krája, umýva a niekedy dezinfikuje. Výrobky sa balia do uzavretých vrecúšok, alebo do plastových vaničiek uzavretých polymérovými fóliami. V tomto článku sa neuvažuje o šalátoch uchovávaných v dresingu, alebo konzervovaných pomocou chemických prísad. Na uskutočniteľnú prepravu a maloobchodný predaj hotových



výrobkov je potrebná niekoľkodňová trvanlivosť po schladení. Ovocie a zelenina z MPF sa môžu používať ako prísady do varených jedál, ale v mnohých prípadoch sa konzumujú surové. Výroba zeleniny z MPF sa začala približne pred 30 rokmi v USA a bola väčšinou určená pre stravovacie zariadenia a rýchle občerstvenie. V Európe bola vyvinutá nedávno pre maloobchodný trh. Vo Francúzsku sa výroba zvýšila zo 400 ton v roku 1985 na 35 000 ton v roku 1989. Ako výrobky MPF sa ponúka veľmi široká škála zeleniny (mrkva, rôzne druhy a typy šalátov, pór, zeler, cvikla, bylinky atď).

Výroba MPF ovocia nebola rozvinutá v takej miere, hoci čerstvé nepasterizované ovocné šťavy sú v niektorých ohľadoch podobné MPF výrobkom. Hlavnými znakmi MPF ovocia a zeleniny sú: 1) prítomnosť rezných plôch, alebo poškodených rastlinných tkanív, 2) minimálne spracovanie, ktoré nemôže zabezpečiť sterilitu, alebo mikrobiálnu stabilitu výrobku, 3) aktívny metabolizmus rastlinného tkaniva a 4) uzavretosť výrobku. Preto je pravdepodobné, že mikroorganizmy sa na výrobku budú množiť, ale ich správanie môže byť ovplyvnené metabolizmom rastlinných tkanív a modifikovanou atmosférou vytvorenou kombináciou účinkov dýchania výrobku a priepustnosti obalovej fólie. Choroby po zbere sú dôležitou príčinou strát nespracovaného ovocia a zeleniny. Riziko mikrobiálneho kazenia ovocia a zeleniny v MPF môže byť zvýšené prítomnosťou rezných plôch a vysokým obsahom vlhkosti v obale. Obavy by mohla vzbudzovať aj kontaminácia patogénmi prenášanými potravinami a ich rozmnožovanie počas skladovania, najmä preto, že väčšina ovocia a zeleniny MPF sa konzumuje bez tepelnej úpravy.

## 5 Charakter mikroorganizmov v ovocí a zelenine MPF

### 5.1 Mikrobiálna kontaminácia

Vzorky výrobkov boli odobraté buď v spracovateľskom závode a analyzované po obmedzenom čase skladovania, alebo v maloobchodných predajniach a stravovacích zariadeniach v neurčenom čase po spracovaní. Počty mezofilných baktérií na agarových platniach, alebo ekvivalentných médiách sú preto veľmi variabilné a pohybujú sa v rozmedzí od  $10^3$  do  $10^9$  jednotiek tvoriacich kolónie (KTJ.g<sup>-1</sup>). Kvalita výrobku je často prijateľná aj napriek takýmto vysokým počtom. Počty baktérií v produktoch analyzovaných krátko po spracovaní sa pohybujú od  $10^3$  do  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup>, pričom najviac kontaminovaná je strúhaná mrkva a najmenej rezaný ľadový šalát. Na druhom mieste po mezofilných baktériách v číselnom význame sú baktérie mliečneho kvasenia, ktoré sa sčítavajú na MRS za anaeróbných podmienok. Ich počet v niektorých prípadoch dosahuje  $10^9$  KTJ.g<sup>-1</sup>, ale zvyčajne je pre danú vzorku nižší ako počet mezofilných baktérií. Zdá sa, že drvená mrkva je viac kontaminovaná baktériami mliečneho kvasenia ako šalát, alebo čakanka. Viacerí autori počítali koliformné baktérie na selektívnych médiách pre Enterobacteriaceae inkubovaných pri 30 až 37 °C a zvyčajne predstavujú len malú časť bakteriálnej kontaminácie. Počty fekálnych koliformných baktérií na desoxycholátovom médiu inkubovanom pri 44 °C sú nižšie ( $10^3$  KTJ.g<sup>-1</sup>, alebo menej) a tieto baktérie sa vo väčšine vzoriek nezistia. Mnohí autori spočítali pseudomonády na CFC médiách, ale význam týchto počtov bez identifikácie reprezentatívnych kolónií je ťažké stanoviť. *Enterobacter agglomerans*, jeden z najčastejších druhov v zmiešaných zeleninových šalátoch analyzovaných autormi, nerástol na VRB pri 37 °C, ale rástol na CFC médiách. Kvasinky a plesne sú

zvyčajne menej početné ako mezofilné, alebo mliečne baktérie. Počet pektinolytických baktérií na Hankinových médiách bol v niektorých vzorkách až  $10^7$  KTJ.g<sup>-1</sup>.

Osemdesiat až deväťdesiat percent baktérií spočítaných na médiách pre mezofilné baktérie sú gramnegatívne tyčinky, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., alebo *Erwinia* spp. Pseudomonády zvyčajne prevládajú nad ostatnými rodmi. *Pseudomonas* spp. boli jediné baktérie izolované zo všetkých vzoriek šalátov MPF. Pseudomonády boli 5 až 10-krát početnejšie ako ostatné čeľade a frekvencia pseudomonád predstavovala 56,7 % bakteriálnej populácie. Ďalšie identifikované druhy sú *Flavobacterium* spp., *Xanthomonas* spp. *Chromobacterium* spp., *Chryseomonas* spp., *Rahnella aquatilis*, *Serratia* spp., *Alcaligenes* spp. a *Bacillus* spp. Väčšina identifikovaných pseudomonád bola *P. fluorescens*, pričom v tej istej vzorke boli často prítomné rôzne biovary. *P. fluorescens* predstavovali väčšinu pseudomonád (50 % až 90 %). Ostatné pseudomonády, ako *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. cepacia*, *P. paucimobilis* a *P. viridiflava*, boli identifikované menej často. *Enterobacter agglomerans*, alebo *Erwinia herbicola*, *Rahnella aquatilis* boli najčastejšie sa vyskytujúce Enterobacteriaceae v MPF zelenine. *Enterobacter intermedium* a *E. cloacae* predstavovali v niektorých vzorkách viac ako 1 % mezofilných baktérií. Baktérie mliečneho kvasenia izolované z MPF zeleniny boli identifikované ako *Leuconostoc* spp. a najmä *L. mesenteroides*. Napriek širokému spektru bakteriálnych druhov izolovaných z niekoľkých druhov prevládajú Enterobacteriaceae (gramnegatívne) a *L. mesenteroides* (grampozitívne). Naopak, v zelenine MPF bolo identifikovaných mnoho rôznych druhov kvasiniek s porovnateľným početným významom, vrátane *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Pichia* spp. a *Torulaspora* spp. Huby boli izolované menej často a patrili k rodom *Sclerotinia*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Pichia* a *Rhizopus*.

O mikrobiote plodov MPF je k dispozícii len málo informácií. Štúdie citrusových plodov sa týkajú nepasterizovanej šťavy a šťavy, alebo ovocia analyzovaného pred tepelným spracovaním v priemyselných závodoch. Krátko po spracovaní sa kontaminácia pohybovala od  $10^3$  do  $10^5$  baktérií ml<sup>-1</sup>, alebo g<sup>-1</sup> a od  $10^3$  do  $10^4$  kvasiniek a plesní ml<sup>-1</sup>, alebo g<sup>-1</sup>. Hlavnými identifikovanými druhmi boli *Candida maltosa*, *C. sake*, *C. tropicalis*, *C. magnoliae*, *Hansenula* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwamiomyces occidentalis*, *Trichosporon* spp. a *Zygosaccharomyces rouxii* v prípade kvasiniek. Z baktérií boli identifikované *Lactobacillus* spp. a *Leuconostoc mesenteroides*.

## 5.2 Pektinolytické mikroorganizmy

Izoláciou reprezentatívnych vzoriek kolónií z počítacích platní a testovaním izolátov na pektinolýzu sa zistilo, že 10 až 20 % izolátov spomedzi mezofilných baktérií z drveného šalátu je pektinolytických. Vysoký podiel pseudomonád (20 až 60 %) bol tiež zistený ako pektinolytický v mnohých vzorkách drvenej mrkvy a drvenej čakanky. Naproti tomu priamym nanosením na Hankinovo médium sa napočítalo len  $10^6$  až  $10^7$  pektinolytických baktérií g<sup>-1</sup>, pričom celkový počet mezofilnej flóry bol  $10^8$  až  $10^9$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Pektinolytické izoláty boli zvyčajne identifikované ako *Pseudomonas fluorescens* rôznych biovarov, *P. paucimobilis*, *P. viridiflava*, *P. luteola*. *Stenotrophomonas*

*maltophila*, *Flavobacterium* spp., *Cytophaga* spp., *Vibrio fluvialis*. Z drvenej mrkvy boli izolované aj niektoré pektinolytické huby (*Mucor* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum*) a kvasinky (*Trichosporon* spp.).

### 5.3 Potravinami prenášané patogény v zelenine MPF

Potenciálne potravinové patogény v zelenine MPF boli zistené v rôznych prieskumoch. *Listeria monocytogenes* bola zistená po obohatení v 3 až 19 % analyzovaných vzoriek, pričom odhadovaný počet sa pohyboval od menej ako 1 KTJ.g<sup>-1</sup> do menej ako 10<sup>2</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. *Yersinia enterocolitica* bola izolovaná s vysokou frekvenciou (až 76 % vzoriek), ale kmene boli rozpoznané ako nepatogénne na základe ich sérovaru, s výnimkou jedného izolovaného kmeňa, ktorý mal dva markery virulencie, závislosť od vápnika pri 37 °C a žiadnu fermentáciu salicínu pri 37 °C. *Aeromonas hydrophila* bola zistená aj v zelenine MPF, ale hoci sa potenciálne podieľala na vypuknutí gastroenteritídy, zapojenie rôznych faktorov virulencie a význam baktérie ako ľudského patogénu sú stále predmetom diskusií. V niektorých vzorkách zeleniny z MPF bola zistená baktéria *E. coli*. Izoláty neboli testované na enterotoxicitu, alebo cytotoxicitu, ale ich prítomnosť by mohla naznačovať fekálne znečistenie.

### 5.4 Pôvod mikrobioty na minimálne spracovanom čerstvom ovocí a zelenine (MPF)

#### 5.4.1 Nespracovaná zelenina

##### 1. Saprophytické mikroorganizmy

Mikrobiálne druhy, ktoré prevládajú na ovocí a zelenine MPF, sa bežne nachádzajú aj na rastlinách na poli, alebo po zbere a pravdepodobne pochádzajú z epifytickej mikrobioty. *P. fluorescens*, *E. herbicola* a *E. agglomerans* sú hlavnými zložkami epifytickej mikrobioty mnohých druhov zeleniny. Na rastlinách sa zistila priemerná populácia *Leuconostoc* spp. 2,5.10<sup>4</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Iné štúdie uvádzajú nižšie frekvencie (1 až 33 % v rôznych plodinách). Kvasinkové druhy identifikované na ovocí a zelenine MPF boli izolované aj zo surového ovocia a zeleniny. Podobne boli pektinolytické *P. fluorescens*, pektinolytické *Xanthomonas* spp., *Cytophaga* spp. a *Flavobacterium* spp. izolované z rôznych nespracovaných druhov zeleniny odobratých v maloobchodných predajniach. Všeobecnejšie povedané, pektinolytické fluorescenčné pseudomonády sú dobre známymi pôvodcami ochorení mäkkej hniloby listovej zeleniny a môžu tvoriť významnú časť epifytickej mikrobioty. V čerstvej pôde sa zaznamenali počty až 10<sup>9</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>, hoci boli zaznamenané aj nižšie hodnoty. Je dôležité, že dezinfekciou závlahovej vody sa znížil počet koliformných baktérií na zelenine, zatiaľ čo počet pektinolytických baktérií nebol ovplyvnený. Prítomnosť pseudomonád na zelenine pravdepodobne nezávisí od vonkajšej kontaminácie, pretože sú pravdepodobne endemické.

Naproti tomu *Erwinia* spp., ktorá je hlavnou príčinou mäkkých hnilobných ochorení zeleniny, bola zo zeleniny MPF izolovaná len sporadicky (*E. carotovora* bola zistená len v niekoľkých vzorkách. Podobne *P. cichorii*, významný pôvodca chorôb šalátu a čakanky, nebol v zelenine MPF zaznamenaný. Predspracovanie, triedenie

a orezávanie surovín s cieľom odstrániť všetky zhnité, alebo choré časti by mohlo vysvetliť nízky výskyt takýchto rastlinných patogénov v spracovaných produktoch. Okrem toho sa *Erwinia* mäkkej hniloby zriedkavo vyskytuje vo vysokom počte v prostredí, neizoluje sa zo vzoriek pôdy priamym nanosením na selektívne médiá a zvyčajne sa získava až po obohatení.

## 2. Potravinové patogény

V surovom ovocí a zelenine sa môžu nachádzať mnohé potenciálne potravinové patogény. *Listeria monocytogenes* bola izolovaná v hlávkach šalátu v rôznych druhoch zeleniny v Anglicku (9 % kontaminovaných vzoriek) a Španielsku (7,8 % kontaminovaných vzoriek), alebo v zemiakoch a reďkovke v USA (25,8 a 30,3 % kontaminovaných vzoriek). Zistilo sa, že zelenina je nositeľom  $10^2$  až  $10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup> cytotoxických a hemolytických *Aeromonas* spp. Čerstvé ovocie a zelenina môžu tiež zohrávať úlohu pri prenose *Salmonella* spp. Pri vyšetovaní po vypuknutí epidémie *Salmonella poona* sa zistilo, že 1 % melónových šupiek z ovocia dovezeného z Mexika bolo kontaminovaných touto baktériou. Podobne pri vypuknutí epidémie salmonely spôsobenej konzumáciou fazuľových klíčkov boli baktérie izolované na semenách fazule použitých výrobcom. Zelenina odobratá na poli, alebo v maloobchodných predajniach bola kontaminovaná baktériami *Salmonella* spp. s frekvenciou 7,5 % v Španielsku a 8 až 63 % v Holandsku. V Egypte sa zistila kontaminácia zeleniny a šalátov baktériami *Shigella* spp., *Salmonella* spp. a *S. aureus* ( $10^3$  KTJ.g<sup>-1</sup>). Spóry *C. botulinum* boli izolované z 13,6 % vzoriek kapusty, z cibuľových šupiek, cesnaku a z mnohých ďalších druhov zeleniny. *B. cereus* bol izolovaný zo semien zeleniny a z klíčkov.

Výskyt patogénov prenášaných potravinami je však nižší v zelenine ako v mäse, mliečnych výrobkoch, alebo morských plodoch. Prieskumom maloobchodného trhu na Novom Zélande sa zistilo, že len 1 % zeleninových výrobkov bolo kontaminovaných *Aeromonas* spp., zatiaľ čo 20 % mäsových výrobkov a 66 % mäkkýšov bolo kontaminovaných. Podobne 42 % vzoriek potravín z maloobchodných predajní vo Švédsku, ktoré boli kontaminované *Aeromonas* spp., obsahovalo ryby, alebo mäso, ale žiadna zo vzoriek zeleniny nebola pozitívna. V prieskumoch zahŕňajúcich širokú škálu výrobkov nebola žiadna zelenina kontaminovaná *L. monocytogenes*, zatiaľ čo 26 až 80 % hydiny a mletého mäsa bolo kontaminovaných. Zelenina je často kontaminovaná *Y. enterocolitica* (prieskum zaznamenal 43 % kontaminácie v Holandsku), ale izoláty boli identifikované ako nepatogénne na základe ich sérotypov, zatiaľ čo patogénne *yersinie* sa bežne nachádzajú na mäse.

Ku kontaminácii zeleniny patogénmi prenášanými potravinami často dochádza v dôsledku poľnohospodárskych postupov, ako je zavlažovanie znečistenou vodou, alebo hnojenie hnojom či kalmi z čističiek odpadových vôd. Infekcia *Vibrio cholerae* v Južnej Amerike súvisela s konzumáciou surovej zeleniny kontaminovanej znečistenou vodou. Vypuknutie epidémie listérie v Kanade v roku 1982 súviselo s konzumáciou šalátu coleslaw vyrobeného z kapusty, ktorá bola pravdepodobne kontaminovaná ovčím hnojom. Jablká boli kontaminované prostredníctvom hnojovice v ovocných sadoch. *Salmonella* a *L. monocytogenes* prenášajú a množia domáce zvieratá a sú hojne prítomné v odpadových vodách. *L. monocytogenes* sa zistila v surovom kale s frekvenciou 100 % a 44,6 %. Počet *L. monocytogenes* bol v koláčoch z čistiarenskeho kalu odhadnutý na 7 KTJ.g<sup>-1</sup>. Vo väčšine prieskumov sa zistilo, že

prítomnosť salmonely na zelenine korelovala s prítomnosťou fekálneho indikátora *E. coli*. Preukázal sa prenos patogénnych baktérií a fekálnych indikátorov na pestované rastliny zavlažovaním a organickými hnojivami.

Kontaminácia zeleniny baktériou *E. coli* sa znížila dezinfekciou závlahovej vody. Lucerna pestovaná na poliach hnojených koláčmi z čistiarenskeho kalu obsahovala pri zbere *L. monocytogenes* (10 % vzoriek obsahovalo 3 až 5 KTJ.g<sup>-1</sup>), zatiaľ čo všetky vzorky z kontrolného poľa boli bez výskytu týchto baktérií. Napriek tomu niektoré výskumy ukázali, že pokusy o kontamináciu zeleninových plodín zavlažovaním vodou znečistenou kalmi z čistiarní odpadových vôd a pozitívnu na salmonelu zlyhali. Blízkosť znečisteného prostredia môže mať za následok kontamináciu zeleninových polí aj prostredníctvom prenosu patogénnych baktérií zvieratami (čajky boli usvedčené ako prenášači *L. monocytogenes* zo skládok odpadových vôd na obrábanú pôdu), alebo všeobecnejšie prostredníctvom povrchovej vody. V Holandsku sa *L. monocytogenes* našla v 67 % vzoriek povrchovej vody odobratých v odpadových vodách z čistiarní odpadových vôd a do vzdialenosti 25 míľ od čistiarní odpadových vôd boli kanály s odpadovými vodami stále kontaminované s frekvenciou 12 %. Zlé hygienické podmienky počas pestovania, alebo zberu boli tiež usvedčené z kontaminácie zeleniny baktériami *Campylobacter* spp. Zelenina môže byť kontaminovaná fekálnymi indikátormi počas zberu a prepravy, pravdepodobne prostredníctvom manipulátorov s potravinami (ako sa predpokladá v prípade celého radu druhov zeleniny a petržlenu).

Riziko kontaminácie zeleniny počas zberu a spracovania závisí aj od schopnosti patogénov prežiť na poli. *L. monocytogenes* môže v niektorých vzorkách pôdy, v životnom prostredí, alebo v laboratóriu prežiť niekoľko mesiacov. Preto nie je prekvapujúce, ak sú baktérie prítomné na plodinách pri zbere na poliach kontaminovaných hnojivami pred sejbou. Naopak, zistilo sa, že baktérie rýchlo zmizli z inokulovanej pôdy, ale zdá sa, že prežívajú v rhizosférach zeleniny. V niektorých prípadoch salmonely prežívali v pôde viac ako 200 dní, hoci vo väčšine pokusov baktérie zmizli po niekoľkých dňoch. *E. coli* prežila na šaláte na poli po zavlažovaní znečistenou vodou viac ako 21 dní.

Niektoré potravinové patogény sa bežne nachádzajú v prostredí zeleniny a ich prítomnosť pravdepodobne nie je dôsledkom vonkajšej kontaminácie. Patogénne klostrídie a *B. cereus* sú prítomné v pôde a na rastlinách. *A. hydrophila* je bežným obyvateľom vodného prostredia, ale rôzne typizačné techniky (multilokusová enzýmová elektroforéza, bio a sérotypizácia) ukázali, že environmentálne izoláty sa líšia od izolátov ľudského pôvodu. Podobne sa rastové charakteristiky izolátov zo zeleniny líšia od charakteristík klinických izolátov. *L. monocytogenes* sa považuje za všadeprítomný a bol izolovaný z mnohých vzoriek pôdy, vody a rastlín v kultivovaných aj nekultivovaných oblastiach. Zamedzenie znečistenia zeleninových polí odpadovou vodou, splaškovými vodami, alebo hnojom by určite výrazne znížilo výskyt *L. monocytogenes*, ale pravdepodobne nie je možné úplne eliminovať kontamináciu.

#### 5.4.2 Spracovaná zelenina

Surová zelenina je silne kontaminovaná už pri vstupe do spracovateľského reťazca. Analýzy v rôznych fázach spracovania ukazujú, že konečný produkt je často menej kontaminovaný ako surová zelenina. V zelenine MPF sa nezaznamenali žiadne

prípady výskytu *Salmonella* spp., ale ich výskyt v surovej zelenine môže byť vysoký. Niektoré postupy však môžu zvýšiť počet mezofilných baktérií: pri drvení a krájaní sa zistilo zvýšenie počtu zo  $10^3$  na  $10^4$  až  $10^5$  až  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade rôznych druhov zeleniny a zo  $10^4$  na  $10^5$  až  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade šalátov z hlávkového šalátu a čakanky. V prípade čerstvého grapefruitu sa celkové počty mikroorganizmov zvýšili približne o 0,5 log cyklu v priebehu pracovného dňa, čo naznačuje hromadenie kontaminácie v spracovateľskej linke.

Zistilo sa, že chlórovaná voda z umývacieho kúpeľa linky na spracovanie čakankového šalátu obsahuje  $10^3$  baktérií ml<sup>-1</sup>. Hoci je to málo v porovnaní so  $10^5$  až  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup> zistenými na výrobku, pravdepodobne môže dôjsť k prenosu mikroorganizmov cez umývací kúpeľ. Charakteru mikroorganizmov, ktoré môžu kontaminovať výrobok počas spracovania ovocia a zeleniny MPF, sa doteraz venovalo málo pozornosti. Spracovanie významne nemení zloženie mezofilnej mikrobioty, ktorá je podobná v konečných produktoch a v nespracovanej zelenine, ale mohlo by zvýšiť kontamináciu niektorými potravinovými patogénmi. Napríklad *L. monocytogenes* sa našiel v 19 % skúmanej zeleniny MPF v Anglicku, zatiaľ čo kontaminovaných bolo len 1,8 % jednotlivých zložiek. Autori dospeli k záveru, že k podstatnej kontaminácii *L. monocytogenes* došlo počas spracovania. *L. monocytogenes* sérotyp 1/2a sa pravidelne nachádzal v kôstkovinách a na kôstkovinách v spracovateľskej linke. Okrem toho sa *L. monocytogenes* zistil v mnohých potravinárskych odvetviach spracúvajúcich mliečne, alebo mäsové výrobky, ako aj v domácich kuchyniach. Bohužiaľ, je k dispozícii len málo informácií o ovocinárskom a zeleninárskom priemysle. Vyšetrenie po vypuknutí epidémie šigelózy odhalilo pravdepodobnú kontamináciu drveného šalátu pracovníkom potravinárskeho podniku v drviarni.

## 5.5 Vplyv mikroorganizmov na kvalitu ovocia a zeleniny MPF

Kazenie ovocia a zeleniny MPF bolo charakterizované ako hnedé zafarbenie rezných plôch húb, čakanky, alebo šalátu, nekróza čakanky, strata textúry plátkov kivi a exsudácia a produkcia nepríjemných pachov, alebo vôní na plátkoch, alebo drvenej mrkve. Viacerí autori skúmali kazenie ovocia a zeleniny MPF mikroorganizmami. Pokúsili sa nájsť súvislosť medzi kazivosťou a počtom mikroorganizmov, vyvolať kazivosť inokuláciou mikroorganizmov a skúmať vplyv prostredia skladovania na schopnosť mikroorganizmov množiť sa a spôsobovať kazivosť.

### Vzťah medzi kazivosťou a počtom mikroorganizmov

Vývoj kazenia je zvyčajne spojený s rastom mikroorganizmov vo výrobkoch MPF, ale to nemusí nevyhnutne znamenať, že všetko kazenie je mikrobiálneho pôvodu. V nepasterizovanej čerstvej pomarančovej šťave skladovanej pri 4 °C sa mikrobiálna populácia znížila, alebo vyrovnala približne počas prvých 2 týždňov skladovania, zatiaľ čo panelové testy stanovili trvanlivosť týchto výrobkov na 10 až 16 dní. V tomto prípade bola stabilita skladovania obmedzená inými faktormi ako mikrobiálnym rastom.

V mnohých prípadoch celkový počet baktérií na konci skladovania nesúvisí s kvalitou vzorky. Po 10 dňoch skladovania pri 10 °C sa podiel rozpadnutých kúskov listov vo vzorkách drvených čakankových šalátov pohyboval od 5 do 40 %, zatiaľ čo

počty mezofilných baktérií sa medzi vzorkami výrazne nelíšili. V drvenej mrkve boli celkové počty mezofilnej bioty podobné v pokazených vzorkách a vo vzorkách s dobrým vzhľadom. Niektoré šarže miešaných zeleninových šalátov boli dobrej kvality napriek veľmi vysokým počtom mikroorganizmov (až  $10^9$  KTJ.g<sup>-1</sup>). Pre daný výrobok môže byť užitočnejším ukazovateľom stability pri skladovaní počet mezofilných baktérií na začiatku skladovania. Rozdrvený šalát s rôznymi zriedeniami bakteriálnej suspenzie extrahovanej z listov šalátu a zistilo sa, že vývoj kazení sa zrýchľuje so zvyšovaním mikrobiálneho zaťaženia na začiatku skladovania. Naopak, panelové testovanie rôznych vzoriek čerstvých nepasterizovaných pomarančových štiav neodhalilo žiadny vzťah medzi počiatočným počtom mikroorganizmov (v rozmedzí od  $10^3$  do  $10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) a trvanlivosťou pri chladiacej teplote nižšej ako 7,8 °C.

### **Mikroorganizmy ako príčina kazení**

Pektinolytické mikroorganizmy sú v ovocí a zelenine MPF početné, ale pokusy dokázať ich úlohu pri kazení neboli vždy úspešné. Porovnaním troch dávok 100 vzoriek drvenej čakanky, spracovaných v rôznych ročných obdobiach, sa zistil vzťah medzi počtom pektinolytických mikroorganizmov *P. fluorescens* na konci skladovania (pri 10 °C) a rozsahom kazení (hodnoteným ako počet rozpadnutých kusov listov na vzorku), pričom po 10 dňoch pri 10 °C vykazovalo kazenie 5 až 35 % kusov listov. V najviac znehodnotených vzorkách tvorili pektinolytické *P. fluorescens* 60 % všetkých pseudomonád. Pri inokulácii na kúsky listov čakanky spôsobili rozklad po 4 dňoch pri 10 °C, ale boli potrebné počty nad  $10^7$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Keďže počet pseudomonád dosiahol na konci pokusu  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>, vzniklo podozrenie, že pektinolytický *P. fluorescens* sa podieľal na kazení drvenej čakanky. V podobných experimentoch so strúhanou mrkvou sa nezistil žiadny vzťah medzi prítomnosťou pektinolytických pseudomonád a kazením. Kvalita miešaných zeleninových šalátov nebola ovplyvnená prítomnosťou pektinolytických baktérií, a najmä prítomnosťou *Erwinia carotovora* v niektorých vzorkách. Pri rozvoji kazivosti môžu byť dôležité aj iné faktory ako pektinolytické enzýmy. Nedávno bol identifikovaný nový faktor virulencie pektinolytických fluorescenčných pseudomonád ako viskozín, peptidolipidový biosurfaktant. Zmena povrchových vlastností bola potrebná na to, aby pektinolytické baktérie spôsobili hnilobu hláv brokolice. Úloha produkcie povrchovo aktívnych látok baktériami pri kazení by sa mala zväžiť v produktoch MPF, v ktorých je vysoký obsah vlhkosti a rastlinné tkanivá sú často v kontakte s voľnou vodou.

V niektorých vzorkách MPF zeleniny sa zvýšil aj výskyt baktérií mliečneho kvasenia. V prípade strúhanej, alebo krájanej mrkvy dosiahli počty na konci skladovania  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Vo vzorke 50 vrecúšok so strúhanou mrkvou priemyselného pôvodu skladovanou pri 10 °C bolo kazenie po 14 dňoch pri 10 °C vždy spojené s vysokým počtom baktérií mliečneho kvasenia, identifikovaných ako *Leuconostoc mesenteroides*, ale nie s populáciou mezofilných baktérií. Skazené vzorky obsahovali vysoké koncentrácie kyseliny mliečnej, kyseliny octovej a etanolu a CO<sub>2</sub> tvoril 25 %, alebo viac atmosféry vreciek. Hromadenie týchto zlúčenín mohlo byť dôsledkom mliečneho heterofermentatívneho metabolizmu *L. mesenteroides*, ktorý je podozrivý z toho, že spôsobuje kazenie drvenej mrkvy. Inokulácia drvenej mrkvy *L. mesenteroides* a inkubácia v podmienkach podobných tým, ktoré sa vyskytujú v pokazených vreckách (koncentrácia CO<sub>2</sub> presahujúca 25 %), viedla po 10 dňoch pri 10 °C k pokazeniu drvenej mrkvy, vizuálne charakterizovanému exsudáciou

a stratou štruktúry. Mechanizmy, ktorými *L. mesenteroides* ovplyvňuje textúru mrkvového tkaniva, sa neskúmali, ale ponorenie plátok mrkvy do kyseliny mliečnej vyvolalo zmäknutie a okrem toho existujú niektoré správy o pektinolytickom *Leuconostoc* spp. Hromadenie etanolu, kyseliny mliečnej a octovej sa zaznamenalo aj počas skladovania miešaného zeleninového šalátu (nad 100 mg.g<sup>-1</sup> kyseliny mliečnej po 1 týždni pri 5 °C) a v niektorých vreckách šalátu skladovaného 8 dní pri 8 °C. Naopak, tieto produkty kvasenia sa nehromadili (alebo len mierne) v strúhaných čakankových šalátoch a baktérie mliečneho kvasenia neboli identifikované v strúhanom ľadovom šaláte, čo naznačuje obmedzenú úlohu kvasných mikroorganizmov pri kazení. *Lactobacillus* spp. a *Leuconostoc mesenteroides* sú známe tým, že kazia výrobky z citrusových plodov, najmä produkciou diacetylu, ktorý im dodáva maslovú pachuť. V čerstvej, nepasterizovanej šťave boli baktérie počas skladovania (pri 4 °C) prerastené kvasinkami a koncentrácia diacetylu bola vždy pod senzorickým prahom, čo naznačuje, že baktérie mliečneho kvasenia pravdepodobne neboli príčinou kazenía.

Úlohe kvasiniek pri kazení ovocia a zeleniny MPF sa doteraz venovalo málo pozornosti. Niektoré kvasinky sa podieľali na znehodnotení nespracovaného ovocia a zeleniny. Kvasinky boli identifikované aj ako príčina kazenía fermentovaných rastlinných produktov používaných ako siláž a fermentovanej mrkvy. V mnohých potravinách kvasinky spôsobujú znehodnotenie prostredníctvom fermentačnej produkcie oxidu uhličitého, etanolu a nepríjemných aróm. Je to tak v ovocných šťavách a kvasinky môžu byť limitujúcim faktorom pri vývoji ovocných produktov MPF. Kazenie nepasterizovanej pomarančovej šťavy skladovanej pri teplote 7,8 °C, 1 týždeň súviselo s množením kvasiniek. V strúhanej mrkve sa na konci skladovania najčastejšie vyskytovali kvasinkové druhy ako *Candida lambica* a *C. sake*. Inokulácia výrobku *C. lambica* zvýšila znehodnotenie pri niektorých podmienkach skladovania, ale toto znehodnotenie bolo významné až po 12 dni pri 10 °C. Predpokladalo sa, že veľké množstvo CO<sub>2</sub> produkovaného kvasinkami spôsobilo kazenie.

Mikrobiálne druhy potenciálne spôsobujúce kazenie sa výrazne líšia v závislosti od druhu MPF výrobku. Niektoré výrobky častejšie podliehajú mikrobiálnej fermentácii (napr. strúhaná mrkva, strúhaný hlávkový šalát), zatiaľ čo u iných sa objavujú príznaky mäkkej hniloby (napr. čakankové šaláty), hoci v mnohých prípadoch nemožno skazenie spájať so žiadnym konkrétnym mikroorganizmom. Napríklad hnedé sfarbenie rezných plôch listov čakanky, alebo húb (*A. bisporus*) sa objavuje počas prvých dní skladovania a pravdepodobne nie je spôsobené mikroorganizmami, ale oxidáciou v poranených rastlinných tkanivách. Plátky kivi v priebehu niekoľkých hodín výrazne zmäknú bez účasti mikroorganizmov. Kazenie je pravdepodobne spôsobené rôznymi faktormi, ktoré nemusia byť v rovnakej miere ovplyvnené podmienkami skladovania. V dôsledku toho sa hlavné príčiny znehodnotenia konkrétneho výrobku môžu líšiť v závislosti od podmienok skladovania a naopak, podmienky skladovania by sa mali vyberať s ohľadom na hlavný pôvodca znehodnotenia.

### **Vplyv teploty skladovania na mikrobiálne kazenie**

Ovocie a zelenina MPF sa zvyčajne skladujú pri chladiacich teplotách, ktoré pravdepodobne podporujú psychrotrofné mikroorganizmy. V drvenom ľadovom šaláte boli počty mezofilných a psychrotrofných baktérií rovnaké. Napriek tomu počiatkové počty psychrotrofných baktérií mohli v niektorých vzorkách predstavovať menej ako



1 % počtov mezofilných baktérií. Čas zdvojnásobenia kvasiniek izolovaných z drvenej mrkvy sa znížením teploty z 10 na 4 °C zvýšil dvojnásobne, ale pri oboch teplotách sa vyprodukovalo podobné množstvo etanolu (zlúčenina hromadiaca sa v pokazenej drvenej mrkve). Prevalha fluorescenčných pseudomonád, a najmä pektinolytických kmeňov (*Erwinia* mäkkých hnilob nikdy neboli zaznamenané ako príčina kazenía), by mohla vysvetliť účinok nízkych teplôt na tieto mikroorganizmy. Príslušné časy zdvojnásobenia zaznamenané pre *P. marginalis* (pektinolytická fluorescenčná pseudomonáda) a *E. carotovora* boli 15 až 20 hodín pri 0,2 °C a 15,4 hodín pri 5,7 °C.

Vplyv teploty na počet mikroorganizmov počas skladovania zeleniny MPF bol uvedený vo viacerých publikáciách. Zvýšenie teploty o 2 až 7,5 °C malo len malý vplyv na počty mezofilnej bioty a kvasiniek na strúhanom (počty baktérií sa zvýšili zo  $10^5$  na  $10^7$  KTJ.g<sup>-1</sup> za 8 dní). To je v rozpore s výsledkami získanými na strúhaných čakankových šalátoch, mrkvových plátkoch a strúhanom šaláte, ktoré ukázali, že rast mezofilnej mikrobioty sa výrazne znížil so znížením teploty skladovania (medzi 10 a 2 °C). Vývoj baktérií mliečneho kvasenia sa zdal byť dôslednejšie závislý od teploty. Pri balenej zmiešanej zelenine sa baktérie mliečneho kvasenia pri teplote 7 °C množili len vo veľmi malej miere, ale po skladovaní pri 30 °C prevládali a kyselina mliečna sa hromadila len pri teplote nad 20 °C. Pri strúhanej mrkve sa množenie baktérií mliečneho kvasenia a následné kazenie výrazne oneskorilo pri teplote 2 °C, ale znížením teploty z 10 na 6 °C sa výrazne neznížilo. Na nepasterizovanej pomarančovej šťave sa po skladovaní pri teplote 7,8 °C, ale nie pri teplote 4 °C, alebo nižšej, kazenie spájalo s rastom kvasiniek. Týchto niekoľko výsledkov by naznačovalo, že mikrobiálne kazenie je pravdepodobne významné len pri vyšších teplotách skladovania.

Pri výrobkoch MPF by sa mali zohľadniť dva faktory, ktoré vysvetľujú vplyv teploty okrem jej priameho pôsobenia na rýchlosť rastu: (1) teplota skladovania určuje rýchlosť dýchania výrobku, a teda zmeny plynnej atmosféry v obale, ktoré môžu ovplyvniť správanie mikroorganizmov; (2) teplota môže ovplyvniť aj rýchlosť starnutia spracovaného ovocia, c, alebo zeleniny, čím sa mení prostredie pre mikroorganizmy.

## **Vplyv modifikovanej atmosféry na mikrobiálne kazenie zeleniny MPF**

### **Vplyv na mezofilné mikroorganizmy**

#### **Vplyv na počet baktérií a kvalitu komodít**

Uzavreté balenie zeleniny z polymérovej fólie vytvára modifikovanú atmosféru s vyššou koncentráciou CO<sub>2</sub> a nižšou koncentráciou O<sub>2</sub> ako na vzduchu. Túto modifikovanú atmosféru možno vytvoriť dýchaním komodity (pasívna modifikovaná atmosféra) a naplnením obalu zmesou plynov (aktívna modifikovaná atmosféra). Z viacerých štúdií vyplýva, že balenie v modifikovanej atmosfére (MAP) zlepšuje kvalitu výrobkov, ako je napríklad drvený šalát. Vplyv modifikovanej atmosféry na aeróbnu mezofilné mikroorganizmy je však rôzny. Mikrobiálna diverzita bola väčšia v drvenom ľadovom šaláte skladovanom v neuzavretých vreciach (na vzduchu) ako v uzavretých vreciach (v modifikovanej atmosfére). Okrem toho sa rast mezofilných baktérií na drvenom ľadovom šaláte znížil a stabilita skladovania sa zlepšila v uzavretých vreciach (v ktorých sa CO<sub>2</sub> po 14 dňoch pri 2,8 °C zvýšil na 19 %) v porovnaní s neuzavretými vrecami. To je v kontraste s výsledkami, ktoré naznačujú, že atmosféra 10 % CO<sub>2</sub> až 3 % O<sub>2</sub> zlepšila kvalitu drveného ľadového šalátu

(v porovnaní so skladovaním na vzduchu) bez akejkoľvek zmeny rastu mezofilných baktérií.

V prípade šalátov z drvenej čakanky zmes 20 % CO<sub>2</sub> a vzduchu ako počiatočného priestoru neznížila rast mezofilných baktérií počas skladovania pri 10 °C v porovnaní so vzduchom, ale zlepšila sa vizuálna kvalita a koncentrácie oxidu uhličitého boli výrazne vyššie ako v baleniach uzavretých na vzduchu počas skladovania. Vizuálna kvalita pri 8 °C uzavretím balíkov drveného hlávkového šalátu pod 97 % N<sub>2</sub>, alebo pod 10 % CO<sub>2</sub> a 90 % N<sub>2</sub> bez výrazného vplyvu na aeróbne mezofilné baktérie. Podobné výsledky boli zaznamenané pri zeleninových šalátoch s použitím 10,5 % CO<sub>2</sub> a 2,25 % O<sub>2</sub> ako počiatočného priestoru. Modifikovaná atmosféra obsahujúca vzduch, 2,5 %, alebo 5 % O<sub>2</sub> s 2,5 %, 5 %, alebo 7,5 % CO<sub>2</sub> pri teplote 10 °C nemala žiadny vplyv na rast mezofilnej mikrobioty a fluorescenčných pseudomonád na hubách obyčajných (*A. bisporus*), ale vyvolala mnohé zmeny v kritériách kvality. Skladovanie v anaeróbných podmienkach znížilo celkové počty a počty fluorescenčných pseudomonád o 1 až 2 log cykly, čo však veľmi nepriaznivo ovplyvnilo kvalitu. Záverom možno konštatovať, že prínos modifikovanej atmosféry pre kvalitu nie je systematicky spojený so znížením rastu mezofilnej bioty.

### Možný spôsob účinku

Zvýšená koncentrácia CO<sub>2</sub> znižuje rast pseudomonád, čím sa znižuje bakteriálne kazenie a predlžuje sa trvanlivosť výrobkov, ako je mäso, hydina a morské plody. Podobne koncentrácie O<sub>2</sub> nižšie ako 0,2 %, alebo koncentrácie CO<sub>2</sub> vyššie ako 10 % znížili rast *P. fluorescens* a *E. carotovora*. Koncentrácie kyslíka museli byť nižšie ako 2 %, aby sa znížil rast pseudomonád izolovaných z mäsa. V prípade *P. marginalis*, baktérie často izolovanej z MPF zeleniny, modifikovaná atmosféra so 4 % a 10 % O<sub>2</sub> znížila rast *in vitro* a obmedzila rozvoj mäkkej hniloby na plodoch rajčiakov. Naproti tomu sa ukázalo, že 10 % CO<sub>2</sub> až 3 % O<sub>2</sub> nemali žiadny vplyv na rast *P. marginalis in vitro*. Všeobecnejšie povedané, koncentrácie CO<sub>2</sub> 15 až 20 % môžu účinne oddialiť vývoj pektinolytických mikroorganizmov a znížiť rozsah hniloby počas skladovania celého ovocia a zeleniny. Takéto koncentrácie CO<sub>2</sub> sa často dosahujú v baleniach zeleniny MPF po niekoľkých dňoch pri chladiacich teplotách, aj keď je výrobok balený so vzduchom ako počiatočným priestorom. Zvýšenie koncentrácie CO<sub>2</sub> by sa mohlo uplatniť vždy, keď pektinolytické baktérie zohrávajú významnú úlohu pri kazení.

Teplota skladovania ovplyvňuje aj vplyv modifikovanej atmosféry, ktorej inhibičné účinky na rast baktérií klesajú so stúpajúcou teplotou a sledujú rozpustnosť CO<sub>2</sub>. Zvýšenie koncentrácie CO<sub>2</sub> významne znížilo vývoj mezofilných baktérií pri 2 °C a 6 °C na rezaných listoch čakanky, ale pri 10 °C nemalo žiadny účinok.

Potlačenie rastu mikroorganizmov nemusí byť jediným mechanizmom, ktorým CO<sub>2</sub> znižuje kazivosť. Koncentrácie oxidu uhličitého 20 %, alebo vyššie zabránili rozvoju mäkkej hniloby v listoch čakanky inokulovaných pektinolytickou *P. fluorescens* (ako sa pozorovalo pri *P. marginalis* na rajčiaku). Podobné výsledky sa zaznamenali, keď sa listy inokulovali surovým extraktom pektinolytických enzýmov baktérií. Keďže optimálne pH pektinolytických enzýmov z *P. fluorescens* je približne neutrálne a keďže účinku pektinolytických enzýmov *Aspergillus niger* (s optimálnym pH okolo 5) na listy čakanky nezabránil CO<sub>2</sub>, autori vyslovili podozrenie, že CO<sub>2</sub> môže pôsobiť okyslením bunkového prostredia. pH sa počas pôsobenia 15 % CO<sub>2</sub> znížilo o 0,1 vo vakuolách a o 0,4 v cytoplazme šalátu.

## Vplyv na baktérie mliečného kvasenia

Nízke počty baktérií mliečného kvasenia boli pozorované v šaláte ready to eat, ktorý bol balený so vzduchom ako počiatočným priestorom a vyššie počty (so stratou kvality) boli pozorované na vzorkách balených v modifikovanej atmosfére obsahujúcej 0 % O<sub>2</sub> až 10 % CO<sub>2</sub> ako počiatočný priestor. Rast baktérií mliečného kvasenia na rezaných listoch čakanky skladovaných v modifikovanej atmosfére obsahujúcej 20 % CO<sub>2</sub> ako počiatočný medzipriestor bol rýchlejší ako vo vzduchu pri 2 °C (s miernymi rozdielmi pri tejto teplote), 6 a 10 °C. Všeobecnejšie sa zdá, že zvýšené koncentrácie CO<sub>2</sub>, alebo znížené koncentrácie O<sub>2</sub> podporujú rast baktérií mliečného kvasenia v MPF zelenine, ako sa zaznamenalo aj pri iných potravinách. Skladovanie drvenej mrkvy pri 10 °C v atmosfére obsahujúcej 40 % CO<sub>2</sub>, alebo 1 % O<sub>2</sub> podporilo rozklad fermentáciou mliečného kvasenia a rast baktérií mliečného kvasenia, ale nemalo žiadny vplyv na rast *L. mesenteroides*, hlavného zástupcu baktérií mliečného kvasenia produktu, *in vitro*. Tu môže byť príčinou kazenía prechod na anaeróbny metabolizmus, ktorý vyvoláva toxicitu pre bunky mrkvy a únik elektrolytov a živín využívaných saprofytickými mikroorganizmami, ako sú baktérie mliečného kvasenia. Skladovanie ovocia a zeleniny pri hladinách O<sub>2</sub> nižších, alebo hladinách CO<sub>2</sub> vyšších, ako sú tolerančné limity, alebo pri oboch týchto hladinách, môže skutočne vyvolať fyziologické poruchy a kazeníe.

Záverom možno konštatovať, že modifikovaná atmosféra môže priaznivo pôsobiť na baktérie mliečného kvasenia prostredníctvom priameho vplyvu na bakteriálnu bunku, alebo prostredníctvom fyziologickej modifikácie či poškodenia rastlinnej bunky a zvýšiť kazivosť komodít citlivých na baktérie mliečného kvasenia.

## Vplyv na kvasinky a plesne

Kvasinky na zelenine MPF vo všeobecnosti nie sú ovplyvnené modifikovanou atmosférou. Ich rast na rezanom šaláte neovplyvnila ani riadená atmosféra obsahujúca 3 % O<sub>2</sub> s 10 % CO<sub>2</sub>, alebo bez neho, ani balenie s 3 % O<sub>2</sub> ako počiatočným priestorom. Podobné pozorovania boli zaznamenané pri porovnaní rastu v uzavretých a neuzavretých obaloch rezaného ľadového šalátu. Medzi strúhanou mrkvou skladovanou v modifikovanej atmosfére obsahujúcej od 20 do 50 % CO<sub>2</sub> a od 10 do 2 % O<sub>2</sub> pri 10 °C neboli zaznamenané žiadne rozdiely v počte kvasiniek. Plesne sú aeróbne mikroorganizmy a modifikovaná atmosféra pozorovaná v MPF ovocia a zeleniny s vysokou koncentráciou CO<sub>2</sub> a nízkou koncentráciou O<sub>2</sub> by mala inhibovať ich rast.

Balenie v modifikovanej atmosfére s atmosférou prispôbolenou fyziologickým požiadavkám komodity v kombinácii so skladovaním pri chladiacej teplote často zlepšuje kontrolu organoleptickej a obchodnej kvality zeleniny MPF a predlžuje jej trvanlivosť. Je to spôsobené účinkami modifikovanej atmosféry na metabolizmus spracovanej zeleniny a na rast a aktivitu mikroorganizmov spôsobujúcich kazeníe. Mnohí autori však poukazujú na zvýšené mikrobiálne nebezpečenstvo v dôsledku predĺženej doby skladovania a následného predĺženia času na rast potravinových patogénov v prípade mäsa, hydiny a morských plodov, alebo celej zeleniny. V tejto súvislosti je o ovocí a zelenine s MPF známe len málo.

## Vývoj patogénov prenášaných potravinami v zelenine MPF

Spracovaná, alebo nespracovaná čerstvá zelenina a v menšej miere aj ovocie sú zodpovedné za choroby prenášané potravinami. Tieto výsledky by mali byť vyvážené skutočnosťou, že ovocie a zelenina sú v porovnaní s ostatnými potravinami menej významnými zdrojmi ochorení prenášaných potravinami. V rokoch 1988 až 1990 sa uskutočnil epidemiologický prieskum úlohy potravín pri sporadických prípadoch. Surová zelenina nebola identifikovaná ako rizikový faktor stravovania, pretože pacienti konzumovali čerstvé ovocie a zeleninu menej často ako kontrolné skupiny. Potraviny pripravené na konzumáciu (vrátane zeleniny) mali vysokú pravdepodobnosť výskytu izolátov zodpovedajúcich kmeňom pacientov a potraviny s vysokým počtom *L. monocytogenes* boli tiež najpravdepodobnejším zdrojom listeriózy pacienta. Väčšina ovocia a zeleniny MPF sú potraviny pripravené na konzumáciu a rezné povrchy a vysoká vlhkosť by mohli poskytnúť mikroorganizmom dobré podmienky na rast, čím by sa zvýšilo riziko pre spotrebiteľa.

## Vplyv teploty na správanie sa potravinových patogénov na ovocí a zelenine MPF

Pri izbovej teplote rastie na zelenine MPF mnoho potravinových patogénov. *Shigella sonnei* sa pri 22 °C rýchlo množila na strúhanom šaláte (po 12 hodinách sa počet baktérií zvýšil 10<sup>3</sup> násobne) a na strúhanej kapuste (po 24 hodinách sa počet baktérií *Shigella* znásobil 10<sup>3</sup> až 10<sup>4</sup>). V druhom prípade sa počet baktérií po 3 dňoch rýchlo znížil, pretože pH kapusty kleslo. Pri izbovej teplote *L. monocytogenes* rýchlo rástla na šaláte (nárast o 1 log za 8 hodín pri 25 °C) a na kapuste (nárast o 2 log za 1 deň pri 25 °C), ale počas nasledujúcich dní prudko klesla. Pri 23 až 24 °C *E. coli*, *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus* mierne rástli na strúhanom šaláte skladovanom na vzduchu. *S. aureus* klesol zo 10<sup>2</sup> až 10<sup>3</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> na krájanom šaláte a krájanom zeleri na menej ako 10 KTJ.g<sup>-1</sup> po 2 dňoch skladovania pri izbovej teplote, zatiaľ čo na plátkoch zelenej papriky sa zvýšil na 10<sup>5</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Predumyté huby (*A. bisporus*) skladované v uzavretých, alebo otvorených plastových vreckách podporovali rast *S. aureus* pri teplote 37 °C a toxín sa zistil po 2 dňoch. Pri teplote 22 až 25 °C sa nakrájaná kapusta zabalená v anaeróbných podmienkach a inokulovaná spórmi kmeňov *C. botulinum* typu A stala toxickou po 4, 5, alebo 6 dňoch, ale len pri inokule 100 spór.g<sup>-1</sup>. Spóry kmeňov typu B nevytvárali toxín. Nakrájané surové zemiaky v anaeróbných podmienkach podporovali produkciu toxínu po 7 d pri 25 °C. Balené huby (*A. bisporus*) sa tiež stávajú toxickými po 4 dňoch skladovania pri izbovej teplote, ale bolo potrebné veľké množstvo spór. Naproti tomu spóry *C. botulinum* (typy A, B a E) nevytvárali toxín na čerstvom zeleri ani po 8 týždňoch pri 21 °C v anaeróbných podmienkach, pravdepodobne z dôvodu nedostatku živín, alebo prítomnosti inhibítorov. Rajčiaky uchovávané v obaloch s modifikovanou atmosférou pri 23 °C boli toxické 26 dní po inokulácii *C. botulinum* (zmes spór typu B a typu A). Pri 22 °C rástla *Salmonella typhimurium* v šťavách niektorých odrôd jablák.

Skladovanie pri chladiacich teplotách obmedzuje rast väčšiny potravinových patogénov. Napríklad *Shigella sonnei* sa nemnožila na strúhanom šaláte pri teplote nižšej ako 15 °C, *Staphylococcus aureus* rástol len na balených hubách (*A. bisporus*) pri teplote vyššej ako 25 °C a *Salmonella typhimurium* rýchlo klesala v jablkových šťavách pri 4 °C, ale rástla pri 22 °C. Vo vákuovo balených hubách enoki (*Flammulina velutipes*), alebo v hubách *A. bisporus* sa toxín zistil v obaloch naočkovaných proteolytickými spórmi *C. botulinum* po skladovaní pri teplote 15 °C, alebo vyššej, ale

nie pri 4, alebo 6 °C. Žiaľ, nie sú publikované žiadne údaje o očkovaní neproteolytickými kmeňmi *C. botulinum* (ktoré môžu rásť a produkovať toxín pri chladiacich teplotách. V niektorých prípadoch patogénne baktérie nerástli pri nízkych teplotách, ale preživali dlhšie ako pri izbovej teplote. *Shigella sonnei* prežila 3 dni bez poklesu na strúhanom šaláte pri 5 °C a po 7 dňoch sa obnovila len s poklesom o 1 log. Na strúhanej kapuste prežila 7 dní pri 5 °C, ale pri 24 °C čoskoro uhynula po počiatočnej fáze aktívneho rastu. *L. monocytogenes* klesol v rajčiakovej šťave pri 21 °C, ale prežil bez poklesu počas 15 dní pri 5 °C. Enterovírusy lepšie preživali na povrchu zeleniny pri nízkej teplote a vysokej vlhkosti, čo sú podmienky, ktoré sa vyskytujú pri zelenine MPF. Psychrotrofné potravinové patogény sú z hľadiska bezpečnosti MPF zeleniny znepokojujúcejšie, pretože samotné chladenie nie je účinnou bariérou pre ich množenie. Rast *L. monocytogenes* pri chladiacej teplote bol zaznamenaný na rôznych druhoch drvenej zeleniny (kapusta, hlávkový šalát, šaláty z čakanky). *L. monocytogenes* nerástli na niektorých vzorkách drveného šalátu, ale toto pozorovanie sa nepodarilo vysvetliť. Podobne baktérie nerástli ani na drvených čakankových šalátoch pri 8 °C v polypropylénovej fólii uzavretej pod vzduchom. Rast *Aeromonas hydrophila* a *Aeromonas* spp. na rôznych druhoch nespracovanej zeleniny bol zaznamenaný pri 4 °C a 5 °C. V MPF zelenine sa počty prirodzene sa vyskytujúcich *A. hydrophila* zvýšili zo  $10^3$  na  $10^4$  až  $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup> za 7 dní pri 5 °C.

## Vplyv modifikovanej atmosféry na patogény prenášané potravinami

### 1. *Clostridium botulinum*

V skladovanom ovocí a zelenine MPF rýchlo ubúda kyslík, čím sa postupne vytvárajú anaeróbne podmienky vhodné pre rozvoj *C. botulinum*. Toto sa pozorovalo u výrobkov inokulovaných proteolytickými kmeňmi *C. botulinum* a uzavretých v polymérnej fólii na vzduchu. Produkcia toxínu bola pozorovaná v niektorých vzorkách, ktorých hlavový priestor stále obsahoval 1 až 2 % kyslíka. Keď sa obalová fólia prepichla, aby sa zvýšila jej priepustnosť, koncentrácia kyslíka v obaloch inokulovaných húb nikdy neklesla pod 2 % (2,2 až 7,0 % na konci skladovania) a produkcia toxínov sa nepozorovala. Tieto výsledky sú v súlade s výsledkami získanými *in vitro*, kde sa produkcia toxínu proteolytickými kmeňmi *C. botulinum* vyskytla v priebehu 1 týždňa (pri 20 °C a pH 7) v živnom bujone v prostredí s 1 % kyslíka, ale nie s 2 % kyslíka. Všetky tieto výsledky sa získali po niekoľkých dňoch pri izbovej teplote, čo je výrazné zneužitie teploty pre produkty, ktoré by sa mali uchovávať v chlade. V prípade húb *A. bisporus*, zemiakových plátkov a strúhanej kapusty nebolo kazenie také veľké, aby boli v čase produkcie toxínu pre spotrebiteľov neprijateľné. Naopak, vákuovo balené huby enoki (*Flammulina velutipes*) inokulované *C. botulinum* sa znehodnotili ešte pred vznikom toxínu a iba rozpadnuté rajčiaky inokulované *Alternaria* spp. aj *C. botulinum* boli toxické 2 až 9 dní po prvom zaznamenaní znehodnotenia. V druhom prípade sa pri kazení zvýšilo pH rajčiakov z hodnoty pod 4,6 na 4,8, ale nie systematicky.

### 2. Iné potravinové patogény

Vplyv zloženia ovzdušia na rast potravinových patogénov na zelenine MPF sa skúmal len v niekoľkých prípadoch. Počty *Shigella sonnei* na strúhanej kapuste pri 24 °C sa po 1 dni zvýšili 3 až 4 log cykly bez ohľadu na podmienky balenia (balené vo vákuu, balené pod 30 % dusíka a 70 % CO<sub>2</sub>, balené aeróbne), ale počas

nasledujúcich dní skladovania baktérie rýchlejšie mizli vo vzorkách balených vo vákuu. Pri teplote 0 až 6 °C *S. sonnei* nerástla v žiadnej vzorke, ale lepšie preživala vo vákuovo balenej kapuste a v kapuste balenej v modifikovanej atmosfére. *L. monocytogenes* rástol podobne v strúhanom šaláte balenom na vzduchu, alebo v prostredí 97 % N<sub>2</sub> a 3 % O<sub>2</sub> a v strúhanej kapuste balenej na vzduchu, alebo v prostredí 70 % CO<sub>2</sub> a 30 % N<sub>2</sub>. Naopak, baktérie nerástli pri 8, alebo 4 °C na strúhaných šalátoch z čakanky balených na vzduchu v polopriepustnej fólii, ale rástli, keď bol výrobok balený na dusíku vo vysokobariérovej fólii. Porovnanie týchto troch pokusov vykonaných na listovej zelenine je ťažké, pretože správanie *L. monocytogenes* bolo odlišné už na kontrolných vzorkách – ktoré boli balené so vzduchom ako počiatočným priestorom v hlave. Zmeny spôsobené samotným výrobkom sú pravdepodobne rovnako dôležité ako vplyv zloženia atmosféry. Okrem toho experimenty *in vitro* ukázali, že účinok anaerobiózy na *L. monocytogenes* sa môže líšiť v závislosti od zloženia a dostupnosti živín vo výrobku. Napríklad pri pH 4,5 anaerobióza znížila rýchlosť rastu a predĺžila čas oneskorenia *L. monocytogenes* pestovaného v tryptónovom sójovom médiu s kvasničným extraktom, zatiaľ čo opačný účinok sa pozoroval v menej bohatom médiu.

Ďalšie ťažkosti pri interpretácii experimentov vykonaných na výrobkoch skladovaných v uzavretých polymérnych fóliách vyplývajú z modifikácie atmosféry, ku ktorej dochádza počas skladovania. Pokusy na nespracovanej zelenine skladovanej v kontrolovanej a konštantnej atmosfére ukázali, že *L. monocytogenes* a *A. hydrophila* neboli pri 4 a 15 °C ovplyvnené 3 až 10 % CO<sub>2</sub> a 18 až 10 % O<sub>2</sub>. Pri iných potravinových komoditách, ako sú mäsové výrobky, zvýšené koncentrácie CO<sub>2</sub> (od 50 do 100 %) znížili rast *L. monocytogenes*. Tento účinok bol výraznejší pri nízkej teplote a v neprítomnosti kyslíka. Na živných médiách sa rast *A. hydrophila* znížil pri 100 % CO<sub>2</sub> v porovnaní so vzduchom. Oxid uhličitý mal inhibičný účinok na rast týchto psychrotrofných patogénov, ale v koncentráciách, ktoré by spôsobili znehodnotenie mnohých druhov zeleniny MPF. Zdá sa, že MAP nie je účinným spôsobom na zníženie množenia potravinových patogénov (okrem *C. botulinum*) v MPF zelenine.

### **Interakcia s epifytickými mikroorganizmami**

Interakcie medzi potravinovými patogénmi a mikroorganizmami v pozadí sa podrobne skúmali v prípade mäsa a mliečnych výrobkov. Pokusy vykonané s monoxénnymi mletými hovädzimi mäсами ukázali, že *L. monocytogenes* nerástol na sterilnom mäse, rástol pri koinokulácii s *P. fluorescens* a klesal s *Lactiplantibacillus plantarum*. Vo všeobecnosti majú štartovacie kultúry mliečneho kvasenia ochranný účinok proti potravinovým patogénom v mlieku a v mäsových výrobkoch a ich antagonistické vlastnosti sa nedávno podrobne skúmali a preskúmali. Baktérie mliečneho kvasenia, medzi ktorými prevládajú *Leuconostoc* spp., môžu dosiahnuť vysoké počty na MPF zelenine po niekoľkých dňoch skladovania, a to najmä vo výrobkoch, ktoré obsahujú vysoké koncentrácie CO<sub>2</sub>. Treba poznamenať, že kmeň *Leuconostoc* spp. produkuje bakteriocíny účinné proti *L. monocytogenes*.

Bolo zistené, že fluorescenčné pseudomonády môžu aktivovať rast *L. monocytogenes* v pasterizovanom mlieku, ako aj na mäse, hoci iní pracovníci zistili, že pseudomonády mierne inaktivovali *L. monocytogenes* v pasterizovanom mlieku po exponenciálnej fáze rastu. Pravdepodobne k tomu došlo preto, že pseudomonády

hydrolyzovali mliečne bielkoviny, zatiaľ čo samotné *L. monocytogenes* nie. V prípade rastlinných produktov nie sú podobné výsledky, ale fluorescenčné pseudomonády sú hlavnou zložkou ich mikrobioty a môžu sa aktívne podieľať na rozklade rastlinných tkanív. Ich úloha pri uvoľňovaní potenciálnych živín pre patogénne mikroorganizmy stojí za ďalšie skúmanie.

### **Vplyv na rastlinné pletivá**

Pri lúpaní, krájaní a drvení počas spracovania ovocia a zeleniny s obsahom MPF sa mikroorganizmy prítomné na povrchu dostávajú do kontaktu s poškodenými rastlinnými pletivami. Táto zmena prostredia má za následok nielen zmenu pH a možné uvoľňovanie živín, ale aj antimikrobiálnych látok z rastlinných buniek. Poranenie rastlinných pletív často vyvoláva špecifické reakcie, ktoré môžu ovplyvniť správanie mikroorganizmov.

#### **1. Vplyv pH**

*Listeria monocytogenes* rástla na celých rajčiakoch, ale na plátkoch rajčiakov hynula, pravdepodobne kvôli kyslej šťave, ktorá sa uvoľnila pri krájaní. Bol vyodený záver, že pH väčšiny zeleniny a niektorých druhov ovocia by mohlo umožňovať rast baktérií prenášaných potravinami. Nízke pH pomarančovej šťavy spôsobilo rýchle vyhubenie *L. monocytogenes*, ale *Salmonella typhimurium* prežila a rástla v šťavách niektorých odrôd jabĺk pri pH 3,68, alebo vyššom a proteolytické kmene *C. botulinum* boli schopné produkovať toxín v rozkladajúcich sa rajčiakoch pri pH 4,32. pH zeleniny MPF sa mohlo počas skladovania znížiť (zo 6,0 na 4,6 v niektorých vzorkách strúhanej mrkvy a z 5,09 na 3,70 v prípade strúhanej kapusty skladovanej 4 d pri 24 °C), čo malo vplyv na prežívanie patogénnych baktérií.

#### **2. Antimikrobiálne látky**

Antimikrobiálne látky sú prítomné v mnohých druhoch zeleniny. Napríklad výťažky z cesnaku a cibule vykazujú antimikrobiálne vlastnosti a varená kapusta má bakteriostatický účinok na *L. monocytogenes*. Všeobecnejšie povedané, mnohé zlúčeniny zapojené do obranných mechanizmov ovocia a zeleniny proti parazitom sú antimikrobiálne: oleuropeín z olív inhibuje klíčenie spór *Bacillus cereus* a množenie laktobacilov. Kumaríny a polyacetylénové zlúčeniny akumulované v koreňoch mrkvy v reakcii na stres majú široké antimikrobiálne spektrum. Účasť týchto zlúčenín na správaní sa potravinových patogénov v ovocí a zelenine MPF nebola skúmaná. Prítomnosť antimikrobiálnych látok v zelenine nemusí nevyhnutne znížiť rast mikroorganizmov v MPF produkte. Napríklad šťava z červenej čakanky bola inhibičná pre *A. hydrophila*, ale baktérie dobre rástli na MPF výrobku. V prípade mrkvy malo krájanie smrteľný účinok na *L. monocytogenes*, čím sa vysvetľuje, že baktérie sa na rozdrvenej mrkve nerozmnožovali (aspoň počas prvých dní skladovania). Tento účinok bol potlačený v neprítomnosti kyslíka a bol stabilnejší pri nízkych teplotách, takže letálne účinky MPF mrkvy na *L. monocytogenes* mohli závisieť aj od podmienok skladovania.

#### **3. Živiny**

Často sa predpokladá, že živiny uvoľnené z rezných plôch pripravovanej čerstvej zeleniny zvyšujú rast mikroorganizmov. Tomuto tvrdeniu odporuje zistenie, že

miera rastu *L. monocytogenes* na celej surovej zelenine (rast o 1 až 2 log cykly po 20-dňovom skladovaní pri 4 °C a o 3 až 4 log cykly po 1 týždni pri 15 °C) je podobná miere rastu uvádzanej v prípade niektorých šalátov MPF. Uvoľňovanie živín z rezných plôch môže závisieť od straty selektivity bunkových membrán v zeleninových pletivách v dôsledku starnutia.

## Prevenca a kontrola

### A. Mikrobiologická dekontaminácia ovocia a zeleniny MPF umývaním a dezinfekciou

#### 1. Oplachovanie vodou

Spracovanie ovocia a zeleniny z MPF sa zvyčajne začína umytím vo vode. Okrem odstránenia zvyškov pôdy a rastlinných zvyškov má umývanie obmedzený vplyv na mikroorganizmy. Napríklad umývanie šalátových listov znížilo celkový počet o 0,2 až 0,5 log cyklov. Po umytí vodovodnou vodou bolo zaznamenané zníženie celkového počtu a počtu Enterobacteriaceae o 0 až 0,5 log cyklov na šalátoch pripravených na použitie a žiadne zníženie celkového počtu na petržlenovej vňati. Podobne sa zistilo zníženie o 0,4 log cyklu na listoch špenátu. Iní autori zaznamenali zníženie o 1 log cyklus. Zníženie počtu *B. cereus* o 1 log cyklus na fazuľových klíčkoch sa dosiahlo po postupnom premytí vodovodnou vodou.

#### 2. Chlór

Chlór sa bežne používa na dezinfekciu celého ovocia a zeleniny. Jeho možné použitie v baliarňach pri umývaní, chladení a preprave výrobkov. Bol publikovaný vplyv koncentrácie roztokov chlóru na celkový počet a fekálne koliformných baktérii na listoch zeleného šalátu počas umývania. Najvyššie počty boli na neošetrených vzorkách. Celkové počty mikroorganizmov sa výrazne znížili, keď sa koncentrácia voľného chlóru zvýšila na 50 ‰, ale vyššie koncentrácie (až do 200 ‰) už počty neznížili. Podobné pozorovania sa uskutočnili pri koncentráciách voľného chlóru od 0 do 300 ‰. Zdá sa, že fekálne koliformné baktérie sú veľmi citlivé na chlór. Na šalátových listoch neboli zistené v 70, 100 a 90 % vzoriek ošetrených 10, 20 a 50 ‰ voľného chlóru, zatiaľ čo 70 % neošetrených vzoriek bolo pozitívnych. Predĺženie času kontaktu z 5 min na 20, alebo 30 min, alebo pH roztoku chlóru v rozmedzí od 4,0 do 8,8 neovplyvnilo celkový počet, alebo ho ovplyvnilo len mierne.

Účinnosť dekontaminácie závisí od produktu: ponorenie do vody obsahujúcej 300 ‰ voľného chlóru znížilo celkový počet mikroorganizmov z  $1,10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup> na  $3,10^3$  KTJ.g<sup>-1</sup> na šaláte, ale nemalo žiadny účinok na mrkvu a červenú kapustu. Iní autori zaznamenali zníženie len o 1 log cyklus na šaláte s 200 až 250 ‰ voľného chlóru.

Vzhľadom na smrteľné infekcie spôsobené zeleninou MPF kontaminovanou *L. monocytogenes* sa skúmal vplyv dezinfekcie na tento mikroorganizmus. Ružičkový kel bol inokulovaný *L. monocytogenes* ( $10^6$  KTJ.g<sup>-1</sup>), vysušený a ponorený do 200 mg.l<sup>-1</sup> chlórového roztoku. Počty *L. monocytogenes* sa znížili približne 100-násobne, len 10 krát viac ako pri ošetrení vodou. Napriek tomu sa *L. monocytogenes* v chlórovanom roztoku a na ružičkových klíčkoch následne ponorených do toho istého roztoku po inokulovaných vzorkách nedetekoval. Dezinfekcia listov šalátu, alebo plátkov rajčiakov chlórrom (200 mg.l<sup>-1</sup>) pred inokuláciou *L. monocytogenes* nemala vplyv na rast baktérií počas skladovania pri 5, alebo 10 °C.



Zníženie celkového počtu je v priemere 1 až 2 log cykly, ale bolo zaznamenané aj zníženie o 0 až 1 log cyklus a 3 log cykly. Eliminácia patogénnych mikroorganizmov, ako je *L. monocytogenes*, z povrchu zeleniny chlóróm je obmedzená, alebo nepredvídateľná. Okrem toho významné rozdiely medzi dezinfikovanými a kontrolnými vzorkami zmiznú po niekoľkých dňoch skladovania. Naopak, chlór má rýchlu antimikrobiálnu aktivitu *in vitro* voči širokému spektru mikroorganizmov a *L. monocytogenes* nemá vnútornú rezistenciu voči chlóru. Neúčinnosť chlóru teda môže byť spôsobená rôznymi faktormi, vodný roztok chlóru nemusí zmáčať hydrofóbny povrch voskovej pokožky zeleniny a vytvorenie biofilmu by mohlo chrániť mikroorganizmy pred smrtiacimi účinkami chlóru. Kontakt s pletivom hostiteľa môže chlór inaktivovať. Treba poznamenať, že vo všeobecnosti adhézie na rôzne inertné nosiče zvyšovali odolnosť listeríí voči dezinfekčným prostriedkom. Chlór by mohol byť užitočnejší pri inaktivácii väčšiny vegetatívnych buniek z prívodu vody a vo vodných kúpeľoch používaných počas spracovania, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii.

### 3. Organické kyseliny

Testovala sa účinnosť širokého spektra organických kyselín pri dezinfekcii zeleniny MPF, ako sú kyseliny octová, mliečna, citrónová a propiónová v množstve 300 až 500 mg.ml<sup>-1</sup>. Zníženie celkového počtu sa výrazne nelíšilo od zníženia dosiahnutého s vodou. Výsledky s kyselinou citrónovou od 0 do 1500 ‰ rast baktérií počas 4 dní skladovania pri 10 °C sa nelíšil od rastu pozorovaného na kontrolách. Pri kyseline vínnej v koncentrácii 1500 ‰ sa celkový počet znížil desaťnásobne a rozdiely oproti kontrolám sa udržali počas 4 dňoch skladovania pri 10 °C. V inej práci bolo zníženie celkového počtu získaných s kyselinou askorbovou, sorbátom, alebo kombináciou oboch zlúčenín na zmiešaných šalátoch vždy pod 1 log cyklus a po 10 dňoch skladovania pri 4,4 °C sa nezaznamenali žiadne rozdiely. Autori dospeli k záveru, že takéto ošetrenie bolo neúčinné. Pri znižovaní počtu *Yersinia enterocolitica* inokulovaných na listoch petržľenu zo 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> na menej ako 1 KTJ.g<sup>-1</sup> ponorením listov do roztoku 2 % (v/v) kyseliny octovej, alebo 40 % (v/v) octu na 15 min. Autori nepopisovali vzhľad listov po dezinfekcii.

Iné dezinfekčné prostriedky boli hodnotené z hľadiska ich schopnosti dezinfikovať zeleninu pripravenú na použitie. Niektoré z nich nie sú povolené v potravinách určených na ľudskú spotrebu. Testovala sa dezinfekcia šalátov pripravených na použitie s 90 ‰ kyseliny peroctovej: zníženie celkového počtu a fekálnych koliformných baktérií (takmer 2 log cykly) bolo podobné ako pri použití 100 ‰ chlóru. Zdá sa, že rast baktérií sa počas skladovania znížil, čo autor vysvetlil reziduálnymi účinkami kyseliny octovej uvoľnenej pri rozklade kyseliny peroctovej. Využitie takýchto reziduálnych účinkov na kontrolu mikrobiálneho rastu preto nemusí byť možné. V čerstvej zeleninovej zmesi sa pozorovalo trojnásobné zníženie celkového počtu pri použití oxytetracyklínu 50 ‰ v porovnaní s umývaním vodou. Rast baktérií sa počas skladovania znížil a po 3 dňoch skladovania pri 10 °C sa pohyboval medzi 2 a 4 ‰ kontrolných hodnôt. Zvyškový počet po umytí pripravených šalátov povrchovo aktívnou látkou, ako je Tween 80 (1000 mg.l<sup>-1</sup>), bol 7,4 ‰ v porovnaní s 37 ‰ v prípade chlóru pri 100 ‰ a pH 5. Autori poznamenali, že zmes 100 mg.l<sup>-1</sup> chlóru a roztoku Tween 80 nebola účinnejšia ako samotný 1000 mg.l<sup>-1</sup> Tween 80.

## 5. Ožarovanie

Účinky ožarovania na mikroorganizmy potravinových výrobkov sa skúmali v mnohých laboratóriách. Ožarovanie pri dávkach nižších ako 2 kGy je vo všeobecnosti účinnejšie ako chemická dezinfekcia, pričom celkový počet mikroorganizmov sa vo všeobecnosti znižuje  $10^3$  až  $10^4$  násobne. Účinnosť sa líši v závislosti od výrobkov, ako ukazuje porovnanie vzoriek ožiarenej strúhanej mrkvy a šalátovej zmesi. Citlivosť závisí od druhu mikroorganizmov. Počet enterobaktérií vrátane fekálnych koliformných baktérií sa znižuje rovnakým pomerom ako celkový počet, zatiaľ čo počet kvasiniek sa znižuje len 10 až 100 násobne a bakteriálne spóry odolávajú 1 kGy. Vo všeobecnosti rozdiely v počte baktérií na MPF zelenine dezinfikovanej chemickými látkami rýchlo miznú. Naopak, nižšie počty dosiahnuté ožarovaním pretrvávajú počas skladovania.

### **Plynová priepustnosť obalového materiálu**

Nedávny vývoj v oblasti obalových technológií viedol k vytvoreniu nových fólií, ktorých priepustnosť sa dá vopred zvoliť. Po vyrovnaní respirácie a difúzie plynov cez fóliu možno zloženie atmosféry pod týmito fóliami presne predpovedať pomocou matematických modelov. Výber priepustnosti fólie pre ovocie a zeleninu MPF je však silne obmedzený požiadavkami rastlinného pletiva na kyslík a toxickým účinkom oxidu uhličitého. Anaerobióza, alebo vysoké koncentrácie  $\text{CO}_2$  (nad 20 %) môžu napríklad spôsobiť fyziologické poruchy ovocia a zeleniny. Kvalita mnohých druhov MPF zeleniny, ako je napríklad strúhaná mrkva, strúhaný čakankový šalát a umyté a nakrájané huby *A. bisporus*, sa lepšie udržiava pri stredne vysokých koncentráciách  $\text{CO}_2$  (5 až 20 %) a stredne nízkych koncentráciách  $\text{O}_2$  (2 až 5 %). Rozsah dosiahnuteľných úprav atmosféry v MPF zelenine je preto obmedzený, ale niektoré príklady uvedené v tejto knihe ukazujú, že výber správnych podmienok balenia môže byť účinným a jednoduchým spôsobom, ako oddialiť rozvoj mikroorganizmov a ich kazenie.

Hlavné identifikované riziká sú: 1) zníženie kazivosti, čo predlžuje dobu skladovania, a tým aj čas pre rast patogénov a 2) možný rozvoj anaeróbnych patogénov. Prvé riziko môže byť vyvážené, alebo zosilnené priamym vplyvom modifikovanej atmosféry na patogény. Druhé riziko sa týka *C. botulinum*. Produkcia toxínu bola pozorovaná pri izbovej teplote v MPF zelenine, ktorá obsahovala menej ako 2 % kyslíka, a malo by sa zvažovať, či je pravdepodobné, že sa takéto podmienky vyskytnú počas životnosti výrobkov. V prípade zeleniny MPF balenej s počiatočným vzduchovým priestorom sa obsah kyslíka počas skladovania znižuje, ale koncentrácie klesnú pod 2 % až po niekoľkých dňoch: pri teplote 4,4 °C, alebo 15 dní pri teplote 5 °C v prípade šalátu. Napriek tomu sa na zlepšenie kvality odporúča znížiť koncentráciu kyslíka na 3 % v šaláte, alebo na 5 % v šaláte ľadovom vstrekaním dusíka. Kyslík sa potom rýchlo znížil na menej ako 1 % po 4 až 5 dňoch pri 8 °C, alebo 5 °C. Preto priepustnosť fólie nie je dostatočná na vyrovnanie spotreby kyslíka. Toto riziko je zvýšené v prípade mnohých druhov zeleniny MPF, pretože krájanie, alebo drvenie zvyšuje rýchlosť dýchania. Pri teplote 24 až 26 °C viedla vysoká rýchlosť dýchania húb *A. bisporus* k rýchlej spotrebe kyslíka dostupného v obale a umožnila produkciu toxínu spórami *C. botulinum*, hoci výrobok bol balený so vzduchom ako počiatočným priestorom. Zvýšením priepustnosti fólie je možné zabrániť vyčerpaniu kyslíka pri izbovej teplote a znížiť riziko tvorby toxínov. Zároveň by takáto vysoká priepustnosť pri chladiacich teplotách dramaticky zvýšila koncentráciu kyslíka v obale,

pretože by sa výrazne znížila spotreba kyslíka. To by mohlo mať negatívny vplyv na kvalitu výrobku a mohlo by to napríklad zvýšiť hneďnutie šalátu, alebo umožniť výrazné dýchanie strúhanej mrkvy a spôsobiť rýchly rozklad sacharózy. Výber obalového materiálu, ktorý by zabránil riziku *C. botulinum* pri skladovaní pri izbovej teplote, by pravdepodobne vylúčil akékoľvek použitie MAP na zlepšenie kvality MPF ovocia a zeleniny pri skladovaní v chladničke. Pred vyvodením akýchkoľvek pevných záverov je potrebné zodpovedať dve otázky: 1) Je pravdepodobné, že ovocie a zelenina MPF budú vzhľadom na rýchle kazenie pri izbovej teplote vystavené počas svojej životnosti niekoľkodňovej expozícii pri izbovej teplote a 2) ako sa správajú psychrotrofné kmene *C. botulinum* na ovocí a zelenine MPF pri teplotách, ktoré sa bežne vyskytujú pri chladení?

## 5.6 Kontrola chladenia

Zníženie skladovacej teploty znižuje mikrobiálny rast v zelenine MPF a, ako sa uvádza v predchádzajúcej časti, výrazne spomaľuje mikrobiálne kazenie. V niektorých prípadoch nie je mikrobiálny rast limitujúcim faktorom trvanlivosti pri teplote 4 °C, alebo nižšej. K rozvoju mnohých potravinových patogénov v ovocí a zelenine MPF dochádza pri teplotách 15 °C, alebo vyšších, zatiaľ čo pri chladiacich teplotách môžu vyvolávať obavy len psychrotrofné patogény. Okrem toho by prekročenie teploty počas skladovania urýchlilo hromadenie oxidu uhličitého a spotrebu kyslíka v obale, čím by sa zvýšilo riziko kazenia fermentačnými mikroorganizmami a rozvoja anaeróbných potravinových patogénov. Je potrebné zdôrazniť, že pokusy o stanovenie mikrobiologických špecifikácií pre výrobok pri "dátume spotreby" nemajú význam, ak sa v praxi prísne nedodržiava teplota skladovania. Podobne aj voľba priepustnosti obalového materiálu tak, aby sa vo výrobku udržali aspoň 2 % kyslíka, by bola ťažko dosiahnuteľná, ak by sa teplota počas doby skladovania príliš menila.

Ovocie a zelenina MPF podporuje rýchly rast mikroorganizmov a často sa vyskytujú počty  $10^7$  až  $10^8$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Prevládajú druhy, ktoré sa bežne vyskytujú na povrchu ovocia a zeleniny, hoci modifikovaná atmosféra často podporuje rast kvasiniek a baktérií mliečneho kvasenia. Fytopatogénne mikroorganizmy, ktoré spôsobujú značné straty počas pestovania a skladovania ovocia a zeleniny, boli v zelenine s MPF izolované len zriedkavo. Mikroorganizmy počas skladovania výrazne rastú, ale ich úloha pri znehodnocovaní ovocia a zeleniny MPF sa ťažko stanovuje a zdá sa, že sa líši v závislosti od druhu posudzovaného výrobku. Jedným z dôvodov môže byť existencia biochemických a fyziologických mechanizmov kazenia v rastlinnom pletive. Možnosť kontaminácie patogénmi prenášanými potravinami vyvoláva obavy z hľadiska bezpečnosti ovocia a zeleniny z MPF. Prísne hygienické podmienky počas pestovania a spracovania môžu obmedziť, ale nie vylúčiť kontamináciu. Pokusy s inokuláciou preukázali schopnosť mnohých patogénnych mikroorganizmov rásť na produktoch MPF. Konzervácia kombinovanými metódami sa na ovocie a zeleninu z MPF nevzťahuje. Používanie prídavných látok nie je vo všeobecnosti povolené. Zloženie modifikovaných atmosfér sa dá ľahko kontrolovať, ale ich účinky sú nejednotné. Konkurencia s epifytickou mikrobiotou, alebo reakcie rastlinného tkaniva môžu obmedziť rast patogénov, ale tieto faktory sú nepredvídateľné. Preto je na kontrolu faktorov súvisiacich s kontamináciou, prežívaním

a rastom mikroorganizmov v každom štádiu potravinového reťazca potrebné dodržiavanie správnej výrobných praxe a systému analýzy rizík a kritických kontrolných bodov (HACCP). Jedinými istými a účinnými faktormi znižujúcimi rast potravinových patogénov sú najmä dobrá kontrola chladenia a doba skladovania obmedzená dátumom spotreby. Doba trvanlivosti môže byť často určená ekonomickými hľadiskami, ale mala by sa vykonať systematická štúdia rastu potravinových patogénov na ovocí a zelenine MPF v závislosti od teploty, zloženia atmosféry a vývoja kazení.

## 6 Zemiaky a zemiakové výrobky

Na čerstvých, minimálne spracovaných a úplne spracovaných zemiakových výrobkoch sa vyskytuje mnoho druhov kaziacich sa a patogénnych mikroorganizmov. Zemiaky sa spracúvajú na mnohé výrobky vrátane mrazených, sušených, pripravených na konzumáciu a minimálne spracovaných. Mikrobiologickú kvalitu hotových zemiakových výrobkov ovplyvňuje prirodzená mikrobiota, spracovanie, manipulácia a kontakt s ľuďmi. Prirodzenú mikrobiotu zemiakov ovplyvňujú pôdne a vzdušné inokuly, poľnohospodárske postupy, metódy zberu a podmienky skladovania. Mikrobiota spracovaných výrobkov je ovplyvnená všetkými faktormi a podmienkami, ktoré ovplyvňujú prirodzenú mikrobiotu, ako aj procesy, ktoré sa na výrobku uplatňujú. Zvýšený dopyt spotrebiteľov po nových a existujúcich zemiakových výrobkoch zdôrazňuje význam zabezpečenia ich mikrobiologickej bezpečnosti.

Pred rokom 1930 sa zemiaky predávali len v čerstvom balení (nelúpané, celé). Priemysel spracovaných zemiakov sa začal okolo roku 1933, keď sa zemiaky dodávali do reštaurácií a distribútorom stravovacích služieb v kovových nádobách s vodou, alebo slaným nálevom. Okolo roku 1936 sa začali distribuovať lúpané zemiaky v suchom balení (nevarené, celé, bez vody, alebo v soľnom roztoku) pre potravinársky priemysel. Krátko na to sa predošlé lúpané, nevarené, celé zemiaky v suchom balení začali distribuovať v maloobchodoch. Prvé zemiaky v maloobchodnej ponuke mali trvanlivosť približne 6 dní, ak sa skladovali pri teplote 4 °C, alebo nižšej. Tento problém viedol potravinárskych technológov k vývoju nových baliacich systémov a konzervačných látok na predĺženie trvanlivosti výrobkov. V roku 1940 malá továreň na spracovanie zemiakov v Idaho Falls v štáte Idaho (Rodgers Brothers Co.) získala od armádneho veliteľstva Spojených štátov amerických zákazku na výrobu dehydrovaných zemiakov v kockách. Po tomto výrobku bol počas druhej svetovej vojny zo strany armády veľký dopyt. Veľkosť trhu s dehydrovanými zemiakmi sa zvýšila v roku 1940, keď Jack Simplot postavil nový závod v meste Caldwell v štáte Idaho. Začiatkom 40. rokov 20. storočia sa o vývoj mrazených vyprášaných zemiakov zaslúžil Ray Dunlap, ktorý pracoval pre spoločnosť Simplot v dehydratačnom závode v Caldwelli v štáte Idaho, a čoskoro sa na trhu objavili aj ďalšie mrazené zemiakové výrobky.

Maloobchodný trh po druhej svetovej vojne vyzeral byť pre sušičky zemiakov sklamaním, pretože vracajúci sa americkí vojaci hľadali alternatívu k sušeným zemiakom v kockách.

Spracovatelia zemiakov začali hľadať nové metódy spracovania a výrobky, ktoré by mohli ponúknuť povojnovým spotrebiteľom. Koncom 50. rokov 20. storočia sa

v odvetví konzervovania zemiakov pred lúpaním okrem iného používali antibiotiká, sulfitačné činidlá, kyselina citrónová, kyselina fosforečná, kyselina sírová, kyselina chlorovodíková a kyselina šťaveľová. Väčšina týchto konzervačných prípravkov bola zameraná na kontrolu hneďnutia potravinárskych a maloobchodných výrobkov a mikrobiologickej kvalite zemiakových výrobkov sa venovalo málo pozornosti. Bolo známe, že trvanlivosť zemiakových výrobkov sa skracaje najmä v dôsledku vzniku neprijemných pachov (kyslosť, kvasinkovitosť), neprijemných chutí a zlej štruktúry (strata chrumkavosti). Hoci sa priemyslu predlúpaných zemiakov podarilo zachovať farbu výrobkov, bez primeraného chladenia stále dochádzalo k rýchlemu mikrobiálnemu kazeniu. Podľa Komisie pre zemiaky v Idahu priemerný občan USA spotrebuje približne 140 lb zemiakov ročne. Priemerná americká zemiaková strava pozostáva z 58,8 lb mrazených zemiakových výrobkov (hranolčky, hash-brown atď.), 49,8 lb čerstvých zemiakov, 16,9 lb zemiakových lupienkov, 13,4 lb dehydrovaných výrobkov (vločky, zmesi na gratinovanie atď.) a 1,7 lb konzervovaných zemiakov. V roku 1995 tvorili hranolky približne 650 miliónov lb zo 6,5 miliardy lb mrazených zemiakových výrobkov vyrobených v Spojených štátoch. Spotrebiteľia v maloobchode v Spojených štátoch v roku 1995 nakúpili 777,3 milióna lb mrazených zemiakových výrobkov v hodnote približne 712,8 milióna USD. Rastúca spotreba čerstvých a ľahko spracovaných produktov na obyvateľa v Spojených štátoch a iných krajinách viedla k rastúcemu počtu prepuknutí gastroenteritídy, ktoré sa pripisujú kontaminovaným produktom. Za posledných 30 rokov boli zemiaky a výrobky zo zemiakov zapletené do niekoľkých prepuknutí chorôb z potravín v Spojených štátoch, Holandsku a Spojenom kráľovstve. V roku 1986 vydalo Centrum pre bezpečnosť potravín a aplikovanú výživu amerického Úradu pre potraviny a liečivá vzorový výklad kódu, ktorý označil kľíčky, ovocie a zeleninu, ktoré boli tepelne ošetrované, za potenciálne nebezpečné. Hoci prieniku potenciálne patogénnych mikroorganizmov do vnútra zemiakov bráni šupka (fyzikálna bariéra), tepelné procesy môžu túto bariéru zničiť, denaturovať bielkoviny a degradovať komplexné sacharidy na formy ľahšie využiteľné mikroorganizmami. Zahrievanie môže zničiť prirodzenú mikrobiotu zemiakov, ktorá súťaží s patogénnymi mikroorganizmami o živiny. Bez konkurencie iných mikroorganizmov by sa patogény mohli ľahšie množiť na zemiakových výrobkoch, alebo iných čerstvých produktoch, čo by mohlo spôsobiť problém s bezpečnosťou potravín.

## 6.1 Mikrobiológia zemiakov a výrobkov zo zemiakov

Mikroorganizmy, ktoré tvoria mikrobiotu zemiakov a výrobkov zo zemiakov, sú početné a rozmanité. Tak ako v prípade všetkých čerstvých produktov, aj populácie týchto mikroorganizmov v zemiakoch sa môžu výrazne líšiť v závislosti od podmienok prostredia počas pestovania, zberu, pozberovej úpravy a spracovania. Je známe, že surová zelenina je vďaka svojej vysokej aktivite vody ( $a_w$ ), neutrálnemu pH a obsahu živín schopná podporovať rast takmer všetky druhy mikroorganizmov. Zemiaky (*Solanum tuberosum* L.) nie sú výnimkou. Vzhľadom na ich blízkosť k pôde je vonkajšia strana zemiakov bežne kontaminovaná baktériami a hubami. Podobne ako iné rastlinné druhy, aj zemiaky trpia viacerými chorobami spôsobenými týmito mikroorganizmami. Hnedú hnilobu, alebo bakteriálne vädnutie zemiakov spôsobuje

*Pseudomonas solanacearum*. Pri tejto chorobe začínajú zemiaky hniť v pôde pred zberom a ďalej sa kazia pri skladovaní. *Streptomyces scabies* je organizmus, ktorý spôsobuje chrastavitosť, alebo aktinomycetovú chrastavitosť zemiakov. Táto baktéria sa prenáša pôdou a je jednou z hlavných chorôb zemiakov v Spojených štátoch. Choroba napáda všetky podzemné časti zemiakov. Neskorú pleseň zemiakov spôsobuje vláknitá huba *Phytophthora infestans*, ktorá napáda zemiaky na poli aj v sklade. Táto huba bola jednou z hlavných príčin írskeho zemiakového hladomoru v rokoch 1845 až 1850. Spóry sa šíria dažďom, zavlažovacou vodou a vetrom a zemiaky sú infikované inokulom prenášaným vodou. Neskorá pleseň môže infikovať listy, stonky a hľuzy počas celého vegetačného obdobia. Závažnosť neskorej plesne hľúz sa zvyšuje počas skladovania a prepravy hľúz. Skorá pleseň je jednou z najčastejších listových chorôb, ktoré postihujú zemiaky v štáte Idaho, a môže spôsobiť značné straty na celkovej úrode. Skorá pleseň sa bežne vyskytuje v porastoch zemiakov zavlažovaných postrekovačmi kvôli ľahko dostupnej vlhkosti, ktorá je pre hubu ideálna. Skorú pleseň spôsobuje vláknitá huba *Alternaria solani*, ktorá infikuje zemiaky v čase zberu cez rany a otlaky a dokonca aj cez zdravé šupky. Existujú tri typy fuzáriovej hniloby: suchá hniloba, vädnutie a prechodná choroba. Suchá hniloba je typická choroba pri skladovaní, pričom k infekcii hľúz dochádza cez rany, ktoré vznikli počas zberu a manipulácie. Chorobu spôsobujú huby *Fusarium sambucinum*, alebo *Fusarium coeruleum*. Každý z týchto dvoch druhov môže spôsobiť suchú hnilobu, ale existujú rozdiely v príznakoch a spôsoboch hnitia. Poranenia spôsobené *F. coeruleum* sú žlté až hnedé a postupujú rovnomerne cez tkanivá hľúz. Poranenia spôsobené *F. sambucinum* sú tmavohnedé až čierne a v tkanivách hľúz postupujú nerovnomerne. Pri oboch typoch suchej hniloby sú lézie suché a hubovité a môžu byť sprevádzané dutinami. Huby suchej hniloby sa do zemiakov dostávajú len cez rezy a otvory v šupke spôsobené pomliaždením počas zberu a prepravy a počas skladovania sa nešíria z hľuzy na hľuzu. Choroba vädnutia sa prejavuje ako zmena farby viniča a ciev a prechodná choroba je kombináciou oboch ostatných chorôb. Bakteriálna mäkká hniloba sa často spája s fuzáriovou hnilobou hľúz. Existuje niekoľko druhov *Fusarium*, ktoré sú spojené s hnilobami a vädnutím zemiakov. Verticiliové vädnutie spôsobuje buď *Verticillium alboatrum*, alebo *Verticillium dahliae*. Tieto vláknité huby majú široké spektrum hostiteľských rastlín a infikujú zemiaky prostredníctvom pôdy. Huba kolonizuje zemiaky cez korene a nakoniec môže napadnúť celú rastlinu.

Strieborná škvrnitosť je choroba zemiakov spôsobená hubou *Helminthosporium solan*. Táto huba, predtým známa ako *Spondylocladium atrovirens*, môže prežívať v semenách zemiakov, v pôde a na odumretých a rozkladajúcich sa látkach. Spóry, alebo konídie slúžia ako zdroj inokula na šírenie choroby. Huba dokáže preniknúť cez periderm hľuzy, a preto nepotrebuje ranu na začatie infekčného procesu. K maximálnej infekcii a rozšíreniu choroby na čerstvo zozbierané zemiaky dochádza počas manipulácie a prvých 2 až 3 týždňov skladovania. Výsledkom infekcie hľúz na poli je hladký, sivý a strieborný lesk na šupke, zatiaľ čo infekcia počas skladovania sa prejavuje ako čierne, kruhové lézie, ktoré sa s postupujúcou chorobou zväčšujú.

Bakteriálna čierna mäkká hniloba je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich ochorení zemiakov. Zdá sa, že ide o komplex chorôb, pri ktorých môže niekoľko druhov baktérií vyvolávať rôzne príznaky na stonke, listoch, alebo hľuzách. S mäkkou hnilobou sú spojené najmenej štyri druhy, alebo poddruhy baktérií. Patria medzi ne *Erwinia* (teraz *Pectobacterium*) *carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* ssp.

*atroseptica*, *Pseudomonas marginalis* a *Clostridium* spp. Baktérie rozkladajú pektíny v zemiakoch a spôsobujú ich nasiaknutie vodou. Bakteriálne mäkké hniloby sa bežne vyskytujú v spojení s inými hnilobami, ako je fuzáriová hniloba semien a krúžková hniloba. Bakteriálnu kruhovú hnilobu zemiakov spôsobuje *Corynebacterium sepedonicum*. K zničeniu zemiakov môže dôjsť kedykoľvek počas ich rastu a skladovania. Baktéria sa nepovažuje za prenosnú na pôdu, ale šíri sa z hľuzy na hľuzu prostredníctvom rán, otlakov, kontaminovaných nožov pri rezaní sadiva, zberacích a sadiacich zariadení a kontaminovaných skladovacích nádob a zariadení.

Prášnú chrastavitosť spôsobuje huba *Spongospora subterranea* f. spp. *subterranea*, ktorá sa vyvíja na podzemných častiach zemiakov vrátane koreňov, stolónov a hľúz. Choroba sa prejavuje bradavičnatými výrastkami, alebo bielymi hálkami, ktoré počas dozrievania zhnednú. K infekcii hľúz dochádza cez rany, očká a šošovky a výsledkom sú chrastovité lézie vyplnené práškovitou hmotou tmavých spór. Pri skladovaní sa na infikovaných hľuzách môže vyvinúť suchá hniloba, alebo ďalšie lézie, a tak sú náchylné na infekciu mikroorganizmami, ktoré spôsobujú skladové hniloby.

Viacerí výskumníci izolovali ľudské patogénne baktérie zo surových zemiakov. Analyzovali sa kmene *Clostridium botulinum* typu E na 67,5 % (27 zo 40) skúmaných vzoriek zemiakových šupiek z rôznych oblastí Švédska a na každej z troch vzoriek čerstvých zemiakov z Izraela. Mikroorganizmus bol izolovaný aj zo vzoriek pôdy, piesku a štrku a potokov z tej istej oblasti v Izraeli, z ktorej pochádzali vzorky zemiakov.

Dospelo sa k záveru, že vypuknutie hemoragickej kolitídy vo východnej Anglicku v Spojenom kráľovstve spôsobila *Escherichia coli* O157:H7. Vypuknutie epidémie súviselo so zlým zaobchádzaním so surovými zemiakmi pri ich domácej príprave.

V Nemecku bola izolovaná *Listeria monocytogenes* z približne 12,5 % odobratých vzoriek zemiakov a tiež z pôdy, v ktorej rástli. V období od októbra 1987 do augusta 1988 boli izolované *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* a *Listeria welshimeri* zo zemiakov zakúpených v supermarketoch v oblasti Minneapolis, Minn. Títo výskumníci uviedli, že izolovali *Listeria* spp. z 25,8 % odobratých vzoriek zemiakov. Naopak, v zemiakoch zakúpených na maloobchodných trhoch analyzovaných v rokoch 1986 až 1987 nezistili *L. monocytogenes*.

V inej štúdii bol zo zemiakov izolovaný *Staphylococcus aureus* v množstve od 2 log KTJ.g<sup>-1</sup> do 6 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Zemiaky pochádzali z trhoviska pod holým nebom v Pakistane, kde neboli ľahko dostupné zariadenia na umývanie rúk.

### **Mikroorganizmy spojené so spracovanými surovými zemiakmi**

Viacerí výskumníci skúmali mikrobiotu zo spracovaných surových (ošúpaných, olúpaných a nakrájaných) zemiakov. Zo vzoriek spracovaných zemiakov bolo izolovaných 40 rôznych baktérií, kvasiniek a húb. Spracovanie zahŕňalo šúpanie, orezávanie, krájanie na hranolčeky, oplachovanie vo vode, ponorenie do disiričitanu sodného (10 000 mg.ml<sup>-1</sup> SO<sub>2</sub>) na 30 sekúnd, osušenie a balenie do polyetylénových vriec pred uskladnením pri 10 °C. Títo výskumníci neidentifikovali žiadny z izolovaných mikroorganizmov, ale dospeli k záveru, že pektinolytické organizmy prispeli k zmäknutiu a exsudácii a boli hlavným faktorom, ktorý prispel k skorému pokazeniu komerčne spracovaných zemiakov.

Skúmala sa mikrobiota spojená so zemiakmi, ktoré boli umyté a ošúpané pred ošetrením siričitanom. Hľuzy sa skladovali v rôznych obalových fóliách pri teplote 6 °C

a 23 °C. Pred uskladnením ošetrovaných zemiakov sa izolovali grampozitívne koky, grampozitívne tyčinky (koryneformy a bacily), fluoreskujúce pseudomonády, nefluoreskujúce oxidačné organizmy a *Enterobacter-Hafnia* spp. Po uskladnení boli prevažujúcou mikrobiotou *Enterobacter-Hafnia* spp. a *Erwinia herbicola*. V samostatnej štúdií bola zo surových zemiakov izolovaná pektolytická klostridia, ktorá bola predbežne identifikovaná ako *Clostridium butyricum*.

### **Mikroorganizmy spojené so spracovanými zemiakovými výrobkami: mrazené zemiakové výrobky**

V odvetví mrazených zemiakov sa okrem iného vyrába mnoho druhov výrobkov vrátane hash-brown, mletých valčekov, tvarovaných placiek, hranolčekov (pokrájaných, rovných, kučeravých a iných), steakových hranolčekov, klinčekov, kaše, šľahaných, hrebienkových, dvakrát pečených, plnených pečených, pečených s vrchnou časťou a zemiakových šupiek. Tieto zemiakové výrobky sa spracúvajú do maloobchodných a inštitucionálnych balení. Mikroorganizmy spojené s mrazenými zemiakovými výrobkami môžu pochádzať z viacerých zdrojov počas spracovania, manipulácie a balenia. Je zrejmé, že *E. coli*, iné koliformné baktérie a *S. aureus* sú trvalou súčasťou mikrobioty týchto výrobkov.

V štúdií o mrazených zemiakoch sa analyzovalo 2 544 vzoriek hotových výrobkov a 1 654 vzoriek z liniek, alebo spracovateľských zariadení z 29 závodov na spracovanie zemiakov. Priemerný počet log aeróbných mikroorganizmov (APC) sa pohyboval od 2,00 do 4,30 log KTJ.g<sup>-1</sup> pre mrazené hranolčky, od 2,00 do 5,23 log KTJ.g<sup>-1</sup> pre mrazené mleté zemiakové valce, od 3,56 do 7,78 log KTJ.g<sup>-1</sup> pre mrazené zemiakové placky, od 3,15 do 6,58 log KTJ.g<sup>-1</sup> pre mrazené zemiaky hash-brown od 3,95 do 6,38 log KTJ.g<sup>-1</sup> a pre mrazené plnené pečené zemiaky v závislosti od závodu. Koliformné baktérie boli získané z 22,6 % a 17,1 % z 597 vzoriek mrazených hranolčekov a 403 vzoriek mrazených mletých zemiakových valcov. Počty koliformných baktérií sa pohybovali v rozmedzí od 2,18 do 2,68 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 3,00 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade mrazených zemiakových placiek a mrazených zemiakov v tvare hash-brown. Koliformné baktérie boli tiež získané z 37,5 % z 272 vzoriek mrazených plnených pečených zemiakov. *E. coli* bola získaná zo 4,2 % a 1,5 % z 597 vzoriek mrazených hranolčekov a 403 vzoriek mrazených mletých zemiakových valcov. Počty *E. coli* sa pohybovali v rozmedzí od 1,00 do 1,50 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 1,75 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade mrazených zemiakových placiek a mrazených zemiakov v tvare hash-brown. *E. coli* bola tiež získaná zo 17,3 % z 272 vzoriek mrazených plnených pečených zemiakov. Koagulázo-pozitívne stafylokoky (CPS) boli získané z dvoch vzoriek mrazených hranolčekov a jednej vzorky mrazeného mletého zemiakového valca. CPS boli tiež získané zo 47,8 %, 16,1 % a 25,0 % vzoriek mrazených zemiakových placiek, mrazených zemiakov hash-brown a mrazených plnených pečených zemiakov.

Mikrobiologicky sa analyzovalo celkovo 1 562 vzoriek mrazených zemiakov hash-brown a 1 585 vzoriek mrazených zemiakových hranolčekov. Priemerné logaritmy APC sa pohybovali od 2,00 do 8,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 2,00 do 6,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade zemiakov hash-brown a zemiakových hranolčekov. Počet koliformných baktérií sa pohyboval od 1,00 do 4,98 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 3,98 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade zemiakov na pečenie a zemiakov na vyprážanie. Počet *E. coli* sa pohyboval od 1,00 do 2,18 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 1,62 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade zemiakov



na hamburger a vyprážených zemiakov. Počet *S. aureus* sa pohyboval od 1,00 do 4,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 2,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade zemiakov na hamburger a mrazených vyprážených zemiakov.

### **Mikroorganizmy spojené so sušenými zemiakovými výrobkami**

Zemiaky sa spracúvajú do mnohých dehydrovaných foriem vrátane granúl, vločiek a prášku. Tieto hotové výrobky sa ľahko zmenia na zemiakovú kašu zmiešaním s horúcou, alebo vriacou vodou. Typické kroky spracovania dehydrovaných zemiakov zahŕňajú umývanie, lúpanie, orezávanie, krájanie, varenie, roztláčanie a miešanie, chladenie, miešanie a sušenie, triedenie a konečné sušenie.

Mikroorganizmy, ktoré sú odolné voči teplu a vysušovaniu, by mohli potenciálne prežiť proces dehydratácie a kontaminovať konečný zemiakový výrobok. Z rôznych dehydrovaných zemiakových výrobkov boli izolované a identifikované baktérie a huby tvoriace spóry. Medzi bežné mikroorganizmy izolované z úplne spracovaných výrobkov a výrobkov pripravených na maloobchodný predaj patria *B. cereus*, *E. coli* a iné koliformné baktérie, *S. aureus*, kvasinky a huby.

*Bacillus cereus* je hlavným potravinovým patogénom spojeným s dehydrovanými zemiakovými výrobkami. *B. cereus* bol izolovaný zo 40 % analyzovaných vzoriek sušených zemiakov s počtom od 2,00 do 3,00 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Zemiaková kaša pripravená z dehydrovaného konzervovaného výrobku a dehydrovaných vločiek bola zapletená do dvoch epidémií ochorení prenášaných potravinami v rokoch 1975 až 1978. V prvom prípade sa z pripravenej zemiakovej kaše získalo 7,26 log KTJ.g<sup>-1</sup> *B. cereus*. V druhom ohnisku, ktoré zahŕňalo 450 školákov, sa z pripravenej zemiakovej kaše získalo 6,42 až 7,79 log KTJ.g<sup>-1</sup> *B. cereus*. Tieto ohniská sú podrobnejšie opísané nižšie.

V štúdií 240 vzoriek dehydrovaných zemiakov (granule, plátky, kocky a vločky), odobratých a analyzovaných v rokoch 1958 až 1967, sa priemerné logaritmy APC pohybovali od 2,54 do 5,46 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Okrem toho boli z 30 % vzoriek izolované koliformné baktérie, z 5,0 % *E. coli* a z 1,3 % CPS. V ďalšej štúdií sa priemerné logaritmy APC pohybovali v rozmedzí od 2,00 do 5,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> pre sušené zemiaky na hash-brown a sušené zemiakové pyrė. Počet koliformných baktérií sa pohyboval od 1,00 do 2,66 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 3,04 pre sušené zemiaky hash-brown a sušené zemiakové pyrė. Počet *E. coli* bol 1,00 log KTJ.g<sup>-1</sup> pre všetky výrobky. *S. aureus* sa pohyboval v rozmedzí od 1,00 do 2,69 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 3,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade sušených zemiakov hash-brown a sušených zemiakových kaší.

### **Mikroorganizmy spojené so zemiakovými šalátmi**

Komerčne pripravované lahôdkové šaláty predstavujú veľkú skupinu potravinárskych výrobkov a zahŕňajú zemiakové šaláty. Tieto šaláty sa tepelne ani inak nespracúvajú, aby sa zabezpečila neprítomnosť patogénnych, alebo kazivých mikroorganizmov v konečnom výrobku. Mikrobiota a zachovanie kvality týchto šalátov preto závisí od kvality surovín, hygienických postupov dodržiavaných počas výroby a stupňa rastu mikroorganizmov v konečnom výrobku. Hoci zdrojom mikrobioty v zemiakových šalátoch nemusia byť nevyhnutne zemiaky, zemiakový substrát a iné zložky (napr. vajcia) sú vynikajúcim zdrojom živín pre kontaminujúce baktérie. Dresingy používané pri príprave zemiakových šalátov (napr. majonéza) majú vo všeobecnosti priemerné pH približne 4,0 (3,0 až 4,6) kvôli obsahu kyseliny octovej.

Zmiešaním dresingov so zemiakmi a inými zložkami šalátu sa však kyselina octová zriedi a môže oslabiť svoje inhibičné vlastnosti. Zistilo sa, že pridanie šalátových dresingov, alebo majonézy do šalátov spomalilo rast patogénov, ak sa šaláty uchovávali pri teplote  $\leq 7$  °C.

Podobne ako v prípade iných zemiakových výrobkov sa mikrobiota zemiakového šalátu líši. V piatich samostatných štúdiách sa priemerný počet log APC a koliformných baktérií v 1 539 vzorkách zemiakového šalátu pohyboval od 1,0 do 8,70 log KTJ.g<sup>-1</sup> a od 1,00 do 6,0 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Počet *Escherichia coli* sa pohyboval od 1,00 do 6,0 log KTJ.g<sup>-1</sup> v 1 491 vzorkách zemiakového šalátu z dvoch štúdií. Počet CPS sa pohyboval od 1,00 do 4,90 log KTJ.g<sup>-1</sup> v dvoch štúdiách, zatiaľ čo *S. aureus* sa pohyboval od 1,00 do 3,18 log KTJ.g<sup>-1</sup> v ostatných štúdiách. Kvasinky a huby sa pohybovali v rozmedzí od 1,00 do 2,00 log KTJ.g<sup>-1</sup> v prípade deviatich vzoriek zemiakového šalátu v jednej štúdii. Ukázalo sa, že zemiakové šaláty boli prostriedkom prenosu niekoľkých ohnisk ochorení prenášaných potravinami a sú opísané nižšie.

### **Mikroorganizmy spojené s výrobkami zo zemiakov pripravenými na konzumáciu inými ako zemiakový šalát**

Zemiakové výrobky pripravené na podávanie zahŕňajú širokú škálu výrobkov, ktoré sa podávajú teplé, alebo studené ako prílohy, občerstvenie a hlavné jedlá v reštauráciách, kaviarňach, lahôdkach, na otvorených trhoch a v zemiakových baroch. Mnohé z týchto výrobkov sa pripravujú z dehydrovaných, mrazených, alebo inak spracovaných zemiakových výrobkov. Medzi tieto výrobky patria napríklad zemiaková kaša, zemiakové placky, zemiaky s hráškom (, alebo inou zeleninou), zemiaky v tvare hrebienka, zemiaky na gratinovanie, pečené zemiaky, zemiaky v tvare hash-brown (s mäsom), zemiakové šupky, zemiaky na prípravu v mikrovlnnej rúre a iné výrobky pripravené na podávanie. Medzi mikroorganizmy, ktoré boli identifikované v zemiakových výrobkoch pripravených na podávanie iných ako zemiakový šalát, patria koliformné baktérie, *B. cereus* a *S. aureus*. Medzi zdroje mikroorganizmov v hotových výrobkoch patrí manipulácia s ľuďmi, zariadenia na spracovanie a podávanie, krížová kontaminácia z iných potravín a endogénna mikrobiota zemiakov. V jednej štúdii izolovali *B. cereus* z každej z 10 vzoriek zemiakovej kaše pripravenej na podávanie zakúpenej v bufetoch vo Washingtone, D.C. Po 20-hodinovom skladovaní vzoriek z kaviarní pri teplote 26 °C sa počet *B. cereus* pohyboval v rozmedzí od 6,40 do 7,49 log KTJ.g<sup>-1</sup>. V inej štúdii sa zistilo, že zeleninové obložené chlebičky pripravené na konzumáciu obsahujúce zemiaky a hrášok sú kontaminované kmeňmi *S. aureus* schopnými produkovať enterotoxíny. V ďalšej štúdii boli izolované koliformné baktérie, *B. cereus* a *S. aureus* z rôznych zemiakových výrobkov ponúkaných na predaj pouličnými predajcami v Pakistane. Predpokladalo sa, že zdrojom kontaminácie je manipulácia s ľuďmi.

## **6.2 Výskyt ochorení prenášaných potravinami v súvislosti so zemiakmi a výrobkami zo zemiakov**

Ohniská alimentárnych chorôb postihujúcich zemiaky a zemiakové výrobky sú uvedené v tabuľke 6.1. V rokoch 1967 až 1993 sa vyskytlo viac ako 60 ohnisk ochorení z potravín súvisiacich so zemiakmi a výrobkami zo zemiakov, ktoré zahŕňali viac ako 6 500 prípadov. Zemiakový šalát bol spojený s 90 % ohnisk nákazy. Zemiaková kaša

(pripravená z celých zemiakov, alebo dehydrovaných výrobkov) bola v piatich prípadoch príčinou prenosu. Medzi ďalšie zemiakové výrobky a jedlá, ktoré sa vyskytli v ohniskách ochorení prenášaných potravinami, patrili zemiaky s hráškom, zemiaky s omáčkou, surové zemiaky a zemiakový dip z pečených zemiakov. Patogény, ktorých sa tieto ohniská týkali, a známy počet prípadov spojených s každým z nich sú tieto: *Salmonella* (3 997 prípadov, 58,0 %), *Shigella* (1 447 prípadov, 21,0 %), *S. aureus* (590 prípadov, 8,6 %), *B. cereus* (502 prípadov, 7,3 %); *Streptococcus* (251 prípadov, 3,6 %), *C. botulinum* (79 prípadov, 1,1 %) a *E. coli* O157:H7 (24 prípadov, 0,3 %).

Väčšina prípadov výskytu *B. cereus* súvisí s konzumáciou kontaminovanej zemiakovej kaše vyrobenej z dehydrovaných produktov a uchovávanéj pri nesprávnych teplotách. Bolo oznámené, že *B. cereus* bol inkriminovaný pri vypuknutí otravy potravinami v Holandsku, pričom zemiaková kaša bola jednou z potravín, ktoré boli do týchto vypuknutí zapojené. Prvé vypuknutie ochorenia z potravín spôsobeného *B. cereus* v súvislosti so zemiakmi v Spojených štátoch bolo hlásené vo Wisconsine. K vypuknutiu tejto epidémie došlo po konzumácii zemiakovej kaše, ktorá bola kontaminovaná *B. cereus*. Zemiaková kaša bola pripravená z dehydrovaného konzervovaného výrobku, ale zdroj kontaminácie nebol identifikovaný. V roku 1977 bolo 49 prípadov ochorenia z potravín a jedno úmrtie pripísané kontaminácii *B. cereus* z dehydrovanej zemiakovej zmesi. Komunitná sociálna služba pripravila a distribuovala rekonštituovanú zemiakovú kašu ako súčasť večere. Vypuknutie nákazy sa pripisovalo nesprávnemu času a teplote skladovania počas dodávania jedál starším príjemcom. V roku 1978 vypuklo v Južnej Dakote rozsiahle ohnisko ochorenia spôsobeného *B. cereus* z potravín, ktoré sa pripisuje zemiakovej kaši pripravenej z dehydrovaných vločiek. V tomto ohnisku sa gastrointestinálne ochorenie vyskytlo u 450 osôb. Ako najpravdepodobnejšia príčina vypuknutia nákazy bola uvedená nesprávna teplota skladovania kontaminovaných pripravených zemiakov.

**Tabuľka 6.1.** Výskyt ochorení prenášaných potravinami v súvislosti s výrobkami zo zemiakov

Produkt	Lokalita	Miesto podávané	Patogén
Zemiaková kaša	Holandsko	NŠ	<i>Bacillus cereus</i>
Zemiakový šalát	Colorado	Hostinec	<i>Clostridium botulinum</i> type A
Zemiakový šalát	Wisconsin	Doma	<i>Staphylococcus aureus</i> SEB
Zemiakový šalát	Kalifornia	Doma	<i>Salmonella</i> Thomson
Zemiakový šalát	Tennessee	Kaviareň	<i>Staphylococcus aureus</i>
Zemiakový šalát	Arizona	Piknik	<i>Streptococcus</i> (Gp. A, b-hemolytický)
Zemiakovo hráškový šalát	Oregon	Doma	<i>Clostridium botulinum</i> type A
Zemiakový šalát	Arizona	Reštaurácia	<i>Salmonella</i> Newport
Zemiakový šalát	Iowa	Doma	<i>Shigella sonnei</i>
Zemiakový šalát	Colorado	Piknik	<i>S. aureus</i> (WH-1)
Zemiakový šalát	S. Karolína	Doma	<i>S. aureus</i>
Zemiaková kaša	Wisconsin	Doma	<i>B. cereus</i>
Zemiakový šalát	Minnesota	Piknik	<i>Salmonella</i> Blockley
Zemiakový šalát	Texas	Piknik	<i>Shigella flexneri</i> (2B)

Zemiaková kaša	Alaska	Vojenská základňa	<i>S. aureus</i> SEA
Zemiakový šalát	Missouri	Škola	<i>S. aureus</i> (83A)
Zemiakový šalát	Pennsylvánia	Reštaurácia	<i>Salmonella</i> Typhimurium <i>Salmonella</i> Saint-Paul
Zemiakový šalát	Washington	Piknik	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Zemiakový šalát	Pennsylvánia	Piknik	<i>S. aureus</i>
Zemiaková kaša	Anglicko	Rýchle občerstvenie	<i>B. cereus</i>
Zemiakový šalát	Havaj	Škola	<i>S. sonei</i>
Zemiakový šalát	Nové Mexiko	Svadba	<i>S. aureus</i> SEA
Dehydrované vločky	South Dakota	Škola	<i>B. cereus</i>
Zemiakový šalát	Wisconsin	Piknik	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Zemiaky a omáčka	Wisconsin	Škola	<i>Salmonella</i> Reading
Zemiakový šalát	Illinois	Banketová sála	<i>S. sonei</i>
Zemiakový šalát	Oklahoma	Škola	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	Pennsylvánia	Kostol	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	Ohio	Doma	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	Texas	Reštaurácia	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	Iowa	Doma	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Zemiakový šalát	Arkansas	Camp	<i>S. sonnei</i>
Zemiakový šalát	Massachusetts	Piknik	<i>S. flexneri</i>
Zemiakový šalát	Minnesota	NŠ	<i>S. flexneri</i>
Zemiakový šalát	Pennsylvánia	NŠ	<i>S. sonnei</i>
Zemiakový šalát	Massachusetts	NŠ	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	New York	Kaviareň	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	West Virgínia	NŠ	<i>S. aureus</i>
Zemiakový šalát	Colorado	NŠ	<i>S. flexneri</i> (Group D)
Zemiakový šalát	Colorado	Reštaurácia	<i>Clostridium botulinum</i> type A
Zemiakový šalát	Virgínia	Škola	<i>S. sonnei</i>
Surové zemiaky	Anglicko	Doma	<i>E. coli</i> O157:H7
Zemiakový šalát	Karibik	Výletná loď	<i>S. flexneri</i>
Zemiakový šalát	Colorado	Doma	<i>C. botulinum</i>
Zemiakový dip	Texas	Reštaurácia	<i>C. botulinum</i>
Zemiakový šalát	US	NH	<i>C. botulinum</i>
Zemiakový šalát	US	NH	<i>Salmonella</i>
Zemiakový šalát	US	NH	<i>Shigella</i>
Zemiakový šalát	US	NH	<i>S. aureus</i>
Zemiakový dip	US	NH	<i>C. botulinum</i>

NŠ – nešpecifikované; NH – nehlásené

V roku 1969 bolo v Colorade hlásených šesť prípadov otravy jedlom *C. botulinum* typu A, v ktorých bol zdrojom potravy zemiakový šalát. Príznaky súvisiace s touto epidémiou sa pohybovali od miernych (únava, závraty, rozmazané videnie) až po ťažké ochrnutie, ktoré si vyžadovalo 3 až 16 mesiacov na zotavenie. Podrobnosti o manipulácii s potravinami a ich príprave v súvislosti s týmto ohniskom neboli hlásené. V roku 1978 bolo opäť v Colorade hlásených osem prípadov intoxikácie *C. botulinum* typ A, v ktorých bol opäť zapletený zemiakový šalát. Surové, neumyté, celé zemiaky

boli zabalené do hliníkovej fólie a pečené pri 260 °C počas 45 minút. Po upečení sa zemiaky zabalené do fólie skladovali až 5 dní pri izbovej teplote, kým sa použili na prípravu zemiakového šalátu, ktorý sa vyskytol v ohnisku nákazy. Toxín *C. botulinum* zistený v zemiakových šalátoch v týchto troch prípadoch sa pravdepodobne vytvoril počas skladovania pečených zemiakov zabalených vo fólii, ktoré sa použili na prípravu zemiakových šalátov. Veľmi podobná epidémia sa vyskytla v Denveri v štáte Colorado v roku 1992. V tomto ohnisku nákazy bol botulizmus diagnostikovaný u dvoch osôb a toxín bol izolovaný zo zemiakového šalátu a grilovaných rebier. Dospelo sa k záveru, že zdrojom toxínu bol zemiakový šalát pravdepodobne v dôsledku zneužitia teploty a že rebierka boli kontaminované v dôsledku krížovej kontaminácie. V Texase v roku 1994 sa do vypuknutia botulizmu, ktorý zahŕňal 30 prípadov, zapojil dip pripravený v reštaurácii z pečených zemiakov.

V roku 1985 bolo vo východnom Anglicku v Spojenom kráľovstve *E. coli* O157:H7 pripísaných 24 prípadov ochorenia z potravín a jedno úmrtie. Za spôsob a prostriedok prenosu sa považovala manipulácia so surovými zemiakmi, ktoré sa vyrábali na miestnej úrovni, a ich príprava. Hoci *E. coli* O157:H7 nebola izolovaná zo zemiakov počas tejto epidémie, epidemiologické dôkazy poukazujú na to, že surové zemiaky boli kontaminované nekompostovaným hnojom.

### 6.3 Štúdie mikrobiologických problémov spojené s konzumáciou zemiakov a výrobkov zo zemiakov

Štúdie mikrobiálneho napadnutia zemiakov a výrobkov zo zemiakov v aeróbných podmienkach sa preukázala produkcia stafylokokového enterotoxínu v zemiakovom ceste pri teplote 37 °C počas 48 hodín. Zemiakové cestá boli pred inokuláciou pripravené s rôznym množstvom glycerolu na úpravu aktivity vody ( $a_w$ ) od 0,88 do 0,97. V zemiakovom ceste sa pri  $a_w$  0,93 až 0,97 vytvorilo malé množstvo (5 až 10 mg.50 g<sup>-1</sup>) enterotoxínu A (*S. aureus* 196E). V zemiakovom ceste upravenom na  $a_w$  0,88 nebol zistený žiadny enterotoxín A. Produkcia enterotoxínu B (*S. aureus* C-243) sa pozorovala len pri  $a_w$  0,97. Dospelo sa k záveru, že toxíny by sa mohli produkovať v zemiakovom ceste pri vyšších  $a_w$  a zníženie  $a_w$  by mohlo potlačiť rast baktérií a zabrániť produkcii toxínov.

V reakcii na dve ohniská ochorenia spôsobeného *B. cereus*, ktoré sa vyskytli v súvislosti s inštitucionálnymi a maloobchodnými pripravenými zemiakovými kašami, sa skúmali teploty uchovávaní inokulovaných šľahaných zemiakov. Po držaní šľahaných zemiakov s *B. cereus* ( $\geq 40$  KTJ.20,3 cm<sup>-2</sup>) vo vyhrievanej jednotke na prípravu jedál pri teplote 52 °C počas 1 hodiny sa počet *B. cereus* nezvýšil ani neznížil. V reakcii na vypuknutie epidémie *C. botulinum* typu A v roku 1978 sa zisťovalo, ako mohol botulotoxín vzniknúť v pečených zemiakoch zabalených vo fólii, ktoré sa uchovávali v aeróbných podmienkach. Spóry *C. botulinum* typu A (4,0 log) boli inokulované na povrch zemiakov, ktoré boli potom zabalené do fólie a pečené v bežnej rúre pri 260 °C počas 45 minút. Po upečení sa fólia zo zemiakov neodstránila. Zemiaky sa potom cez noc ochladili v rúre. Zo všetkých inokulovaných zemiakov sa po upečení získali životaschopné spóry *C. botulinum*.

Skúmala sa tvorba botulotoxínu v pečených zemiakoch zabalených vo fólii. Spóry *C. botulinum* typ A kmeň 62 (1,00 až 5,00 log) boli povrchovo, alebo bodovo

inokulované na zemiaky, ktoré boli zabalené do fólie a pečené pri teplote 204 °C počas 50 min a 96 °C počas 3 h. Zemiaky boli potom držané pri teplote 22, alebo 30 °C a každých 24 h sa z nich odoberali vzorky na prítomnosť botulotoxínu. Pri 22 °C, alebo 30 °C bol čas do prvej detekcie toxínu 3 až 4 dni, resp. 3 až 5 dní s 3 až 5 log spór. Pri 1 až 2 log spór sa čas predĺžil na 5 až 7 dní. Pečenie zemiakov pri teplote 96 °C, alebo 204 °C nemalo významný vplyv na čas do zistenia toxínu. Celkový toxín vyprodukovaný v jednotlivých zemiakoch sa pohyboval od 3,7 do 5,7 log LD50 pre myši. Autori dospeli k záveru, že držanie pečených zemiakov zabalených vo fólii pri izbovej teplote je nebezpečná prax a že tento výrobok si vyžaduje chladenie.

Skúmala sa možnosť tvorby botulotoxínu v zemiakovom šaláte. Ošúpané a uvarené zemiaky (pH 6,2) a pripravený zemiakový šalát (pH 5,2) boli inokulované 5,00 log spór *C. botulinum* typ A.g<sup>-1</sup> a držané v anaeróbnej komore pri teplote približne 22 °C. Botulotoxín typu A sa zistil po 24 h na varených zemiakoch, ale nie v inokulovanom zemiakovom šaláte počas 9-dňovej inkubácie. Dospelo sa k záveru, že botulotoxín sa môže tvoriť v pečených zemiakoch zabalených vo fólii, ktoré sa uchovávali pri teplote približne 22 °C, ale nie v zemiakovom šaláte pripravenom zo zemiakov.

Bola zaznamenaná produkcia stafylokokového enterotoxínu C<sub>2</sub> v niekoľkých šalátoch vrátane zemiakového šalátu pripravených pri rôznych úrovniach pH. Pripravili sa tri rôzne zemiakové šaláty (veľké kúsky zemiakov bez vajec, malé kúsky zemiakov bez vajec a veľké kúsky zemiakov s vajcami). Použili sa štyri rôzne úpravy dresingu vrátane kontrolnej (bez dresingu, pH 6,2 až 6,5), na báze vody (pH 5,8 až 6,8), na báze octu (pH 4,7 až 4,8). Zemiakové šaláty boli inokulované 5,00 log KTJ.g<sup>-1</sup> *S. aureus* 361 a inkubované pri 37 °C počas 8 a 24 h. Toxín sa vytvoril vo všetkých 12 vzorkách zemiakových šalátov po 8 h a po 24 h. Hladiny stafylokokového enterotoxínu C<sub>2</sub> po 8 h boli (na 100 g šalátu) 15 až 16 mg, 15 až 16 mg, 3 až 5 mg a 3 až 8 mg v prípade kontrolnej, vodnej, octovej a komerčnej úpravy. Po 24 hodinách boli hladiny toxínov (na 100 g) 13 až 14 mg, 15 až 17 mg, 8 až 13 mg a 4 až 14 mg. Dospelo sa k záveru, že ak sa *S. aureus* nechá rásť v zemiakových šalátoch, môže sa vytvoriť enterotoxín C<sub>2</sub> a že všetky šaláty typu entree sa musia uchovávať v chlade, ak sa neskonzumujú do 2 až 3 hodín..

V roku 1996 americký Úrad pre potraviny a liečivá (FDA) odporučil, aby sa čiastočne uvarené (blanširované) zemiaky určené na prípravu čerstvých hranolčiek považovali za potenciálne nebezpečné, ak sa skladujú pri nechladených teplotách, a to aj v prípade, že sa majú vyprážať. V odlišnej štúdii sa stanovili rastové a inaktivačné charakteristiky spór *B. cereus* a buniek *S. aureus* a enterotoxínu na vopred ošúpaných, čerstvo nakrájaných, v oleji blanširovaných hranolčkoch skladovaných pri 21 a 26,7 °C počas rôznych období a následne podrobených vypráženiu v oleji. Zemiaky boli inokulované na sledovanie rastu oboch mikroorganizmov a produkcie stafylokokového enterotoxínu počas 9 h. Oba mikroorganizmy boli schopné rásť pri 26,7 °C, ale nie pri 21 °C. *S. aureus* enterotoxín A sa produkoval na blanširovaných hranolčkoch po 5 h skladovania pri 26,7 °C, ale pri 21 °C sa nezistil. *S. aureus* sa zničil pri konečnom vyprážení, avšak enterotoxín A bol sérologicky zistiteľný na hotových hranolčkoch. V záverečnej fáze vyprážania sa dosiahlo zníženie počtu spór *B. cereus* o 4,0 až 5,0 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Dospelo sa k záveru, že v oleji blanširované zemiakové hranolky skladované pri teplote 26,7 °C by sa mali

do 3 až 4 hodín po blanšírovaní dofrítovať a podávať, alebo zlikvidovať, alebo že by sa zemiakové hranolky mali skladovať pri teplote 21 °C, alebo nižšej.

#### **6.4 Mikrobiologické štúdie zemiakov a výrobkov zo zemiakov balených v modifikovanej atmosfére, alebo vo vákuu**

Väčšina výskumov týkajúcich sa zemiakov a výrobkov zo zemiakov balených v modifikovanej atmosfére (MAP), alebo vo vákuu (sous-vide) sa týka skupiny výrobkov známej ako minimálne spracované chladené potraviny (MPR). Zelenina MPR si počas skladovania zachováva vlastnosti čerstvosti. Táto zelenina sa skladuje a uvádza na trh v chladiacich podmienkach v kombinácii s inými úpravami, ako je MAP, alebo vákuové balenie, aby sa predĺžila jej trvanlivosť. Konzervácia zemiakových výrobkov MPR a MAP môže zahŕňať aj kontrolu pH, varenie a bielenie, antimikrobiálne látky, ožarovanie, konzerváciu oxidáciou/redukciou, zníženie vlhkosti, alebo kombináciu týchto, alebo iných úprav. Medzi príklady zemiakových výrobkov MPR patria čerstvé zemiaky bez šupky, surové zemiaky nakrájané na kocky, surové hranolčeky, varené, alebo čiastočne varené zemiaky, zemiaky na hash-brown a zemiaková kaša. V jednej z prvých štúdií sa preukázalo, že etylénoxid nie je tak účinný ako SO<sub>2</sub> ako antimikrobiálny prostriedok proti *C. botulinum*, *E. coli* ATCC 11229 a *S. aureus* ATCC 6538 na surových zemiakových šupkách. Surové zemiaky boli nakrájané na plátky a nakrájané na 1 g valcovité zátky v približne 100 % atmosfére N<sub>2</sub>, umiestnené do sklenených fliaš a naočkované približne 5,00 log KTJ.g<sup>-1</sup> každého mikroorganizmu. Zemiaky sa potom na 10 minút evakovali (pri 762 mm Hg) pred vystavením rôznym koncentráciám SO<sub>2</sub>, CO, alebo etylénoxidu (10 % etylénoxidu, 90 % CO<sub>2</sub>) na rôzne časy až do 30 minút a potom sa znovu evakovali na 15 minút. Vzorky sa potom pred odberom mikrobiologických vzoriek preplachovali sterilným vzduchom počas 10 min. Krivky prežitia ukázali, že 50, alebo 100 % SO<sub>2</sub> zničilo *C. botulinum*, *E. coli* a *S. aureus* po 5 min expozície. Etylénoxid zničil *E. coli*, *C. botulinum* a *S. aureus* po cca. 10, 15 a 30 min. Pôsobením CO sa neznížili hladiny inokula týchto troch mikroorganizmov.

V reakcii na rastúcu popularitu varených, alebo čiastočne varených zemiakov vo vákuovom balení v Holandsku a Dánsku sa uskutočnila štúdia inokulovaných balení. Kmene *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* a *C. botulinum* (typy A, B a E) boli inokulované na zemiaky varené v pare, alebo čiastočne varené pred vákuovým balením. Naočkované zemiaky sa skladovali pri teplotách 5, 14 a 22 °C v polypropylénových/nylonových laminátových vreckách. Rast *B. cereus* nakoniec po 17 dňoch pri 22 °C napučal neinokulované kontrolné vrecká. Pri 14 °C dosiahla populácia *B. cereus* 5,0 log KTJ.g<sup>-1</sup>, zatiaľ čo pri 5 °C bol rast inhibovaný najmenej 21 dní. *Erwinia herbicola* a neidentifikované kvasinky sa tiež vyvíjali v neočkovaných vreckách. *Salmonella typhimurium* aj *S. aureus* pri teplotách 14 a 22 °C vykazovali exponenciálny rast, zatiaľ čo rast mikroorganizmov bol potlačený vo vreckách držaných pri 5 °C. *C. botulinum* typ B bol schopný produkovať detekovateľný toxín po 5 dňoch pri 14 °C na inokulovaných vákuovo balených zemiakoch. Toxíny *C. botulinum* typu A a B sa na zemiakoch produkovali po 10 dňoch skladovania pri 22 °C. Produkcia toxínu nebola zistená vo vreckách skladovaných pri 5 °C po 15 dňoch skladovania.

Pri vývoji procesu výmeny plynov pre surové zemiakové plátky na hranolčky sa skúmala účinnosť vystavenia SO<sub>2</sub> v kombinácii s preplachovaním CO<sub>2</sub> a skladovaním pri teplote 4, alebo 21 °C. Celé zemiaky boli najprv vystavené pôsobeniu 100 % SO<sub>2</sub> počas 5 minút, evakuované počas 5 minút a prepláchnuté 100 % CO<sub>2</sub> počas 10 minút. Potom sa zemiaky ošúpali v pare, nakrájali na pásiky na hranolky, 5 minút evakovali, 15 sekúnd preplachovali 100 % CO<sub>2</sub>, uzavreli do komerčnej plastovej fólie a 45 dní skladovali pri teplote 4, alebo 21 °C. Počet aeróbných a anaeróbných baktérií sa pohyboval od 0 do 80 KTJ.g<sup>-1</sup> a od 0 do 10 KTJ.g<sup>-1</sup> pre hranolky zemiakov skladované pri 4 °C a 21 °C. Títo výskumníci skúmali aj účinky vystavenia CO namiesto CO<sub>2</sub> v záverečnej plynovej fáze procesu. Pri 120-dňovom skladovaní vzoriek ošetrených CO pri izbovej teplote sa zistili nižšie počty aeróbných a anaeróbných mikroorganizmov (počty sa neuvádzajú) ako pri vzorkách ošetrených CO<sub>2</sub>.

Zisťovala sa tepelná odolnosť *L. monocytogenes* a *Yersinia enterocolitica* na vákuovo balených zemiakových plátkoch. Zaujímavé je, že pozorovali, že ošetrovanie inokulovaných plátkov zemiakov metabisulfitom sodným do 800 ‰ nemalo žiadny vplyv na výťažnosť oboch mikroorganizmov. V prípade *L. monocytogenes* boli hodnoty D 30,6 min, 3,3 min a 0,5 min pri 50, 55 a 60 °C. Hodnoty D pre *Y. enterocolitica* boli 17,9 min a 0,95 min pri 50 a 55 °C. Zistili subpopulácie mikroorganizmov odolné voči teplu, ktoré pripisujú prítomnosti ochranného sacharidu. Komerčne vyrábané, vákuovo balené varené zemiaky sú produktom, o ktorý je v európskych krajinách a Spojených štátoch čoraz väčší záujem. Uvádza sa, že tieto výrobky majú trvanlivosť približne 6 týždňov v chladničke a konzumujú sa buď po tepelnej úprave, alebo bez tepelnej úpravy v šalátoch. *C. botulinum* typov A, B a E sa naočkovalo na varené zemiaky, ktoré sa tepelne upravili a zatvorili do polyesterových/fóliových/polyetylénových vrecúšok a skladovali pri teplotách 4, 10, 15 a 20 °C. Pri skladovaní pri 20 °C sa na zemiakoch zistili botulotoxíny typu A a B po 4 dňoch a pri 15 °C po 8 dňoch. Toxín typu E sa zistil na zemiakoch skladovaných pri 10 °C po 9 dňoch. Skladovanie vákuovo balených zemiakov pri 4 °C zabránilo produkcii botulotoxínu všetkými tromi kmeňmi.

V inej štúdií sa skúmali účinky pridania acidulantov do zemiakov na inhibíciu produkcie toxínu kmeňom *C. botulinum* typu A okra. Surové predošúpané zemiaky sa ponorili na 2 minúty do jednej z piatich úprav: i) neošetrená kontrola; ii) 2 % kyselina askorbová + 1 % kyselina citrónová; iii) 5 % sorban draselný a následne 2 % kyselina askorbová; iv) 2 % kyselina askorbová; a v) 2 % kyselina askorbová + 0,1 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Po namočení sa zemiaky zabalili do polyamidových/polyetylénových vreciek, odvzdušnili a zahrievali pri 95 °C počas 50 minút. Vrecká sa ochladili a skladovali pri teplotách 15, 20 a 25 °C. Neošetrené vákuovo balené zemiaky pri všetkých troch teplotách vykazovali produkciu plynu. Ošetrenia ii) a iii) oneskorili produkciu plynu pri všetkých troch teplotách v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Pri teplote 15 °C ošetrenia (ii) a (iii) zabránili rastu a tvorbe toxínov, ale nie pri teplotách 20 a 25 °C. Z tejto štúdie vyplynulo, že varenie a kombinované ošetrovanie kyselinou askorbovou a kyselinou citrónovou predĺžilo trvanlivosť varených zemiakov pri nízkych teplotách (≤ 4 °C).

Skúmal sa rast a produkcia toxínu *C. botulinum* pri 25 °C v surových zemiakoch nakrájaných na kocky, ktoré boli ošetrené 0, 10, alebo 100 % SO<sub>2</sub> počas 30 minút. Po ošetrení SO<sub>2</sub> sa balené zemiaky evakovali a atmosféra sa nahradila 100 % CO, 100 % CO<sub>2</sub>, alebo zmesou 5 % CO, 25 % CO<sub>2</sub> a 70 % vzduchu. Ošetrovanie 100 % SO<sub>2</sub>



znížilo pH nakrájaných zemiakov pod 4,6 a inhibovalo rast *C. botulinum* vo všetkých atmosférach. Toxín sa vytvoril vo vzorkách zemiakov ošetrovaných 10 % SO<sub>2</sub> v kombinácii so 100 % CO, alebo CO<sub>2</sub> po 7 dňoch. Toxín sa vytvoril aj vo všetkých kombináciách ošetrovania 0 % SO<sub>2</sub> do 7 až 14 dní. Zistilo sa, že aj po zistení prerastania *C. botulinum* a tvorby toxínu si zemiaky zachovali čerstvý vzhľad a vôňu.

V inej štúdii sa skúmal rast a produkcia toxínu kmeňmi *C. botulinum* typov A, B a E na vákuovo balených, vopred olúpaných, ľahko uvarených zemiakoch určených na dlhodobé skladovanie pri teplote okolia. Štúdia bola vykonaná v reakcii na anglickú patentovú prihlášku založenú na procese dvojitej pasterizácie. V štúdii sa výrobok zahrieval pri teplote 75 až 85 °C počas 5 až 15 minút, vákuovo sa zabalil, inkuboval sa pri teplote 25 a 35 °C počas 14 až 24 hodín, aby sa umožnilo klíčenie bakteriálnych spór, a opätovne sa zahrieval pri teplote 85 až 90 °C počas 25 až 32 minút. Ukázalo sa, že *C. botulinum* prežil tento proces a produkoval toxín pri 25 °C. V dvoch vzorkách neinokulovaných zemiakov sa tiež vytvoril botulotoxín. Dospelo sa k záveru, že vákuovo balené zemiaky určené na skladovanie pri teplote okolia by sa mali tepelne spracovať ekvivalentným tepelným procesom 12D (F=5 3 min), alebo skladovať pri teplote nižšej ako 4 °C.

Skúmal sa kombinovaný vplyv  $a_w$  a pH na tvorbu botulotoxínu vo vákuovo balenej zemiakovej kaši. Uvarené zemiaky sa roztlačili a pridala sa NaCl a kyselina askorbová, aby sa upravili  $a_w$  a pH na 0,955 až 0,970 a 4,75 až 5,75. Zemiaky boli inokulované piatimi kmeňmi *C. botulinum* typu A (A6, 17A, 62A, 317121A, CK2-A) a proteolytického typu B (MRB, 1B1, 13983-IIIB, 368B, 426B). Pri 25 °C sa toxín vytváral pri pH  $\geq$  4,77 a  $a_w \geq$  0,970, pH  $\geq$  5,25 a  $a_w \geq$  0,965 a pH  $\geq$  5,75 a  $a_w \geq$  0,960. Pri  $a_w$  0,955 sa nevytvoril žiadny toxín. Ukázalo sa, že produkciu toxínu na zemiakovej kaši ovplyvňuje čas skladovania pri 25 °C,  $a_w$ , pH a vzájomné pôsobenie týchto faktorov.

V štúdii neinokulovaného balenia sa pred balením do polyetylénu s nízkou hustotou za okolitého tlaku, alebo kompozitného materiálu EVA-SARAN-EVA (Super Cryovac) vo vákuu ponorili surové zemiakové hranolky veľkosti hranolčekov do vodného roztoku NaSO<sub>2</sub>. Vzorky sa skladovali pri teplotách 4, 7 a 10 °C. Bakteriálna biota identifikovaná na zemiakoch pred uskladnením zahŕňala *Pseudomonas* spp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Hafnia alvei*, *B. cereus* a *S. aureus*. Po uskladnení v nevákuových podmienkach boli izolované *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens* a pektolytické *Pseudomonas* spp. Po skladovaní vo vákuu s SO<sub>2</sub> a bez SO<sub>2</sub> prevládali Enterobacteriaceae, pričom boli izolované aj *Pseudomonas* spp. a *Lactobacillus* spp. Pektolytické a sulfit redukujúce klostrídie neboli izolované zo žiadnej vzorky. Autori dospeli k záveru, že kombinácia ošetrovania SO<sub>2</sub>, vákuového balenia a skladovania v chlade inhibovala mikrobiálny rast a predĺžila lag fázu mikroorganizmov.

Ukázalo sa, že NaHSO<sub>3</sub> neinhibuje rast a produkciu toxínov spór *C. botulinum* typu A a B inokulovaných na olúpané, na plátky nakrájané surové zemiaky vo vákuu pri 22 °C. V ďalšej štúdii sa preukázalo, že kombinácia ošetrovania NaHSO<sub>3</sub> a MAP predĺžila trvanlivosť (senzorickú prijateľnosť) olúpaných plátok surových zemiakov, ale nezabránila rastu a tvorbe toxínov *C. botulinum*. Spóry *C. botulinum* typu A a B boli povrchovo inokulované na zemiaky v množstve 3,38 až 3,88 log spór.g<sup>-1</sup> a 3,60 až 4,08 log spór.g<sup>-1</sup>. Zemiaky sa umiestnili do MAP pozostávajúceho z 30 % N<sub>2</sub> a 70 % CO<sub>2</sub> vo vreciach prepúšťajúcich kyslík a skladovali sa pri teplote 22 °C. Toxíny *C. botulinum* typu A a B sa na zemiakoch vytvorili po 4 dňoch v 21 % vzoriek a po 5 dňoch v 6 %

analyzovaných vzoriek. Na konci štúdie 7-dňového skladovania sa toxín *C. botulinum* typu A a B vytvoril v 100 %, resp. 36 % testovaných vzoriek zemiakov. Dospelo sa k záveru, že ošetrovanie síce zachovalo senzoryckú prijateľnosť plátkov surových zemiakov, ale nezabránilo prerastaniu, alebo tvorbe toxínov *C. botulinum* typu A a B.

### Vplyv alternatívnych siričitanov na mikrobiológiu zemiakov

V roku 1987 FDA navrhla zrušiť štatút všeobecne považovaného za bezpečný pre používanie sulfitačných činidiel na čerstvé zemiaky. Tento návrh bol reakciou na obavy, že viac ako 1 milión ľudí v Spojených štátoch je citlivých na siričitany. Používanie siričitanov na predlúpané zemiaky je v Spojených štátoch naďalej povolené a tieto zlúčeniny sa vo veľkej miere používajú v odvetví sušených zemiakov. Možnosť budúcich regulačných opatrení týkajúcich sa siričitanov a zníženie akceptácie výrobkov ošetrovaných siričitanmi zo strany spotrebiteľov viedli k potrebe alternatívnych látok proti zhnednutiu. Od návrhu FDA bolo vyvinutých a testovaných niekoľko alternatív proti zhnednutiu na výrobkoch z predlúpaných zemiakov.

V ďalšej štúdií sa analyzoval účinok kyseliny citrónovej a kyseliny askorbovej (samostatne, alebo v kombinácii) v porovnaní s  $\text{Na}_2\text{SO}_2$  na mikrobiálny rast v zemiakovom homogenáte počas skladovania pri 4 °C. Pripravený zemiakový homogenát sa pred balením do skúmaviek a zabalením do fólie EVA-SARAN-EVA zmiešal s konzervačnými látkami. Počas štúdie mikrobiálnu flóru tvorili najmä Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., psychotrofné mikroorganizmy, huby a kvasinky. Prevládali kvasinky rodu *Rhodotorula*, zatiaľ čo typickými hubami boli *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* a *Penicillium*. Nízke koncentrácie (100 ‰)  $\text{Na}_2\text{SO}_2$  nemali inhibičný účinok na rast mikroorganizmov, zatiaľ čo kyselina citrónová (3 500 ‰) a kyselina askorbová (10 000 ‰) vykazovali antimikrobiálny účinok. Títo autori dospeli k záveru, že hoci 100 ‰  $\text{Na}_2\text{SO}_2$  nemalo inhibičný účinok, kyseliny citrónová a askorbová boli dobrými antimikrobiálnymi látkami samostatne, alebo v kombinácii v systéme zemiakového homogenátu.

V inej štúdií sa skúmal vplyv roztokov proti zhnednutiu a chlóru a balenia v modifikovanej atmosfére na mikrobiológiu čerstvých zemiakov. Lúpané zemiaky nakrájané na hranolčeky boli ošetrované jedným zo štyroch spôsobov: i) ponorením do 0,5 % L-cysteínu + 2 % kyseliny citrónovej na 3 min, po ktorom nasledoval dusíkový výplach a skladovanie pri 2 °C; ii) 0,5 % L-cysteín + 2 % kyselina citrónová na 3 min a skladovanie pri 2 °C; iii) ponorením do 0,5 % L-cysteínu + 2 % kyselina citrónová na 3 min a skladovanie pri 2 °C; iv) ponorením do 0,5 % L-cysteínu + 2 % kyselina citrónová + 100 ‰ chlórnanu počas 3 minút, po ktorých nasleduje dusíkový výplach a skladovanie pri 2 °C; a iv) ponorenie do 0,5 % L-cysteínu + 2 % kyseliny citrónovej + 300 ‰ chlórnanu počas 3 minút, po ktorých nasleduje dusíkový výplach a skladovanie pri 2 °C. Počty na všetkých ošetrovaných vzorkách zemiakov zostali počas prvého dvojtýždňového obdobia skladovania pri 28 °C v oneskorenej fáze. Počty na ošetrovaniach iii) a iv) sa po 15 dňoch zvýšili zo  $10^2$  na približne  $10^6$  a  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup> zemiakov. Medzi izolované a identifikované mikroorganizmy patrili *P. fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas maltophilia*, *Vibrio fluvialis* a *Achromobacter*. Ošetrenia i) a ii) vykazovali minimálny nárast celkového počtu mikroorganizmov v porovnaní s ošetreniami iii) a iv) počas 21-dňového obdobia skladovania.

Analyzoval sa rast *L. monocytogenes* na čerstvo ošúpaných zemiakoch ošetrených siričitanom, alebo bežnou alternatívou siričitanu, balených vo vákuu a skladovaných pri teplotách 4, 15 a 28 °C. Zemiaky zbavené šupky boli rozdelené do štyroch skupín: i) ponorené do 1,2 % roztoku Na<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> na 2 min; ii) ponorené do 2 % komerčného inhibítora hnednutia (CBI) na 5 min; iii) ponorené do 2 % CBI na 5 min, po ktorom nasledovalo opláchnutie vodovodnou vodou; a iv) neošetrená kontrola. CBI pozostával z kyseliny citrónovej, kyseliny askorbovej, pyrofosfátu sodného a L-cysteínu HCl. Zemiaky boli zabalené do vriec z nylónovej/polyetylénovej fólie, inokulované *L. monocytogenes* a pred uskladnením vákuovo zabalené. Pri teplote 4 °C narástol počet *L. monocytogenes* v kontrolných vákuovo balených zemiakoch do 8. dňa na takmer 4 log KTJ.g<sup>-1</sup>. *L. monocytogenes* nerástol vo všetkých ošetrených vzorkách zemiakov pri 4 °C po 21 dňoch. Pri 15 °C narástol *L. monocytogenes* na približne 7 log KTJ.g<sup>-1</sup> do 12 dní na zemiakoch ošetrených siričitanom, alebo CBI. Pri 28 °C dosiahol *L. monocytogenes* 3 log KTJ.g<sup>-1</sup> do 24 hodín bez ohľadu na ošetrovanie. Dospelo sa k záveru, že CBI poskytuje podobnú úroveň bezpečnosti pre *L. monocytogenes* pri 4 °C a 15 °C ako ošetrovanie siričitanom, a preto by sa mohol považovať za náhradu siričitanov na vákuovo balených, vopred olúpaných zemiakoch uchovávaných v primeraných chladiacich podmienkach.

Zemiaky sa spracovávajú rýchlo a nepretržite od surových zemiakov až po hotový výrobok. Čas potrebný na dosiahnutie hotového výrobku je zvyčajne kratší ako 1 hodina, s výnimkou dehydrovaných výrobkov, ktoré môžu trvať dlhšie kvôli dlhším fázam chladenia a sušenia. Počas spracovania zemiakov existuje množstvo potenciálnych zdrojov kontaminácie vrátane zariadení, ľudí, obalov a životného prostredia. Kontaminácia zemiakových výrobkov predstavuje problém v oblasti bezpečnosti potravín, pretože tepelné ošetrovanie výrobkov spotrebiteľmi môže byť nedostatočné a nemožno sa spoliehať na to, že zničia patogénne mikroorganizmy. Prítomnosť malého množstva patogénov v čerstvých, mrazených, sušených, hotových a minimálne spracovaných zemiakových výrobkoch zdokumentovali viacerí výskumníci. Okrem toho sa preukázalo, že zemiakové výrobky podporujú rast mikroorganizmov spôsobujúcich kazenie, patogénnych baktérií a produkciu toxínov patogénmi prenášanými potravinami vrátane *C. botulinum*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella* a *S. aureus*. Výskyt ochorení z potravín v dôsledku konzumácie kontaminovaných zemiakových výrobkov je zvyčajne dôsledkom dlhodobého skladovania pripravených zemiakových výrobkov pri nesprávnych teplotách. Výrobky zo sušených zemiakov boli spojené s niekoľkými epidémiami ochorení prenášaných potravinami a najmenej jedným úmrtím. Všetky tieto prepuknutia boli dôsledkom kontaminácie baktériou *B. cereus* a priamo súviseli s držaním rehydratovaných zemiakových výrobkov pri neprimeraných teplotách. Spóry *B. cereus* pravdepodobne prežili dehydratáciu a môžu byť prítomné vo výrobku. Hoci sa dehydratované zemiakové výrobky považujú za všeobecne stabilné pri teplote okolia, rehydratáciou sa získava potravina podliehajúca skaze, ktorá podporuje rast a prežívanie *B. cereus*. Zemiakové šaláty a iné výrobky zo zemiakov pripravené na konzumáciu boli v rokoch 1970 až 1998 spojené s viac ako 91 % prípadov výskytu ochorení z potravín v Spojených štátoch súvisiacich s konzumáciou výrobkov zo zemiakov. Zemiakový šalát je výrobok, ktorý sa rýchlo kazí, a jeho zloženie zvyčajne obsahuje niekoľko ďalších zdrojov živín (napr. vajcia), ktoré sú vhodné na rast baktérií a tvorbu toxínov. Kontaminácia zemiakového šalátu *C. botulinum*, enterotoxigénnou *E. coli*, salmonelou,

shigellou a *S. aureus* a jeho skladovanie pri nesprávnych teplotách spôsobili v rokoch 1970 až 1993 v Spojených štátoch viac ako 6 500 prípadov ochorení spôsobených potravinami. Výrobky zo zemiakov pripravené na konzumáciu sú tiež možným zdrojom bakteriálnych patogénov a musia sa tiež považovať za potraviny podliehajúce skaze. Je potrebné poznamenať, že hoci väčšinu (79 %) prípadov výskytu ochorení z potravín zo zemiakov a výrobkov zo zemiakov možno pripísať salmonelle a shigelle, v súvislosti s týmito patogénmi v zemiakoch sa uskutočnilo len málo výskumov. Odporúča sa vykonať výskum výskytu, rastu a inaktivácie týchto patogénov v zemiakoch a výrobkoch zo zemiakov. Niektoré súčasné a potenciálne budúce technológie spracovania v priemysle spracovania zemiakov zahŕňajú MAP, výrobky sous-vide (vo vákuu), aseptické balenie a spracovanie, varenie pod tlakom pary, dehydrochladienie a ošetrovanie vysokým hydrostatickým tlakom. Vývoj týchto nových technológií si vyžaduje ďalšie skúmanie z hľadiska mikrobiologickej bezpečnosti. Na inštitucionálnych a maloobchodných trhoch sa čoraz viac požadujú minimálne spracované zemiakové výrobky. Mnohé chladené zemiakové výrobky, ktoré sú v súčasnosti na maloobchodnom trhu, dosahujú 30-dňovú trvanlivosť bez použitia tradičných konzervačných látok. Vákuovo balené varené zemiaky sú komerčne dostupné v Európe a zavádzajú sa na severoamerický trh. Použitím vákuového balenia a antioxidantov sa predĺžila trvanlivosť minimálne spracovaných zemiakov na približne 2 týždne. Viacerí výskumníci však preukázali, že anaeróbne podmienky vákuového balenia a zemiakov sú priaznivé pre rast *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Salmonella typhimurium* a *S. aureus*. K produkcii toxínov patogénnymi baktériami na minimálne spracovaných zemiakových výrobkoch môže dôjsť skôr, ako sa výrobky považujú za pokazené, alebo neprijateľné na konzumáciu spotrebiteľmi. Nedávno sa ukázalo, že použitie MAP a roztoku proti zhnednutiu na minimálne spracovaných zemiakoch predlžuje trvanlivosť na približne 3 týždne pri skladovaní pri 2 °C. Ukázalo sa, že viaceré antimikrobiálne látky a látky proti zhnednutiu účinne potláčajú rast mikroorganizmov v minimálne spracovaných zemiakových výrobkoch. Medzi účinné prípravky patria kyselina askorbová, kyselina citrónová, sorban draselný, pyrofosforečnan sodný a roztoky siričitanov v rôznych množstvách a kombináciách. V poslednom čase bolo vyvinutých mnoho minimálne spracovaných zemiakových výrobkov a dostupné kombinácie technológií používaných na predĺženie trvanlivosti týchto výrobkov zahŕňajú MAP, všeobecne považované za bezpečné konzervačné látky, rôzne technológie varenia, spracovania a balenia. Bez ohľadu na technológiu použitú na predĺženie trvanlivosti minimálne spracovaných zemiakových výrobkov sa odporúča, aby základný výskum počas fáz vývoja výrobku zahŕňal mikrobiologické štúdie, aby sa zabezpečila bezpečnosť potravín.

## **7 Mikrobiálne biotechnológie tropických koreňových a hľuzových plodín po zbere úrody**

Na celom svete sa komerčne pestuje približne 400 druhov zeleniny (vrátane koreňových a hľuznatých plodín). Termín "koreňové a hľuzové plodiny" je veľmi všeobecný a zahŕňa širokú škálu podzemných zásobných orgánov, z ktorých je približne 38 koreňových, 23 hľuzových, 14 koreňových a 21 cibuľových plodín. Plodiny so zväčšeným pseudostebлом, alebo stonkou (napr. pór, kaleráb), aj keď sú

podzemné, sa vo všeobecnosti nepovažujú za koreňové a hľuzové plodiny. Podobne, každá zo zahrnutých plodín sa komerčne pestuje a predáva, hoci v niektorých prípadoch objem nie je veľký; druhy, ktoré sa zbierajú z voľnej prírody, nie sú zahrnuté. Všetky plodiny sa využívajú ako potraviny, hoci rôznymi spôsobmi: napr. ako základné potraviny, zelenina, zdroje priemyselných výrobkov a korenín. Koreňové a hľuzové plodiny sa pre lepšiu orientáciu delia na plodiny mierneho pásma (napr. zemiaky (*Solanum tuberosum* L.), cukrová repa (*Beta vulgaris* L.), cibuľa (*Allium cepa* L.) a cesnak (*Allium sativum* L.) atď.) a tropické plodiny (napr. maniok (*Manihot esculenta* Crantz), sladké zemiaky (*Ipomoea batatas* L.), batáty (*Dioscorea* spp.) a jedlé aroidy (*Colocasia esculenta* L.), na základe klímy, v ktorej sa pestujú. Straty týchto plodín pred a po zbere sú veľmi vysoké a v závislosti od pestovaného druhu a prostredia skladovania môžu dosahovať 30 – 60 % v priebehu 3 – 6 mesiacov, a to dýchaním, klíčením pri prerušení dormancie, stratami spôsobenými hlodavcami a hmyzom a hubovými, bakteriálnymi a vírusovými chorobami. Biologická kontrola pomocou mikroorganizmov sa v súčasnosti používa na prevenciu rôznych chorôb, najmä hubových a do určitej miery bakteriálnych chorôb sadbových zemiakov, cukrovej repy, batátov a aroidov.

Táto kapitola sa zameriava na pokrok dosiahnutý v posledných rokoch v oblasti spektra baktérií používaných ako antagonisti na kontrolu predskladových a pozberových chorôb týchto plodín, spôsobov ich účinku a metód na zvýšenie účinnosti biokontroly antagonistov.

## 7.1 Stratégie kontroly mikroorganizmov

Existujú dva základné prístupy používania mikrobiálnych antagonistov na kontrolu chorôb rastlín:

1. Manipulácia epifytickej a endofytickej mikrobioty.
2. Tie, ktoré môžu byť umelo zavedené proti patogénom.

### 7.1.1 Manipulácia epifytickej a endofytickej mikrobioty

Identifikácia a výber účinných antagonistických baktérií je prvým a najdôležitejším krokom biologickej kontroly. Antagonistické baktérie sa väčšinou hľadajú medzi endofytickou a epifytickou mikrobiotou kultúrnych rastlín. Avšak významu endofytických baktérií v biologickej kontrole sa venuje menej pozornosti v porovnaní s epifytickými baktériami.

*Rhizoctonia solani* spôsobuje rakovinu stonky, stolónu a čiernu škvrnitosť na hľuzách zemiakov, čím znižuje zdravotný stav rastlín, kvalitu a kvantitu úrody. Z celkového počtu 220 bakteriálnych izolátov iba 25 vykazovalo vysoko signifikantnú mieru inhibície proti *R. solani* v *in vitro* duálnych kultivačných testoch.

*Pseudomonas putida*, pôvodne izolovaný z povrchu hľúz (geokaulosféry) zemiakov, vykazoval *in vitro* antibakteriálnu aktivitu voči bakteriálnemu patogénu *Erwinia carotovora*. Podobne *Serratia grimesii* citlivá na lyzozým T4 izolovaná z rhizosféry rodičovských zemiakov vykazovala *in vitro* antagonizmus voči *Verticillium dahliae*. Oba zavedené izoláty boli schopné kolonizovať rhizosféru a geokaulosféru transgénnych rastlín a netransgénnych rodičovských rastlín a usadili sa v rhizosfére v množstve  $10^5$  kolónie tvoriacich jednotiek/g čerstvej hmotnosti koreňa. Tieto kmene

tiež významne znížili výskyt fuzáριοvej suchej hniloby zemiakov pri koncentráciách  $10^6$  buniek.ml<sup>-1</sup>. Z fyloplanu cibuľových plodín boli izolované rôzne antagonistické baktérie. Spomedzi epifytických mikroorganizmov boli *Bacillus amyloliquefaciens* BL-3, *Paenibacillus polymyxa* BL-4 a *Pseudomonas putida* Cha 94 vysoko inhibičné voči klíčeniu konídií húb ako *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus* spp. a *Botrytis allii*, ktoré boli pôvodcami bazálnej a krčkovej hniloby cibule počas skladovania. Podobne aplikácia *Bacillus subtilis*, izolovaného z epifytickej mikrobioty hľúz batátov, preukázala drastické zníženie počtu húb spôsobujúcich kazenie batátov počas 5-mesačného obdobia skladovania. Povrchové huby ako *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium moniliforme* a *Penicillium sclerotigenum* boli na ošetrovaných hľuzách úplne vytlačené.

### 7.1.2 Zavedenie mikrobiálnych antagonistov

Prvé snahy o kontrolu chorôb rastlín zahŕňali zavedenie antagonistických baktérií *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas cepacia* a húb *Trichoderma* a *Rhodotorula* do interakčného prostredia medzi rastlinou a patogénom. Odvtedy bolo identifikovaných niekoľko ďalších antagonistov (vrátane kvasiniek), ktorí sa používajú na kontrolu rôznych chorôb rastlín.

## 7.2 Huby

Huby sa používajú aj ako antagonisti pri kontrole chorôb koreňov a hľúz. Štúdie ukázali, že *Trichoderma reesei* a *T. viride* významne znížili výskyt symptómov *Rhizoctonia* na klíčkoch zemiakov. *Gliocladium (Trichoderma) virens*, *Fusarium oxysporum*, *F. lateritium*, *Penicillium tritinum* a *Taralomyces* spp. majú dobrý potenciál na biokontrolu háďatka zemiakového. Zo skríningových testov *in vitro* a *in vivo* na antagonizmus izolátov *Trichoderma* proti pozberovým patogénom batátov (*Dioscorea* spp.) bol ako najslubnejší kandidát vybraný izolát *Trichoderma viride*. Inokulácia bielych batátov (*Dioscorea rotundata* Poir.) konídiami *T. viride* a následné skladovanie hľúz v podmienkach prostredia v tradičnej stodole na batáty viedlo k drastickému zníženiu frekvencie výskytu normálnej povrchovej mykobioty hľúz (*Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae* a *Penicillium oxalicum*) počas 4-mesačného obdobia skladovania.

## 7.3 Kvasinky

Kvasinky sa používajú najmä na kontrolu pozberových chorôb ovocia, zeleniny, koreňov a hľúz. Pri odporúčaní kvasiniek ako potenciálnych mikrobiálnych činiteľov na kontrolu pozberových chorôb bolo uvedených niekoľko pozitívnych bodov vrátane: a) môžu dlhodobo kolonizovať povrch rany aj v suchých podmienkach; b) produkujú extracelulárne polysacharidy, ktoré zvyšujú ich schopnosť prežitia a obmedzujú rast patogénnych propagúl; c) môžu rýchlo využívať živiny a rýchlejšie sa množiť; d) najmenej na ne pôsobia pesticídy. Z rôznych kvasiniek vykazujú široké spektrum biologickej aktivity proti mnohým pozberovým patogénom rastlín *Candida sake*, *Candida albicans*, *Candida oleophila*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus laurentii* atď.

## 7.4 Baktérie

Bakteriálne bioty priťahujú obrovskú pozornosť ako činidlá na biologickú kontrolu chorôb rastlín, najmä preto, že sú ľahko spracovateľné, všeobecne stabilné, odolné, majú schopnosť prežiť vysychanie a prirodzene majú rýchly čas generácie. Je tiež známe, že ovplyvňujú životné cykly rôznych rastlinných patogénov, alebo škodcov rôznymi mechanizmami vrátane produkcie extracelulárnych metabolitov a intracelulárnych bielkovinových toxínov. Vo všeobecnosti platí, že baktérie tvoriace spóry (napr. *Bacillus* spp.) prežívajú vo väčšej miere aj v drsnom prostredí v porovnaní s baktériami, ktoré spóry netvorí. Spomedzi *Bacillus* spp. najväčšiu pozornosť priťahujú *Bacillus thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* a *B. subtilis*. Ďalšie zaujímavé bakteriálne druhy sú *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Talaromyces flavus*, *Pantoea agglomerans* atď. Baktérie sa ľahko masovo vyrábajú pomocou procesu fermentácie v kvapalnom stave, hoci v niektorých prípadoch môžu byť vhodnejšie pre fermentáciu v polotuhom, alebo tuhom stave.

### Spôsob účinku bakteriálnych látok

Biologická kontrola pomocou baktérií využíva prirodzene sa vyskytujúci mechanizmus na potlačenie rastlinných patogénov. Spôsoby účinku sú antibiôza, súťaž o priestor, živiny, potláčanie sprostredkované siderofórmami, parazitizmus, lytické enzýmy bunkovej steny a indukovaná systémová rezistencia. Vo všeobecnosti sa uplatňuje viac ako jeden mechanizmus, ale v žiadnom prípade sa nezistilo, že by bol za biologickú kontrolu zodpovedný/vhodný jediný mechanizmus.

### Antibiotiká

Produkcia antibiotík je najdôležitejším mechanizmom, ktorým bakteriálni antagonisti potláčajú patogény. Príkladom antibiotík sú ituríny (silný antifungálny peptid) produkované *Bacillus subtilis*, pyrrolnitril produkovaný *Pseudomonas cepacia*, trichotecény produkované *Myrothecium roridum* atď.

*Pseudomonas fluorescens* DR54, izolovaný z rhizosféry cukrovej repy, preukázal biokontrolu *Pythium in planta*. Tento bakteriálny izolát produkoval antifungálny lipopolypeptid viazaný na bunky, viskosínamid, ktorý vyvolával fyziologické zmeny u *Pythium ultimum* a *Rhizoctonia solani in vitro* a v pôde, ako sa študovalo fluorescenčnou mikroskopiou. Viskoziinamid sa zistil vo zvyšujúcom sa množstve na obaloch semien aj v inrhizosfére pôdy obklopujúcej korene cukrovej repy počas 7 dní inkubácie. V ďalšej štúdii *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 silne redukovala ochorenie koreňovej hniloby odvodené z tkanivovej kultúry sadeníc kokovníka. Pôdne experimenty s kmeňom PNA1 v porovnaní s mutantmi s nedostatkom fenazínov naznačili, že biokontrolná aktivita PNA1 proti *Pythium myriotylum* môže zahŕňať fenazíny. Účasť fenazínu bola ďalej posilnená skutočnosťou, že FM13 kŕmený exogénnym tryptofánom (takže sa obnovila produkcia fenazínu) znížil závažnosť ochorenia na cocoyam. Účinnosť PNA1 na kontrolu *P. myriotylum* na cocoyam sa zlepšila, keď sa kmeň a patogén nechali vzájomne pôsobiť 24 hodín pred presadením sadeníc cocoyam, zatiaľ čo zdvojnásobenie hustoty inokula patogénu negatívne ovplyvnilo jeho účinnosť.

*Burkholderia cepacia* OSU-7 má veľký potenciál na využitie ako biokontrolné činidlo na manažment druhov *Fusarium* spôsobujúcich suchú hnilobu na zemiakoch. *Burkholderia cepacia*, predtým známa ako *Pseudomonas cepacia*, produkuje jedno, alebo viac antibiotík, ktoré sú aktívne proti širokému spektru rastlinných patogénnych húb v zahraničí. Organizmy komplexu *B. cepacia* produkujú inhibičné metabolity, ako sú pyrrolnitrín, siderofóry, cepaciamid A(B), cepacidín A(B), cepacín A(B) a lipopeptidy. Zdá sa, že tieto antibiotiká sú v mnohých prípadoch dôležité pre potlačenie choroby. Zlúčeniny ako cepacín A a cepacín B vykazujú len antibakteriálnu aktivitu, zatiaľ čo pyrrolnitrín je účinný proti hubám, kvasinkám a grampozitívnym baktériám.

### **Produkcia siderofórov**

Účinok *Pseudomonas* kolonizujúcich korene na zvýšenie úrody plodín je čiastočne spôsobený nimi produkovaným siderofórom, ktorý znižuje dostupnosť železa v rhizosfére pre škodlivé huby a rhizobaktérie. Siderofóry sú nízkomolekulárne zlúčeniny syntetizované v podmienkach nedostatku železa mnohými mikroorganizmami. Chelátujú  $Fe^{3+}$  a výsledný komplex železa sa transportuje do bunky prostredníctvom receptorov. Siderofóry fluorescenčných pseudomonád sa bežne označujú ako pseudobaktíny, alebo pyroveridíny.

### **Konkurencia o živiny**

Súťaž o živiny je najslubnejším spôsobom pôsobenia viacerých bakteriálnych agensov. Upevnenie bakteriálneho antagonistu na hýfy patogénu sa zdá byť dôležitým faktorom potrebným na súťaženie o živiny, ako to dokazujú interakcie *Pseudomonas fluorescens* a *Pythium utimum* v cukrovej repe. Štúdie *in vitro* vykonané na takýchto interakciách odhalili, že v dôsledku priameho prichytenia antagonistické baktérie prijímajú živiny rýchlejšie ako cieľové patogény, a tým zabraňujú klíčeniu spór a rastu patogénov. Nepatogénne druhy *Erwinia*, ako napríklad *E. cypripedii*, vykazovali antagonistickú aktivitu voči rôznym izolátom *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, pôvodcu mäkkej hniloby mrkvy, tým, že súperili o živiny.

### **Konkurencia o priestor**

Súťaž o priestor je súťaž o miesta infekcie, ktorá môže nastať, ak antagonisti dokážu obsadiť špecifické miesta, kde prebiehajú mechanizmy rozpoznávania medzi hostiteľom a patogénom. Ak tieto miesta už nie sú pre patogény k dispozícii, potrebný postup rozpoznávania sa nemôže uskutočniť a k infekcii nedôjde. Mikrobiálni antagonisti by teda mali mať schopnosť rásť rýchlejšie ako patogén. Skúmala sa kolonizácia *P. fluorescens* DR54 v rhizosfére cukrovej repy pomocou konfokálnej laserovej skenovacej mikroskopie a zistilo sa, že *P. fluorescens* DR54 bol dominantným organizmom niekoľko dní po inokulácii. Počas ich 20-dňovej štúdie bolo možné zistiť aktívne mikrokolónie *P. fluorescens* DR54 na všetkých častiach koreňov. *P. putida* QC14-3-8 a L16-3-3 dokázali kolonizovať povrch hľúz transgénnych aj netransgénnych zemiakov, ale kultivovateľná populácia oboch inokulantov bola v geokaulosfére približne o jednu exponenciálnu jednotku nižšia ako v rhizosfére. To sa očakávalo, pretože rhizosféra predstavuje atraktívnejšie prostredie v porovnaní s povrchom hľúz v dôsledku exsudácie živín.



### **Produkcia lytických enzýmov bunkovej steny**

Mikrobiálni antagonisti tiež produkujú lytické enzýmy, ako sú glukonáza, chitináza a proteinázy, ktoré pomáhajú pri rozklade bunkovej steny patogénnych húb. Interakcia medzi *Bacillus subtilis* a *Fusarium oxysporum*, pozberovými patogénmi hlíz batátu (*Dioscorea* spp.), sa študovala pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie. Pozorovala sa lýza bunkovej steny huby *B. subtilis* vďaka produkcii extracelulárnej chitinázy.

### **Priamy parazitizmus**

Antagonista a patogén môžu interagovať aj prostredníctvom priameho parazitizmu. Testovala sa schopnosť tvorby biofilmu dvoch mutantných kmeňov so zvýšenou produkciou kyslých extracelulárnych polysacharidov v porovnaní s kontrolným kmeňom *Pseudomonas fluorescens* CHA0 divokého typu. Skúmalo sa ukotvenie baktérií na axenických nemykorizných a mykorizných koreňoch mrkvy, ako aj na extraríznom mycéliu arbuskulárnej mykoriznej huby *Glomus intraradices*. Nemukoidný kmeň divokého typu *P. fluorescens* CHA0 priľnul veľmi slabo na všetkých povrchoch, zatiaľ čo oba mukoidné kmene vytvorili na koreňoch mrkvy a hubových štruktúrach hustú a nerovnomernú bakteriálnu vrstvu. Zvýšené adhezívne vlastnosti baktérií podporujúcich rast rastlín môžu viesť k stabilnejším interakciám v zmiešaných inokulách a rhizosfére.

### **Vyvolanie rezistencie**

Interakcie medzi rastlinami a patogénmi môžu viesť buď k úspešnej infekcii (kompatibilná reakcia), alebo k odolnosti (nekompatibilná reakcia). Pri nekompatibilných interakciách vyvolá infekcia vírusmi, baktériami, alebo hubami súbor lokalizovaných reakcií v infikovaných hostiteľských bunkách a ich okolí. Tieto reakcie zahŕňajú oxidačnú búrku, ktorá môže viesť k smrti buniek. Patogén tak môže byť "uväznený" v mŕtvych bunkách a zdá sa, že je mu zabránené šíriť sa z miesta počiatocnej infekcie. Ďalšie lokálne reakcie v okolitých bunkách zahŕňajú zmeny v zložení bunkovej steny, ktoré môžu brániť prieniku patogénu, a de novo syntézu antimikrobiálnych zlúčenín, ako sú asfytoalexíny a proteíny súvisiace s patogenézou (PR).

Izolát *Bacillus mycoides* bol (BmJ) schopný vyvolať systémovú získanú rezistenciu (SAR) v cukrovej repe. Zistilo sa, že počas interakcie medzi BmJ a rastlinou sa indukujú dva molekulárne markery súvisiace s patogénom indukovanou SAR, b-1,3-glukanáza a chitináza. Tieto reakcie hostiteľa by sa preto mohli použiť ako prediktor schopnosti indukcie systémovej rezistencie za predpokladu, že výsledky testov sú presné a precízne.

## **7.5 Oblasti použitia bakteriálnych antagonistov**

Baktérie sú v prírode všeobecne dominantnejšou mikrobiotou v porovnaní s kvasinkami a vláknitými hubami. K dispozícii je veľké množstvo informácií o antagonizme medzi baktériami a patogénnymi hubami.

## Ošetrenie semien

Pri ošetrení semien antagonistami je antagonista prítomný od začiatku rastu rastliny. Vďaka včasnej prítomnosti sú antagonisti schopné úspešne kolonizovať semená a mladé korene. Konkurencia zo strany ostatných obyvateľov rhizosféry sa výrazne znižuje a antagonisti sú schopní vytvoriť vysokú populačnú hustotu. Na tento účel sa skúmajú najmä antagonisti *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas* spp. Napríklad ošetrenie sadiva zemiakov pomocou *B. subtilis* úspešne znížilo výskyt *Rhizoctonia solani* a *Streptomyces scabies* v skleníkových a poľných pokusoch. Zníženie výskytu chorôb v poľných pokusoch sa v jednotlivých pokusných rokoch líšilo, ale v prípade *R. solani* dosiahlo úroveň až 50 % a v prípade *S. scabies* až 67 %. Podobne *Pseudomonas fluorescens-putida* a kmeň R20 *P. putida* po inokulácii na osivo cukrovej repy spôsobili výrazne nižší výskyt kolonizácie *Pythium ultimum*. Výskyt hubovej kolonizácie semien cukrovej repy ošetrených *P. fluorescens*, alebo *P. putida* bol 6,7 %, resp. 35,7 % v porovnaní s 90 % neošetrených semien po výsadbe.

## Aplikácia na pôdu

Aplikácia antagonistov do pôdy má mnoho výhod. Najdôležitejšou z nich môže byť relatívne nízka variabilita, ktorá sa vyskytuje v podmienkach pôdneho prostredia. Extrémne udalosti, ako sú silné dažde a sucho spôsobené niekoľkohodinovým slnečným svitom, sú pôdou tlmené. Preto sú antagonisti po aplikácii menej stresované a majú vyššiu možnosť prežitia.

Extracelulárne polysacharidy zohrávajú dôležitú úlohu pri tvorbe bakteriálnych biofilmov. Testovala sa schopnosť tvorby biofilmu dvoch mutantných kmeňov so zvýšenou produkciou kyslých extracelulárnych polysacharidov v porovnaní s divokým typom biokontrolného kmeňa *P. fluorescens*. Skúmalo sa ukotvenie baktérií na axenických nemykoríznych a mykoríznych koreňoch mrkvy, ako aj na extra radikulárnom mycéliu arbuskulárnej mykoríznej huby *Glomus intraradices*. Nemukoidný kmeň *P. fluorescens* divokého typu priľnul na všetkých povrchoch len veľmi málo, zatiaľ čo oba mukoidné kmene vytvorili na koreňoch mrkvy a hubových štruktúrach hustú a nerovnomernú bakteriálnu vrstvu.

## Ošetrenie nadzemných častí rastlín

Biologická kontrola rastlinných patogénov na nadzemných častiach rastlín je zrejme najnáročnejšou úlohou pre mikrobiálnych antagonistov. Pokiaľ ide o plodiny na poli, nadzemné časti rastlín sú vystavené podmienkam prostredia, ako sú silné dažde, sucho, UV žiarenie, vietor a iné podmienky. Tieto nepriaznivé podmienky bránia prežitiu veľkých populácií antagonistov počas dlhšieho obdobia. Foliárna aplikácia kmeňa *Pseudomonas fluorescens* a *P. putida* významne znížila počet uhlových škvrn na liste na náchylných klonoch manioku.

## 7.6 Opatrenia na zlepšenie účinnosti antagonistov

Existuje niekoľko prístupov na zlepšenie účinnosti antagonistov; niektoré reprezentatívne príklady sú opísané nižšie.

## **Pridávanie živín**

Cieľom pridávania živín je zvýšiť výkonnosť antagonistov poskytnutím živín. Jadrá z drevnej štiepky a polyakrylamidu obklopujúce korene hostiteľskej rastliny by mohli zmeniť pôdne prostredie tak, aby podporovalo rast introdukovaných mikroorganizmov biokontroly (*Streptomyces lydicus*, alebo *Pseudomonas corrugata*), čím by sa znížila infekcia *Verticillium dahliae* zemiakov v podmienkach skleníka.

## **Používanie antagonistických zmesí**

Vzhľadom na rôznu citlivosť húb, kvasiniek a baktérií na podmienky prostredia, najmä na nadzemné časti rastlín, by použitie antagonistických zmesí mohlo prispieť k jednotnosti účinnosti antagonistických prípravkov. Ak jeden organizmus zlyhá v dôsledku nepriaznivých podmienok, ostatné by mali byť v týchto podmienkach účinné. Okrem toho by kombinácia mohla mať synergický účinok.

*Pseudomonas fluorescens* F113 a *Stenotrophomonas maltophilia* W81 v kombinácii v konzorciu zlepšili úroveň ochrany v porovnaní s tým, keď sa použili jednotlivo na ochranu cukrovej repy pred vlhnutím spôsobeným *P. oligandrum*. V ďalšej štúdii sa v troch rôznych dvojročných rotáciách plodín (jačmeň/žito, jačmeň/datelina a zemiaky) použili komerčné biokontrolné činidlá, mikrobiálne inokulanty, mykorízy a aeróbny kompostový čaj (ACT). Biologické zmeny znížili výskyt chorôb prenášaných pôdou a zlepšili úrodu v niektorých rotáciách, ale nie v iných. Pôdna aplikácia ACT a kombinácia ACT so zmesou prospešných mikroorganizmov (Mix) znížila výskyt rakoviny stonky, čiernej škvrnitosti a chrastavosti na hľuzách zemiakov o 18 – 33 % a zvýšila úrodu o 20 – 23 % v rotácii jačmeň/žito, ale nie v ostatných rotáciách. Mix tiež znížil výskyt chorôb (o 20 – 32 %) len v rotácii jačmeň/drevina.

## **Formulácia antagonistov**

Formulácia antagonistov by mala plniť rôzne funkcie s hlavným cieľom podporiť životaschopnosť a tým stabilizovať a zvýšiť výkonnosť antagonistov.

Ošetrovanie osiva nesterilizovanými práškovými slamkami z 39 plodín sa testovalo na kontrolu *Pythium damping-off* cukrovej repy. Ľan, koriander, hrach a šošovica, boli účinné pri kontrole choroby v pôde umelo napadnutej *Pythium* spp. sterilizácia ľanu a hrachu eliminovala účinnosť. Prášok z pšeničnej slamy nanosený na semená cukrovej repy zvýšil výskyt *Pythium damping-off*, ale tento účinok bol zvrátený koinokuláciou pšeničných slamiek s biokontrolným činiteľom *Pseudomonas fluorescens*. Obalenie semien cukrovej repy s *P. fluorescens* a ľanovými, alebo hrachovými slamami tiež zvýšilo účinnosť bakteriálneho kmeňa pri kontrole *Pythium damping-off*. Hrachové slamy a v menšej miere aj šošovicové slamy produkovali prchavé látky, ktoré ovplyvňovali rast mycélia *Pythium* spp.

## **Bakteriálna biokontrola koreňových a hľuznatých plodín**

Baktérie sú najslubnejšími biokontrolnými činiteľmi v porovnaní s hubami a kvasinkami. Väčšina hubových infekcií koreňových a hľuznatých plodín sa kontroluje pomocou biologických kontrolných látok na báze baktérií.

## 7.7 Koreňové plodiny mierneho pásma

Rastliny pestované pre svoje jedlé korene (ktoré môžu, ale nemusia byť hľuzovité) sa nazývajú koreňové a hľuzovité plodiny. Plodiny, ktoré sa pestujú prevažne v miernom podnebí, ako napríklad mrkva, zemiaky, koreňová repa atď., sa nazývajú hľuzovité plodiny mierneho pásma.

### 7.7.1 Zemiaky

Endofytické baktérie zemiakov sa skúmali zo šupky hľúz (peridermu a vrchných 3 mm tkaniva) štyroch odrôd (Russet Burbank, Kennebec, Butte a Shepody). Endofytické baktérie z niekoľkých vrstiev šupky boli v biologických testoch *in vitro* vystavené účinkom pôdných rastlinných patogénov *Fusarium sambucinum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum* a *Phytophthora infestans* (krycie typy A1 a A2). Vo všeobecnosti bola antibiôza bakteriálnych endofytov voči týmto patogénom výrazne vyššia u izolátov získaných z naj vonkajšej vrstvy šupky hľuzy a postupne klesala smerom k stredu hľuzy. Antibiôza proti *P. infestans* bola variabilná, pričom postupný pokles antibiotickej aktivity od vonkajších k vnútorným vrstvám šupky sa vyskytol len u odrôd "Russet Burbank" a "Kennebec". Vo všetkých prípadoch bola inhibičná aktivita endofytických baktérií významne vyššia proti A1 ako proti A2 krycím typom *P. infestans*. V štyroch zo siedmich prípadov, keď boli zo všetkých troch vrstiev šupky získané rovnaké druhy baktérií, sa antibiôza voči patogénom významne znižovala s hĺbkou získania (od peridermu do vnútra hľuzy), čo naznačuje, že v určitých spoločenstvách endofytických baktérií môže obrana proti patogénom súvisieť s adaptáciou baktérií na umiestnenie v hostiteľovi a môže byť špecifická pre typ a miesto tkaniva.

Osem rhizobaktérií podporujúcich rast rastlín (PGPR) rôznych druhov (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus macerans* a *Flavobacter balastinium*) boli testované na antifungálnu aktivitu v podmienkach *in vitro* (na Petriho miskách) a *in vivo* (na zemiakovej hľuze) proti *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum* a *F. culmorum*, ktoré spôsobujú suchú hnilobu zemiakov. Všetky kmene PGPR sa testovali aj na hľuzách dvoch odrôd zemiakov "Agria" a "Granola" v podmienkach skladovania. Jedine kmeň *B. cepacia* OSU-7 mal významný vplyv na kontrolu suchej hniloby zemiakov spôsobenej tromi rôznymi hubami.

*Bacillus thuringiensis*, ktoré boli predtým vybrané pre ich účinnosť proti hmyzu, boli testované *in vitro* a *in vivo* proti *Fusarium roseum* var. *sambucinum*, pôvodcovi suchej hniloby zemiakových hľúz. Výsledky skríningu duálnych kultúr *in vitro* ukázali, že viac ako 50 % *Bacillus* spp. izolovaných zo slaných pôd inhibovalo rast patogénu *in vitro*. Naopak, iné kmene *B. thuringiensis* nedokázali inhibovať rast patogénu *in vitro*. Na poranených zemiakových hľuzách boli najúčinnějšími izolátmi získanými zo slaných pôd kmene *Bacillus* X7, X9, X16, I32 a G7, pričom percento redukcie suchej hniloby sa pohybovalo od 66 do 89 %. Tieto účinné izoláty *Bacillus* boli identifikované ako patriace k jednému z druhov *Bacillus cereus* (X9, X16 a G7), *B. lentimorbus* (X7), alebo *B. licheniformis* (I32).

Kmene *B. thuringiensis* boli síce *in vitro* neúčinné, ale inhibovali rozvoj suchej hniloby *in vivo*, pričom percentuálne skóre inhibície sa pohybovalo od 41 do 52 %.

Zatiaľ čo izoláty *Bacillus* vybrané zo slaných pôd najlepšie inhibovali rozvoj suchej hniloby, keď sa aplikovali ako mladé kultúry (24 h), kmene *B. thuringiensis* vo všeobecnosti lepšie fungovali ako staršie kultúry (48 – 72 h). Bunkové filtráty *Bacillus* spp. neboli schopné inhibovať rast *Fusarium*. Naopak, zdá sa, že prchavé látky uvoľnené antagonistami prispievajú k inhibícii patogénu.

Antagonistický potenciál zemiakov (endofytických a ektofytických) bol preverený dvojitým testovaním antagonizmu celkom 2 648 baktérií voči pôdnym patogénom *Verticillium dahliae* a *Rhizoctonia solani*. Rhizosféra a endorhiza boli hlavnými rezervoármi antagonistických baktérií a vykazovali najvyššiu podobnosť v ich kolonizácii antagonistami. Najvýraznejším druhom všetkých mikroprostredí bol *Pseudomonas putida* a rep-PCR s BOX primermi ukázala, že tieto izoláty vykazovali DNA odtlačky špecifické pre mikroprostredie. Izoláty *P. putida* z rhizosféry a endorhízy poskytli takmer identické odtlačky, čo potvrdzuje vysokú podobnosť bakteriálnych populácií. Gén *phlD*, ktorý sa podieľa na produkcii antibiotika 2,4-diacetyl-floroglucinolu, sa našiel len medzi izolátmi *Pseudomonas* z rhizosféry a endorhízy. Výsledkom hodnotenia bakteriálnych izolátov z hľadiska potenciálu pre biokontrolu na základe antagonizmu húb a fyziologických vlastností bol výber piatich sľubných izolátov z každého mikroprostredia. Najúčinnjším izolátom bola *Serratia plymuthica* 3Re4-18 izolovaná z endorhízy.

V sérii skleníkových pokusov sa testovala účinnosť dvadsiatich ôsmich potenciálnych biokontrolných organizmov proti *Rhizoctonia solani* na zemiakoch. Testované organizmy pozostávali z poľných izolátov *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., a *Rhizoctonia zeae*; známych izolátov biokontroly vrátane *Laetisaria arvalis*, *Verticillium biguttatum*, *Cladorrhinum foecundissimum* a *Stilbella aciculosa*; a komerčných produktov *Bacillus subtilis* (Kodiak), *Trichoderma virens* (SoilGard) a *T. harzianum* (RootShield). Skúmali sa aj rôzne formulácie a dávky niekoľkých izolátov húb a účinnosť kombinácií účinných antagonistov. Žiadne z ošetrení vrátane chemickej kontroly (azoxystrobín) účinne nekontrolovalo rakovinu stonky a čiernu škvrnitosť vo všetkých pokusoch. Avšak *B. subtilis* GB03, *R. zeae* LRNE17E, *S. aciculosa* 112-B a chemická kontrola boli najúčinnnejšie pri znižovaní závažnosti rakoviny stonky (40 – 49 % zníženie) v porovnaní s napadnutými kontrolami počas všetkých pokusov. *L. arvalis* ZH-1, *R. zeae* LRNE17E a chemická kontrola znížili závažnosť čiernej škvrnitosti o 54 – 60 % v porovnaní so zamorenou kontrolou. Ostatné ošetrenia tiež významne znížili výskyt rakoviny stonky a čiernej škvrnitosti, boli však o niečo menej účinné. Množstvo biokontrolných zmien nesúviselo s kontrolou chorôb, hoci vyššie dávky zvyčajne zabezpečovali najlepšiu kontrolu. Jedna kombinácia biologických kontrolných organizmov, *B. subtilis* a *T. virens*, preukázala o niečo lepšiu kontrolu rakoviny stonky ako každý organizmus samostatne, čo naznačuje, že tento prístup môže poskytnúť lepšiu účinnosť biologickej kontroly.

### 7.7.2 Cukrová repa

Izolát *Bacillus subtilis*, BacB, sa podrobne skúma na kontrolu cercosporóznej škvrnitosti listov cukrovej repy spôsobenej *Cercospora beticola* Sacc. skúmaním načasovania aplikácie, koncentrácie biokontrolného činidla (BCA), použitia selektívneho živného substrátu  $\beta$ -glukánu a formy BCA v čase aplikácie. Skúmanie

účinkov rôznych koncentrácií  $\beta$ -glukánu a úrovni BacB pri aplikácii preukázalo komplexnú interakciu medzi  $\beta$ -glukánom, populáciou BCA a kontrolou choroby. Pokusy v rastovej komore ukázali, že aplikácia baktérií vo forme vegetatívnych buniek namiesto spór, alebo aplikácia BCA 1 – 5 dní pred infekciou by mohla výrazne zvýšiť kontrolu choroby. Laboratórne experimenty preukázali schopnosť vyvolať klíčenie a vegetatívny rast BacB z formulácie so spórmi, a to bez trepania, alebo fermentačného zariadenia. To sľubuje optimalizáciu *Bacillus* spp. na biologickú kontrolu. V poľných pokusoch sa vegetatívne bunky neosvedčili lepšie ako aplikácia spór, hoci sa preukázal potenciál  $\beta$ -glukánu zvýšiť výskyt choroby.

*Pseudomonas fluorescens* F113 a *Stenotrophomonas maltophilia* W81 chránia cukrovú repu pred zvlhnutím spôsobeným pythiom prostredníctvom produkcie antifungálneho sekundárneho metabolitu 2,4-diacetylfloroglucinolu a extracelulárnej proteolytickej aktivity. Rast a produkcia 2,4-diacetylfloroglucinolu *in vitro* pomocou F113 a extracelulárnych lytických enzýmov pomocou W81 neboli ovplyvnené, keď boli inokulované v kombinácii. Schopnosť W81 a F113 kolonizovať rhizosféru cukrovej repy bola v podstate podobná, keď sa oba kmene aplikovali jednotlivo, alebo sa inokulovali na semená v pomere 1:1, a to v prirodzených pôdnych mikrokozmoch aj v poľných podmienkach. Zároveň jednotlivá inokulácia s W81, alebo F113 účinne zabránila kolonizácii semien cukrovej repy *Pythium* spp. v pôdnych mikrokozmoch bez toho, aby bolo potrebné kombinovať oba kmene. Táto parita sa však neodrazila na vzchádzaní semien, kde kombinácia W81 a F113 významne zvýšila konečné porasty cukrovej repy (na úroveň dosiahnutú chemickými pesticídmi) v podmienkach mikrokozmu 28 dní po zasiatí. V poľnom pokuse bola jediná inokulácia, ktorá bola schopná poskytnúť účinnú ochranu cukrovej repy, tá, pri ktorej boli W81 a F113 koinokulované, a táto úprava sa ukázala ako rovnocenná s použitím chemických fungicídov. Záverom možno konštatovať, že v porovnaní so samostatnou inokuláciou jedného z kmeňov biokontroly sa kombinovaným použitím *P. fluorescens* produkujúceho floroglucinol a proteolytického kmeňa *S. maltophilia* zlepšila ochrana cukrovej repy proti vlhnutiu sprostredkovanému pythiom.

V inej štúdii sa hodnotila aj dvojitá kompatibilita antagonistov (kmene *Pseudomonas* a *Bacillus*) proti *Pythium* spp. Kombinácie antagonistov nevykazovali žiadnu lepšiu schopnosť biokontroly ako jednotliví antagonisti a kompatibilita baktérií *in vitro* nekorelovala s kompatibilitou *in vivo*.

*Bacillus mycoides* izolát Bac J., nepatogénna baktéria žijúca vo fylosfére, redukuje cercosporovú škvrnitosť listov (*Cercospora beticola* Sacc.) cukrovej repy o 38-91 % v skleníkových aj poľných pokusoch. Kontrola choroby sa pripisuje schopnosti baktérie indukovať systémovú rezistenciu, ktorá sa preukázala prostredníctvom klasických pokusov s indukovanou rezistenciou, westernovej analýzy a testov enzýmovej aktivity. Enzýmové testy po ošetrovaní *B. mycoides* a acibenzolar-S-metylom preukázali zvýšenú aktivitu chitinázy,  $\beta$ -1,3-glukanázy a peroxidázy, čo sú všetko proteíny súvisiace s patogenézou a uznávané indikátory systémovej rezistencie. Westernovou analýzou sa v rastlinách ošetrovaných *B. mycoides* a acibenzolar-S-metylom zistili početné izoformy chitinázy, ktoré sa vo vodných kontrolách nezistili. Aktívne izoformy chitinázy boli identifikované pomocou in-gel testov aktivity. *Cercospora beticola*  $\beta$ -1,3-glukanázové testy aktivity po natívnej polyakrylamidovej gélovej elektroforéze odhalili dve jedinečné izoformy produkované po ošetrovaní *B. mycoides*, z ktorých jedna bola zistená aj pri ošetrovaní acibenzolar-S-

metylom. Zvýšenie peroxidázovo špecifickej aktivity po ošetrení acibenzolar-S-metylom a *B. mycooides* bolo spôsobené produkciou dvoch jedinečných izoforiem, ktoré sa nenašli v rastlinách ošetrených vodou, ako ukázali testy aktivity po natívnej polyakrylamidovej gélovej elektroforéze.

*Pseudomonas fluorescens-putida* a kmeň R20 *P. putida*, keď boli inokulované na osivo, viedli k výrazne nižšiemu výskytu kolonizácie *P. ultimum*. Výskyt kolonizácie semien repy ošetrených *P. fluorescens-putida*, alebo *P. putida* hubami bol 6,7 %, resp. 36,7 % v porovnaní s 90 % neošetrených semien 24 h po zasiatí. *P. fluorescens* inhibovala rast mycélia aj klíčenie sporangií, zatiaľ čo *P. putida* inhibovala len rast mycélia.

*Pseudomonas fluorescens* (biovary I až VI) boli zozbierané z rhizosféry rastlín cukrovej repy pestovaných na poli s cieľom vybrať kandidátske kmene na biologickú kontrolu pred vznikom choroby zvlhnutia. Izoláty boli testované na antagonizmus *in vitro* voči rastlinným patogénnym mikroskopickým hubám *Pythium ultimum* a *Rhizoctonia solani* na troch rôznych testovacích médiách. Mechanizmy inhibície húb boli objasnené sledovaním produkcie sekundárnych metabolitov a aktivity enzýmov rozkladajúcich bunkovú stenu v rovnakých médiách. U väčšiny biovarov sa prejavil špecifický mechanizmus antagonizmu, ktorý bol reprezentovaný jedinečnou produkciou antibiotík, alebo enzýmov v médiách. Lipopeptidové antibiotikum, viskozínamid, produkovala *P. fluorescens* bv. I nezávisle od zloženia média, zatiaľ čo antibiotikum 2,4-diacetylfloroglucinol sa pozorovalo len v médiu bohatom na glukózu a len u *P. fluorescens* bv. II/IV. Oba patogény boli inhibované oboma antibiotikami. Napokon, v prostredí s nízkym obsahom glukózy bola zjavným mechanizmom antagonizmu voči *R. solani* aktivita endochitinázy rozkladajúcej bunkovú stenu u *P. fluorescens* bv. I, III a VI. DR54 izolát produkujúci viskozínamid (bv. I) sa ukázal ako účinný kandidát na biologickú kontrolu, čo sa testovalo v nádobovom pokuse so sadenicami cukrovej repy napadnutými *Pythium ultimum*. Priradenie rôznych vzorcov antagonizmu húb k biovarom *P. fluorescens* sa diskutovalo v súvislosti so zlepšeným výberovým protokolom pre kandidátske kmene, ktoré sa majú použiť v biologickej kontrole.

Skúmala sa účinnosť izolátu *Bacillus subtilis* na poli a v rastovej komore v prítomnosti huby *Cercospora beticola*. Použitie selektívneho podporného bio-kontrolného činidla substrátu  $\beta$ -glukánu, aplikovaného v množstve 0, 0,5 a 1,0 % postrekového roztoku, neovplyvnilo rozdiely v celkovom počte populácií (spóry + vegetatívne bunky) spontánneho izolátu BacB rezistentného voči rifampicínu (Rif+) počas 14-dňového obdobia postreku. BacB Rif+, aplikovaný vo forme spór, klesol z 10 000 KTJ (kolónií tvoriacich jednotky)/cm<sup>2</sup> na deň 0,5 – 100 KTJ.cm<sup>-2</sup> na deň 14 pri troch testovaných hladinách  $\beta$ -glukánu. Distribúcia populácií BacB Rif+ bola modelovaná na listovej škále, s  $\beta$ -glukánom a bez neho. Vyššie populácie vegetatívnych buniek boli pravdepodobnejšie po 14 dňoch s 1 %  $\beta$ -glukánu ako s 0 %  $\beta$ -glukánu. Populácie BacB boli viac agregované bez  $\beta$ -glukánu ako so živným substrátom. Medzi hustotou BacB a závažnosťou ochorenia *Cercospora* listov nebola zistená žiadna korelácia, čo naznačuje, že ani antibiόza, ani parazitizmus pravdepodobne nie sú dôležitým mechanizmom kontroly ochorenia.

V skleníkovom pokuse sa skúmali necieľové účinky bakteriálneho (*Pseudomonas fluorescens* DR54) a hubového (*Clonostachys rosea* IK726) mikrobiálneho kontrolného činidla (MCA) na autochtónnu mikrobiotu v objemovej pôde

a rhizosfére jačmeňa a následne cukrovej repy. MCA boli zavedené inokuláciou osiva a pôdy. Počas rastu jačmeňa a cukrovej repy sa pravidelne odoberali vzorky objemovej a rhizosférickej pôdy. V pôde sa zisťoval osud MCA a rôzne vlastnosti pôvodnej pôdnej mikrobioty. Na konci pokusu (193 dní) sa DR54 a IK726 znížili 10<sup>6</sup>-násobne a IK726 20-násobne a DR54 vykazoval krátkodobý nárast rastu v rhizosfére cukrovej repy. Vo všeobecnosti boli necieľové účinky malé a prechodné. Zdá sa, že IK726 mal všeobecné stimulačné účinky na aktivitu pôdnych enzýmov a pôdnu mikrobiotu a viedol k významnému zvýšeniu suchej hmotnosti rastlín. Účinok DR54 na podporu rastu rastlín bol menej výrazný a DR54 vytlačila pôvodné pseudomonády. DR54 stimuloval rast prvokov s toleranciou na antifungálnu zlúčeninu viskozínamid produkovanú DR54. Ošetrovanie fungicídom Fungazil nemalo žiadny vplyv na rast rastlín ani na pôdne mikroorganizmy. Analýzou fosfolipidových mastných kyselín (PLFA) sa zistili poruchy štruktúry pôdneho mikrobiálneho spoločenstva pri ošetrovaní MCA, ako aj návrat k neporušeným podmienkam, ktoré odrážali pokles populácií inokulantu. Technika PLFA sa ukázala ako vhodná na monitorovanie *in situ* necieľových účinkov MCA na pôdnu mikrobiotu, ale mala by sa kombinovať s testami prežitia MCA a aktivity pôdnych enzýmov.

V pôdnom mikrokozme sa skúmala inhibícia rastu koreňového patogénu *Pythium ultimum* činiteľom bioovládania *Pseudomonas fluorescens* DR54 inokulovaným na semená cukrovej repy. Sledovalo sa vzchádzanie rastlín, kolonizácia rhizosféry baktériami, produkcia antibiotík a vplyv na rast húb. Inokulácia semien napadnutých *P. ultimum* baktériou *P. fluorescens* DR54 zlepšila vzchádzanie rastlín po 7 dňoch v porovnaní s kontrolou bez biokontrolného kmeňa. V tomto čase bola *P. fluorescens* DR54 dominantnou pseudomonádou tvoriacou kolónie v rhizosférických vzorkách pôdy z inokulovaných semenáčikov, čo sa preukázalo imunofarbením s kmeňovo špecifickou protilátkou. Vo vzorkách rhizosféry bolo možné detegovať viskozínamid, ktorý bol predtým identifikovaný ako hlavný antagonistický determinant produkovaný *P. fluorescens* DR54 a ukázalo sa, že vyvoláva fyziologické zmeny u *P. ultimum in vitro*. Vplyv *P. fluorescens* DR54 na rast a aktivitu *P. ultimum* sa skúmal priamou mikroskopiou po farbení vitálnymi fluorescenčnými farbivami Calcofluor white a fluoresceín diacetátom. *P. fluorescens* DR54 spôsobila zníženie hustoty mycélia *P. ultimum*, tvorby oospór a vnútrobunkovej aktivity. V prítomnosti *P. fluorescens* DR54 sa ďalej netvorili oospóry *Pythium*. Výrazný účinok na pôvodné huby tvoriace zoospóry sa pozoroval aj v mikrokozmoch s *P. fluorescens* DR54, a teda tam, kde bolo možné zistiť prítomnosť viskozínamidu; v takýchto mikrokozmoch s infekciou *P. ultimum* aj bez nej sa pozorovalo veľké množstvo encystovaných zoospór. Štúdie *in vitro* potvrdili, že purifikovaný viskozínamid indukuje encystáciu zoospór *Pythium*.

### 7.7.3 Mrkva

Choré semená mrkvy boli ošetrované vybranými mikroorganizmami izolovanými z pôdy, semien mrkvy a koreňov. Účinky týchto antagonistov na kontrolu *Alternaria radicina* sa hodnotili pomocou rastových testov na vodnom agare, filtračnom papieri, vermikulite a v substráte pre kvetináče. Percento klíčivosti, percento závažnosť ochorenia semien mrkvy ošetrovaných *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* č. 229 sa významne líšili od neošetrovaných semien a semien ošetrovaných inými antagonistami. Účinky *B. cepacia* č. 229 na podporu vzchádzania semien a kontrolu choroby boli



rovnako dobré ako účinky semien ošetrovaných iprodionom (100 ‰). Veľkosť lézií čiernej hniloby na koreňoch mrkvy sa výrazne zmenšila, keď boli korene ošetrované *B. cepacia* č. 229, alebo *Bacillus amyloliquefaciens* č. 224 v porovnaní s neošetrovanými koreňmi. Aj *B. cepacia* č. 229 významne znížila čiernu hnilobu na listoch mrkvy v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

#### 7.7.4 Cibuľa

*Bacillus subtilis* (B-2) v rhizosférach sadeníc cibule pestovaných z bakterizovaných semien v humusovej pôde pri rôznych režimoch pH, vlhkosti a teploty sa sledoval počas 14 týždňov. Bakterizácia semien významne zvýšila suchú hmotnosť výhonkov (12 – 94 %), suchú hmotnosť koreňov (13 – 100 %) a výšku výhonkov (12 – 40 %) sadeníc cibule v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Zvýšenie výšky a hmotnosti výhonkov bolo najväčšie pri nízkej teplote a vysokej vlhkosti, pri všetkých režimoch pH. Hmotnosť koreňov bola podobne ovplyvnená teplotou a vlhkosťou, ale výrazne sa zvýšilo pH 6,5 v porovnaní s 5,5 a 4,5. Hoci sa *B. subtilis* B-2 nepodarilo udržať vysokú populáciu v rhizosfére cibule, napriek tomu spôsobila významné rastové účinky na bakterizované sadenice cibule. Pozorované rastové účinky neboli úmerné rhizosférickým populáciám B-2.

*Bacillus amyloliquefaciens* BL-3 a *Paenibacillus polymyxa* BL-4 boli aplikované do rhizoplánu cibule pri presádzaní. BL-3 úplne potlačil krčkovú hnilobu cibule. Ďalej kmeň BL-3 produkoval tepelne stabilný antifungálny proteín, ktorý znižoval hnilobu bez ohľadu na úroveň inokula, alebo izolát testovaných patogénnych húb a bol účinný pri teplotách 10 – 30 °C.

#### 7.7.5 Zázvor

Zázvor kahilský (*Hedychium gardnerianum*) je invázna burina v tropických lesoch na Havaji a inde. Bakteriálne chradnutie spôsobené zázvorovým kmeňom *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* systémovo infikuje jedlý zázvor (*Zingiber officinale*) a okrasné zázvorníky (*Hedychium* spp.) a spôsobuje chradnutie infikovaných rastlín. Vhodnosť *R. solanacearum* ako biologického kontrolného činiteľa pre zázvor kahili sa skúmala inokuláciou sadeníc a zakorenených odrezkov pôvodných lesných rastlín, okrasných zázvorov a solanočných druhov s cieľom potvrdiť hostiteľskú špecifickosť. Po očkovaní injekciou do stonky, alebo poranení koreňa suspenziou baktérií a vody nasledovalo pozorovanie počas 8 týždňov. Inokulácie na *Hedychium gardnerianum* sa potom vykonali vo vlhkých lesoch ohia-lehua (*Metrosideros polymorpha*) v Havajskom národnom parku Volcanoes s cieľom určiť účinnosť baktérie v teréne. Počas štúdie sa u žiadneho z pôvodných lesných, alebo solanočných druhov nevyskytlo vädnutie ani iné príznaky. Baktéria spôsobila obmedzenú infekciu v blízkosti miesta inokulácie na *H. coronarium*, *Z. zerumbet*, *Heliconia latispatha* a *Musa sapientum*. Ani u jedného z týchto druhov sa však infekcia neprejavila systémovo a po objavení sa prvých príznakov sa obnovil normálny rast. U všetkých inokulovaných rastlín *H. gardnerianum* sa 3 – 4 týždne po inokulácii objavila ireverzibilná chloróza a silné vädnutie. Systémová infekcia spôsobila aj odumretie a rozpad odnoží. Väčšina rastlín úplne odumrela 16 – 20 týždňov po inokulácii. Deštruktívnosť zázvorového kmeňa *R. solanacearum* pre jedlý zázvor vyvolala otázky týkajúce sa jeho použitia na biologickú kontrolu. Keďže však miesta

napadnutia zázvoru kahili boli často vzdialené, riziko kontaminácie výsadiel jedlého zázvoru bolo nepravdepodobné. Schopnosť tejto baktérie spôsobiť závažné ochorenie u *H. gardnerianum* v teréne spolu s jej nedostatočnou virulenciou u iných druhov zázvoru prispeli k jej potenciálu ako biologického kontrolného činidla.

#### 7.7.6 Cesnak

Ošetrovaním strúčikov cesnaku tebukonazolom sa dosiahlo významné zníženie rýchlosti postupu choroby a konečného výskytu úhynu rastlín spôsobeného *Sclerotium cepivorum*; úroda cesnaku sa zlepšila. Naopak, nižšia úroveň kontroly choroby sa dosiahla pri aplikácii vybraných izolátov *Trichoderma harzianum* a *Bacillus subtilis* na pôdu a strúčiky.

Izolát *Pantoea agglomerans* S59-4 z rhizosféry, alebo rhizoplánu druhov *Allium* bol vybraný ako potenciálny biokontrolný činiteľ proti *Penicillium hirsutum* pri použití testu *in vivo* s poranenou cesnakovou cibulkou. Keď bola suspenzia spór ( $10^5$  spór.ml<sup>-1</sup>) *P. hirsutum* koinokulovaná bunkovou suspenziou izolátu *P. agglomerans* S59-4 ( $10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) na poranenom cesnaku, izolát vykazoval vysoko supresívny účinok na rozvoj choroby. Hustota baktérií *P. agglomerans* na poranených strúčikoch cesnaku sa kontinuálne zvyšovala pri izbovej teplote aj pri nízkej teplote až do 30 dní po aplikácii. Okrem toho *P. agglomerans* vykazoval *in vitro* inhibičné účinky proti rôznym pozberovým chorobám citrusových plodov, jabĺk, cibule, šalátov a mrkvy. Pa59-4 vykazoval silné inhibičné účinky najmä proti *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *Geotrichum candidum*.

### 7.8 Tropické hľuznaté plodiny

Tropické koreňové a hľuznaté plodiny sú dôležitou základnou potravinovou surovinou, ktorá predstavuje približne pätinu svetovej produkcie plodín. Medzi najdôležitejšie tropické koreňové a hľuzovité plodiny patria maniok, batát, kokos, sladké zemiaky, kolokázia (taro) a amorfofalus.

#### 7.8.1 Maniok

Z rastlín rastúcich v piatich rôznych ekosystémoch v Nigérii bolo izolovaných 40 izolátov fluorescenčných *Pseudomonas*. Tridsaťštyri z týchto izolátov inhibovalo *in vitro* *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, pôvodcu stonkovej hniloby manioku. Mesačné sadenice, vytvorené zakorenением výhonkov kultivaru v destilovanej vode, boli inokulované suspenziami ( $1,10^9$  buniek.ml<sup>-1</sup>) každého izolátu *Pseudomonas*. Inokulované rastliny boli bez príznakov koreňových patogénov a korene napučali skôr ako kontrolné rastliny. Mikrobiálne znehodnotenie objemných napučaných koreňov sa tiež znížilo až o 60 %, keď sa korene ponorili do bakteriálnej suspenzie ( $1,10^9$  buniek.ml<sup>-1</sup>) uvedených izolátov a skladovali sa 15 dní v polyetylénových vreckách. Taxonomické štúdie ukázali, že tieto bakteriálne izoláty boli buď *Pseudomonas putida* (90 %), alebo *P. fluorescens* (10 %).

Bakteriálna škvrnitosť manioku spôsobená baktériou *Xanthomonas campestris* pv. *manihot* je vážnym problémom v oblasti pestovania manioku v Nigérii. Na kontrolu tejto nákazy sa úspešne použilo niekoľko bakteriálnych antagonistov, ako sú *Bacillus*

*cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. a niektoré huby, ako *Trichoderma* spp. a *Glucadium* spp.

Šesťdesiatšedem endofytických baktérií izolovaných z manioku pestovaného brazílskymi amazonskými indiánskymi kmeňmi bolo podrobených sekvenovaniu 16S rRNA a analýze FAME (metylester mastných kyselín). Bakteriálny profil odhalil, že 25 % všetkých endofytických izolátov patrilo do rodu *Bacillus*. Izolát *B. pumilus* MAIIM4a vykazoval silnú inhibičnú aktivitu voči hubám *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* a *Sclerotium rolfsii* spôsobujúcim stonkovú hnilobu manioku. Sekundárne metabolity tohto kmeňa boli extrahované pomocou hexánu, dichlórmetánu a etylacetátu.

### 7.8.2 Yam biely

Listová škvrnitosť batátov (*Dioscorea cayennensis* Lam.), spôsobená *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, je jednou z najčastejších a najzávažnejších chorôb vo všetkých oblastiach pestovania batátov v severovýchodnej Brazílii. Choroba spôsobuje zníženie hmotnosti komerčných hlúz približne o 35 – 40 %. Z celkového počtu 162 bakteriálnych izolátov 39 vykazovalo antagonizmus voči patogénu. Baktérie produkovali extracelulárne, neprchavé a difúzne metabolity v membránovom celofánovom teste. Sedemnást' izolátov spôsobilo viac ako 75 % inhibíciu rastu mycélia *C. eragrostidis*. Najväčší antagonizmus z nich vykazoval IF-26. Izoláty IF-82, IF-88 a IF-109 inhibovali klíčenie konidií patogénu s priemernými úrovňami inhibície 99,2 %, 98,2 % a 96,2 %. V podmienkach zeleného domu boli antagonisti aplikované v troch rôznych časových intervaloch vzhľadom na inokuláciu *C. eragrostidis*: 3 dni pred, v rovnakom čase a 3 dni po. IF-82 a IF-88 aplikované v rovnakom čase ako inokulácia patogénu znížili závažnosť choroby na 75 %. IF-82 vykazoval najlepšiu perzistenciu antagonistického účinku s priemernou hodnotou 96,3 %. IF-82, identifikovaný ako *Bacillus subtilis*, bol v tejto štúdii najlepším činiteľom biologickej kontroly choroby škvrnitosti listov batátov.

Hnilobu hlúz a hlúz batátov môže spôsobovať široká škála húb vrátane *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium solani*, *Penicillium* spp., *Rhizopus stolonifer* a *Mucor* spp. Dvadsaťštyri rhizobaktérií batátov bolo testovaných na platniach zemiakového dextrózového agaru s výživnými látkami (PDA-NA) na antifungálnu aktivitu voči uvedeným hubám pomocou testu inhibičnej zóny. Najslubnejší bakteriálny antagonista bol ďalej testovaný proti 22 hubám z rôznych fylov. Antifungálnu aktivitu vykazovalo deväť izolátov rhizobaktérií, ktoré predstavovali 38 % všetkých pôvodne testovaných bakteriálnych izolátov. Všetky boli gramnegatívne tyčinky, kataláza pozitívne, aeróbne, endospóry tvoriace tyčinky a predbežne identifikované ako *Bacillus* spp.

*Bacillus subtilis* (Enrenberg) Cohn bol skúmaný z hľadiska jeho antagonistických vlastností voči povrchovej mykobiote skladovaných hlúz batátov (*Dioscorea rotundata* Poir). Hľuzy batátu inokulované suspenziou spór *B. subtilis* v zemiakovom dextrózovom bujóne pomocou ručného rozprašovača vykazovali počas 5-mesačného obdobia skladovania v tradičnej jamovej stodole drastické zníženie rozsahu a počtu mykobioty vrátane patogénov na povrchu hlúz v porovnaní s kontrolnými hľuzami. *B. subtilis* si však počas toho istého obdobia zachovala vysokú frekvenciu výskytu. *Botryodiplodia theobromae* Pat, *Fusarium moniliforme* Wollen

a Reink., *Penicillium sclerotigenum* Yamamoto a *Rhizoctonia* spp. boli na ošetrovaných hľuzách úplne vytlačené. Antagonizmus *B. subtilis* bol taký účinný, že normálna povrchová mykobiota hľúz sa výrazne znížila počas celého obdobia skladovania 5 mesiacov jednoduchou počiatočnou aplikáciou antagonistu. Biokontrolný potenciál *Bacillus subtilis* izolovaného z mikrobioty kravského hnoja sa skúmal *in vitro* a *in vivo* proti dvom poskladovým patogénnym hubám batátov, *Fusarium oxysporum* a *Botryodiplodia theobromae*. Kmene *B. subtilis* inhibovali rast *F. oxysporum* a *B. theobromae* *in vitro* v tekutom médiu v rozsahu 49,3 - 56,6 % a v pevnom médiu v rozsahu 31,0 - 36,0 % v porovnaní s príslušným rastom húb bez bakteriálnej inokulácie. Vzájomné pôsobenie medzi *B. subtilis* CM1 a *F. oxysporum* sa skúmalo aj pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie. Štúdia *in vivo* ukázala, že kmene *B. subtilis* inhibovali rast húb *F. oxysporum* a *B. theobromae* až do 83 % v ranných dutinách hľúz batátov. Rovnako tieto kmene blokovali produkciu kyseliny šťaveľovej produkovanej týmito patogénnymi hubami v hľuzách batátov, ako aj v kultivačnom médiu.

### 7.8.3 Cocoyam

Koreňová hniloba cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) spôsobená hubou *Pythium myriotylum* je najničivejšou chorobou tejto dôležitej tropickej hľuznatej plodiny so znížením úrody až o 90 %. *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 (divoký typ) produkovala fenazín-1-karboxylovú kyselinu a fenazín-1-karboxamid (oxychlororafín), zatiaľ čo jej tryptofán auxotrofný mutant FM13 bol fenazín negatívny a vylučoval antranilát *in vitro*. PNA1 a FM13 významne inhibovali rast *P. myriotylum* v duálnych kultúrach, zatiaľ čo ich supernatanty vysoko znižovali suchú hmotnosť mycélia v zemiakovom dextrózovom bujóne. Avšak v prítomnosti rastliniek získaných z tkanivovej kultúry kokovníka iba kmeň PNA1 výrazne znížil závažnosť ochorenia koreňovej hniloby. Pôdne experimenty s kmeňom *P. aeruginosa* PNA1 v porovnaní s mutantmi s nedostatkom fenazínu naznačili, že biokontrolná aktivita PNA1 proti *P. myriotylum* môže zahŕňať fenazíny. Účasť fenazínu bola ďalej posilnená skutočnosťou, že FM13 kŕmený exogénnym tryptofánom (takže produkcia fenazínu bola obnovená) výrazne znížil závažnosť ochorenia na cocoyam. Účinnosť PNA1 na kontrolu *P. myriotylum* na cocoyam sa výrazne zlepšila, keď sa kmeň a patogén nechali interagovať 24 hodín pred presadením cocoyam sadeníc, zatiaľ čo zdvojnásobenie hustoty inokula patogénu negatívne ovplyvnilo jeho účinnosť. *Pseudomonas* CMR5c a CMR12a boli identifikované ako nové a sľubné biokontrolné činitele *P. myriotylum* na cocoyam, ktoré produkujú arzenál antagonistických metabolitov. *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 sa považovala za sľubný biologický kontrolný prostriedok na riešenie narastajúceho problému koreňovej hniloby cocoyam v Kamerune.

### 7.8.4 Batáty

Endofytické baktérie spojené s rastlinami batátov (*Ipomoea batatas* L. Lam.) boli izolované, identifikované a testované na ich schopnosť viazať dusík, produkovať kyselinu indolactovú (IAA) a vykazovať toleranciu voči stresu. Identifikovalo sa jedenásť takýchto kmeňov patriacich do rodov *Enterobacter*, *Rahnella*, *Rhodanobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* a *Phyllobacterium*.

Z endofytov sladkých zemiakov boli zaznamenané aj iné bakteriálne druhy, ako *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* a *Pseudomonas*. Tieto baktérie boli spojené s aktivitou podporujúcou rast rastlín a biologickou kontrolou patogénov v batátoch.

Napriek tomu, že poznáme mechanizmy, ktorými bakteriálni antagonisti zabezpečujú odolnosť koreňových a hluzových plodín voči chorobám, ekologický význam ich prítomnosti ako endofytov, alebo epifytov a v rhizosfére a fylosfére je menej známy. Týmto faktorom je potrebné venovať dostatočnú pozornosť, aby bolo možné vyvinúť produkty biokontroly, ktoré by boli komerčne zaujímavé. Ďalej, väčšina štúdií o biologickej kontrole chorôb sa sústreďuje na zemiaky a cukrovú repu a veľmi málo pozornosti sa venuje iným hluznatým plodinám, najmä tropickým koreňovým plodinám, ako je maniok a batáty. Pri zvažovaní možných zlepšení v biologickej ochrane rastlín je potrebné skúmať formuláciu antagonistov, použitie takýchto formulácií pri obalovaní osiva a pri leteckom postreku a použitie zmesi antagonistov a v kombinácii so známymi a zavedenými prísadami posilňujúcimi biologickú kontrolu, ako sú  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ .

## 8 Fermentácia manioku v Latinskej Amerike: Fermentovaný škrob a múka

Fermentované potraviny z manioku majú v Afrike dlhú históriu. Konzumuje sa už desaťročia. Niektoré fermentované potraviny z manioku ako gari sú na kontinente značne rozšírené. Každá časť afrických komunít vyvinula vlastný postup fermentácie a používania manioku. Ubuswage, Imikembe, Ikivunde, Inyange, ivunde, Mokopa sú známe ako východoafrické fermentované potraviny z manioku, zatiaľ čo Chikwangué, Meduame-Mbong, cossette sú známe ako špecialita strednej Afriky. V západnej Afrike sa vyskytujú tieto fermentované potraviny z manioku: Gari, Attiéké, Placali, Lafun a efubo, Kokondé, Agbelima, Loi-loi, Attoupkou, Dumby, Abacha, Kapok pogari, Bêdêkouma. Medzi pridružené, alebo zúčastnené mikroorganizmy patria *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ako baktérie mliečneho kvasenia a *Bacillus*. Z kvasiniek a húb sa vyskytujú najmä *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ako kvasinky, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* ako huby. Biochemické zlúčeniny, ktoré vznikajú počas fermentácie, zahŕňajú foláty, niekoľko organických kyselín, prchavé organické zlúčeniny a iné zlúčeniny. Konzervovanie fermentovaných potravín z manioku, zvýšenie funkčnosti škrobu, zlepšenie arómy a chuti, zníženie obsahu antinutričných látok, ako aj zníženie obsahu kyanogénu, sú známe ako vplyv fermentačného procesu. Zdravotný prínos fermentovaných potravín z manioku sa týka ich výživovej hodnoty, probiotických vlastností a ich prínosu pre zvýšenie imunitného systému človeka. Fermentované potraviny z manioku sa stále vyrábajú remeselným spôsobom a neumožňujú štandardizáciu výživových hodnôt.

Maniok je potravinárska rastlina, ktorá bola prenesená z Nového sveta do tropickej Afriky, kde sa v súčasnosti rozšírila. Využívanie manioku ako potraviny pre americké spoločnosti sa začalo približne v 18. storočí pred Kristom. Maniok sa vo veľkom pestuje vo viacerých častiach sveta, najmä v tropických oblastiach, a tvorí významnú časť stravy obyvateľstva. V Afrike poskytuje v niektorých krajinách viac ako

50 % priemerného denného kalorického príjmu. V poslednom čase sa začalo niekoľko regionálnych programov na vyšľachtenie zlepšených odrôd manioku s cieľom zvýšiť úrodu a odolnosť voči chorobám, ktoré sú niekedy spojené s pôvodnými odrodami manioku. Na konzerváciu manioku po zbere sa používa niekoľko procesov vrátane fermentácie. Fermentácia je dodnes najobľúbenejším procesom zhodnocovania vedľajších produktov manioku. Zlepšuje konzerváciu potravín, ich výživovú hodnotu, hygienické a sanitárne vlastnosti, energetickú hustotu a organoleptické vlastnosti. Fermentované potraviny majú v Afrike dlhú históriu. Avšak absencia písomnej kultúry vo väčšine Afriky sťažuje ich pôvod. O fermentovaných potravinách z manioku v Afrike bolo napísaných niekoľko prehľadov, ktoré poukazujú na niektoré aspekty týchto potravín. Cieľom tohto prehľadu je zistiť vzťah medzi hlavnými fermentovanými potravinami z manioku v Afrike a vlastnosťami s nimi spojených mikroorganizmov, ich výživovou funkciou, bezpečnostnými hodnotami a zdravotnými prínosmi pre ľudskú výživu.

## **8.1 Hlavné technológie výroby fermentovaných potravín z manioku v Afrike**

### **8.1.1 Fermentované potraviny z manioku vo východnej Afrike**

#### **Ubuswage**

Ubuswage je jednou z hlavných fermentovaných potravín z manioku v Burundi. Pravdepodobne pochádza z južnej časti krajiny, kde bola lokalizovaná jej výroba. Ubuswage sa v súčasnosti vyrába aj v iných častiach krajiny. Ekvivalenty ubuswage v iných krajinách sú Chikwange v Kongu, Myondo a Bobolo v Kamerune, Mboung v Gabone a Mangbele v Stredoafrickej republike. Ďalšie podobné jedlá sa nachádzajú aj v Konžskom Brazaville, Soudane a Angole. Pri príprave Ubuswage sa z koreňov odstráni vlákna a maniokové korene sa potom olúpu a umyjú. Po uvarení sa vypustí voda z varenia a maniokové korene sa dezintegrujú, aby sa odstránili vlákna. Uvarený maniok sa po zbavení vlákien namočí na tri dni až dva týždne do vody. Voda na namáčanie sa mení každé dva dni. Po tomto období fermentácie sa voda vypustí a pridá sa čerstvá voda. Korene manioku sa podrobia druhému vareniu. Potom sa maniok nasype do koryta a za tepla sa roztláča, až kým nevznikne hustá hladká hmota. Želatínovaná manioková hmota sa zaokrúhli, vytvaruje a zabalí do listov skorocelu, ktoré sa predtým spálili. Trvanlivosť ubuswage sa pohybuje od siedmich do ôsmich dní. Závisí to od ročných období. Ubuswage má nízky obsah kyanidu, ale vyžaduje si viac práce pri spracovaní a príprave ako iné druhy manioku fermentované z manioku.

#### **Imikembe**

Imikembe je burundské fermentované jedlo z manioku. Korene manioku, ktoré sa používajú na prípravu imikembe, sa najprv olúpajú, umyjú a uvaria v hrnci. Vlákna sa potom odstráni rozpadnutím vareného manioku. Po odstránení vlákien sa maniok ošúpe, umyje a nakrája na kúsky. Tieto kúsky sa jeden deň sušia na slnku a potom sa štyri dni až týždeň namáčajú v zakrytej nádobe na fermentáciu. Počas procesu namáčania sa voda na fermentáciu mení každé dva dni. Získaný výrobok sa suší päť dní až týždeň. Konečný výrobok nazývaný Imikembe sa konzumuje s fazuľou a niektorými strukovinami.

## **Ikivunde**

Ikivunde je podobná fermentovaná potravina z manioku ako cossette z Konžskej demokratickej republiky. Ikivunde sa vyskytuje v Burundi a Rwande. Na výrobu ikivunde sa zvyčajne používajú lepšie odrody manioku. Korene manioku používané na prípravu ikivunde sa olúpajú, umyjú a nakrájajú na kúsky. Niektorí iní výrobcovia ho však nelúpu. Získané korene manioku sa namáčajú v prúde, alebo v stojatej vode najmenej tri dni až týždeň, aby sa nechali kvasiť, kým nezmäknú. Fermentované korene sa vyberú a potom sa sušia na slnku na rohožiach, stojanoch, alebo v strešných domčekoch. Proces sušenia môže trvať tri dni až jeden týždeň. Fermentované maniokové korene, cossette, sa rozdrvia a preosejú, aby sa získala fermentovaná múka nazývaná ikivunde.

## **Inyange**

Inyange je fermentovaná potravina z manioku, ktorá sa vyskytuje najmä v Burundi. Je v podstate výsledkom fermentácie húb. Korene manioku sa ošúpu, umyjú a nakrájajú na kúsky. Kúsky sa sušia jeden deň na slnku. Potom sa nahromadia na hromadu, prikryjú listami skorocelu, alebo slamou a nechajú sa päť dní kvasiť. Na konci fermentácie sú kúsky mäkké a pokryté hubami. Potom sa kúsky oškrabú, vysušia a roztlčú v drevenom hmoždiere s tĺčikom a potom sa preoseje, aby sa získala mierne tmavá múka: inyange. Inyange sa miešaním s vriacou vodou na miernom ohni spracuje na kašu nazývanú "dubugali". Zvyčajne sa konzumuje s omáčkou z listov manioku, –isombe" a mäsom. Zistilo sa, že inyange má vyššie nutričné hodnoty ako ikivunde, ale zachováva si viac antinutrientov.

## **Kivunde**

Kivunde je tradičné fermentované jedlo z manioku, ktoré sa vyrába a konzumuje v Tanzánii. Bol opísaný spontánny a kontrolovaný proces výroby kivunde. Korene manioku sa umyjú vodou, aby sa odstránili všetky nečistoty, a ošúpu sa, nakrájajú na kocky veľké približne 1 – 3 cm, ktoré sa zmiešajú. Korene manioku sa opäť umyjú prevarenou vodou. Potom sa korene podrobia procesu fermentácie, ktorý trvá rôzne dlho, od jedného dňa až po týždeň. Na konci procesu majú fermentované korene hladkú štruktúru a príjemnú ovocnú vôňu.

## **Mokopa**

Mokopa je fermentovaná potravina z manioku z Ugandy, ktorá sa spracováva najmä ako inyange. Korene manioku, ktoré sa používajú na výrobu mokopy, sa najprv olúpajú a nakrájajú na plátky. Potom sa sušia na povrchu jednu až dve hodiny, potom sa zhrnú na kopy a prikryjú slamou, alebo listami. Korene sa podrobia troj až štvordňovej fermentácii, až kým nezaplesnivujú. Fermentované a plesnivé korene sa opäť sušia na slnku, kým sa huby neodstránia. Spracované a vysušené kúsky sa potom melú na múku, mokopu, z ktorej sa v Ugande pripravuje fufu nazývané kowan. Rast húb na kúskoch koreňov zvyšuje obsah bielkovín v konečných produktoch tri až osemkrát. Tento proces fermentácie je veľmi obľúbený aj v iných častiach východnej Afriky, napríklad v Tanzánii, Rwande a Demokratickej republike Kongo.

## 8.1.2 Fermentované potraviny z manioku v strednej Afrike

### Chikwangue olebo maniokový chlieb

Chickwangue, alebo maniokový chlieb bâton de manioc je najobľúbenejšou spracovanou potravinou z manioku v Konžskej demokratickej republike. Pripravuje sa a oceňuje aj v mnohých krajinách strednej Afriky, ako je Kamerun, Gabon, Kongo Brazaville, Stredoafriická republika... Alternatívne názvy chikwangue v iných komunitách sú ntuka, bugali, kmonmogo, chawada, bobolo, myondo, mboung, mangbele. Korene manioku sa olúpajú a odstráni sa z nich šupka. Korene manioku sa potom namočia do vody a nechajú sa tri dni až dva týždne kvasiť, kým nezmäknú. Z dužiny sa odstránia vlákna, ktoré sa nahromadia na stojane na ďalšie kvasenie, alebo sa prikryjú listami a stlačia pomocou ťažkých predmetov, aby sa odčerpala prebytočná tekutina. Potom sa dužina rozdrví a preosieva, aby sa získala chuť, a roztlačí sa v hmoždiare. Jemná dužina sa varí v pare v hrncoch. Chickwangue je veľmi viskózna hmota, oveľa hustejšia ako fufu, ktorú si cenia vo viacerých krajinách..

### Fermentované varené korene, alebo Meduame-Mbong

Meduame-mbong, alebo fermentované varené korene manioku sú fermentované potraviny na báze manioku pochádzajúce z Kamerunu. Meduame-mbong sa konzumuje s mäsom, rybami, arašidmi a zelenými listami. Na prípravu meduame-mbong sa používajú umyté a na veľké kúsky nakrájané korene manioku. Nakrájané korene sa potom varia 30 minút až 1 hodinu. Po vypustení vody sa maniok opäť nakrája na malé kúsky a namočí sa do tečúcej vody na 12 hodín až 36 hodín.

### Fufu

Fufu je jedlo vyrobené z namočeného fermentovaného manioku. Fufu je obľúbené jedlo z manioku, ktoré sa vyskytuje vo viacerých afrických krajinách. Alternatívne názvy fufu sú fougou, fofoo, fulful, foutou, akpu, udep utim, farine, yakayeke, agbalima, water-fufu. Fufu sa tradične vyrába a predáva ako mokrý, pastovitý potravinový výrobok. Pri výrobe fufu sa postupuje podobne ako pri výrobe gari. Korene manioku sa ošúpu, umyjú, nakrájajú na hrubé kusy dlhé 20 cm a namočia do vody v hlinených nádobách, alebo v pomaly tečúcom potoku. Kvasenie trvá približne štyri až päť dní. Počas tohto obdobia korene manioku kvasia a mäknú, pričom sa do vody uvoľňuje HCN. Vzniká aj charakteristická chuť maniokovej múčky. Rozmôčené korene sa rozložia v čistej vode, prepasírujú sa a škrobové častice, ktoré prejdú sitom, sa nechajú usadiť približne 3 až 4 hodiny. Voda sa odleje a usadenina sa zabalí do plátenného vrečka, zaviaže sa, stlačí a vystaví silnému tlaku, aby sa z neho vytlačila prebytočná voda. Vzniknutá múčka sa zroluje do guľôčok a varí sa vo vriacej vode približne 30 až 40 minút. Uvarená hmota sa roztláka v hmoždieri s tĺčikom, aby sa získala pasta, fufu, ktorá sa môže konzumovať s omáčkou, polievkami, alebo duseným jedlom. Fufu sa spotrebiteľom predáva aj v mokrej forme v malých kusoch balených v plastových, alebo polypropylénových vrečkách, alebo v hotovej varenej forme. Guľôčky sa uvaria vo vode a vznikne mäkké cesto.



## **Fermentované korene manioku, alebo cossette**

Cossette sú sušené fermentované korene manioku. Cossette je jedným z najobľúbenejších výrobkov z manioku v Konžskej demokratickej republike. Cossette sa pripravuje namáčaním, alebo ponorením čerstvého manioku (najmä horkého) do prúdu, alebo do stacionárnej vody. Korene manioku sa namáčajú tri až šesť dní. Táto operácia tiež pomáha odstrániť toxický glykozid v horkých odrodách. Fermentované korene sa potom vyberú, olúpajú a sušia na slnku. V závislosti od počasia trvá sušenie na slnku dva až päť dní. Sušené korene manioku sa nazývajú cossette, ktoré sa roztlkajú a melú, aby sa získala fermentovaná manioková múka. Tento cossette sa tiež melie na múku, ktorá sa používa na výrobu druhotných výrobkov, ako sú šišky a koláče, ktoré sa získavajú smažením cesta vyrobeného z múky zmiešanej s pšeničnou múkou.

### **8.1.3 Fermentované potraviny z manioku v západnej Afrike**

#### **Gari**

Gari je čiastočne želatínovaná (pražením), sypká zrnitá múka s mierne fermentovanou príchuťou a kyslou chuťou. Gari sa v súčasnosti vyrába a konzumuje v západnej, strednej a východnej Afrike. Konzumuje sa buď namočený v studenej vode, alebo rozmiešaný vo vriacej vode, aby vznikla tuhá pasta, ktorá sa konzumuje s vybranými polievkami. Gari je žlté (ak je obohatené červeným palmovým olejom), alebo biele, hoci v súčasnosti získava na popularite gari z biofortifikovaného manioku. Sedemdesiat percent manioku spracovaného ako potravina pre ľudí je gari. Jeho široká spotreba sa pripisuje jeho relatívne dlhej trvanlivosti a jednoduchej príprave. Gari vyrábané v rámci subregiónu sa líši z hľadiska fyzikálnych, chemických a senzorických vlastností.

#### **Attiéké**

Attiéké je v podstate chuťovo výrazná škrobová potravina, ktorá sa vyrába z fermentovaného koreňa manioku a ktorú pôvodne pripravovali a konzumovali výlučne niektoré etnické skupiny z Pobrežia Slonoviny. V súčasnosti sa attiéké konzumuje v mnohých susedných krajinách, ako sú Burkina Faso, Bény, Togo, Mali a Senegal. Je to dusená zrnitá manioková múčka pripravená na konzumáciu, podobná kuskusu, s mierne kyslou chuťou a belavou farbou. Má mierne kyslú chuť a konzumuje sa s mliekom, alebo mäsom či zeleninou. Na výrobu attiéké sa korene manioku olúpajú, nakrájajú na kúsky, umyjú a nastrúhajú. Počas strúhania sa maniok zmieša s približne 10 % tradične pripraveného inokulátu a približne 0,1 % palmového oleja. Očkovacia látka sa pripravuje tak, že sa uvarené korene manioku skladujú tri dni v neumytom jutovom vreci, ktoré sa predtým použilo na prípravu očkovacej látky. Naočkovaná dužina sa fermentuje cez noc v zakrytých nádobách. Fermentácia zmäkčuje maniokovú kašu a dodáva jedlu charakteristickú chuť a štruktúru. Po fermentácii sa kaša naplní do vriec a niekoľko hodín sa lisuje. Vylisovaná dužina sa vyberie z vriec a pretlačí cez sito, aby sa získali granule, ktoré sa vysušia na slnku a potom sa očistia, aby sa odstránili vlákna a odpad. Z vysušených granúl sa v pare vyrába "attiéké", ktoré sa predáva v malých plastových vreckách ako potravina určená na konzumáciu. Rozdiel v procese a potom v charakteristike konečného výrobku sa líši podľa komunit, ktoré ho vyrábajú.

## **Placali**

Placali je fermentovaná potravina z manioku, ktorá zvyčajne pochádza z Pobrežia Slonoviny. Placali sa vždy konzumuje spravidla s oboma zdrojmi bielkovín (živočíšne aj rastlinné). Fermentovaná manioková múka je energizujúca potravina, určite vďaka vysokému obsahu sacharidov. Placali sa pripravuje z fermentovaného maniokového cesta. Korene manioku sa najprv ošúpu a umyjú. Potom sa dužina rozdrví a fermentuje. Získané maniokové cesto sa rozdrví, zriedí, precedí a postupne sa naleje do hrnca s horúcou vodou. Vplyvom tepla, ktoré vzniká pri ohni, škrob želatínuje. Stane sa lepkavým a potom stuhne. Na miesenie maniokovej hmoty sa zvyčajne používa špachtľa, aby sa získalo placali, krehká manioková hmota.

## **Lafun a efubo**

Lafun je ďalšia obľúbená fermentovaná potravina z manioku v západnej Afrike (Nigéria, Benin, Togo, Pobrežie Slonoviny). Lafun sa pripravuje namáčaním koreňov manioku počas troch dní. Korene sa nastrúhajú a nechajú sa vysušiť na slnku. Potom sa výrobok rozdrví na veľmi jemný prášok. Odhadované množstvo vriacej vody sa zmieša s odhadovaným množstvom múky lafun. Nechá sa variť a neustále sa otáča, aby sa zabránilo tvorbe hrudiek a pripáleniu.

Ďalšou fermentovanou maniokovou múkou podobnou fufu je efubo. Je to fermentovaná suchá múka z manioku, ktorá sa bežne konzumuje v západných štátoch Nigérie. Výroba zahŕňa lúpanie koreňov manioku, umývanie a krájanie na kúsky. Kusy sa namočia do vody v hrncoch, alebo na okrajoch potoka a nechajú sa tri až štyri dni kvasiť a zmäknúť. Po skončení fermentácie sa zmäknuté kúsky sušia dva dni na slnku, rozomelú a preoseje sa z nich "efubo". Výroba "Lafun" spočíva v namáčaní koreňov manioku, ktoré sa potom lúpu, odvodňujú, sušia na slnku, melú a preosievajú, čím sa získa "Lafun".

## **Kokondé**

Kokondé je známe aj ako Kokonte. Je to fermentované jedlo z manioku pochádzajúce z Pobrežia Slonoviny. Korene manioku sa najprv spracujú na fermentované lupienky olúpaním a niekoľko hodín sa namáčajú. Po pomletí sa kúsky umyjú a vysušia na slnku. Na sušenie sa používajú slamené strechy, alebo plech. Sušenie môže trvať niekoľko týždňov v závislosti od stavu slnečného svitu. Získané fermentované kúsky sa rozdrvia, pomelú a preoseje na múku. Múka sa uvarí na strelnú pastu. Kokondé sa konzumuje s omáčkou.

## **Agbelima**

Agbelima je obľúbená fermentovaná potravina z manioku v Ghane a na Pobreží Slonoviny. Používa sa aj ako surovina na prípravu širokej škály tradičných jedál a dá sa ľahko vyrábať vo väčších množstvách pri pomerne nízkych nákladoch. Pri výrobe agbelimy sa používa tradičný očkovací materiál, kudeme. Hlavným účelom používania tohto inokulátu je kysnutie a zlepšenie štruktúry, farby a chuti výrobku. Korene manioku používané na výrobu agbelimy sa olúpajú nožom a namáčajú vo vode na počiatočnú fermentáciu a potom sa rozomelú na kašu. Získaná strúhaná kaša sa naočkuje úmerným množstvom kudeme. Pasta z manioku sa nechá kvasiť do dvoch dní v polypropylénových vreciach bez akéhokoľvek vonkajšieho tlaku na vrecia. Potom sa

pasta vylisuje. Potom sa pasta vyberie z vriec, rozdrví sa, alebo sa rozdrví na granule a potom sa varí v pare.

### **Loi-loi**

Loi-loi je druh fufu, ktorý je obľúbený v riečnych štátoch Nigérie, najmä v štátoch Rivers, Cross River a Akwa Ibom. Spracovanie sa líši dochádza ku kvaseniu, ktoré vedie k rozvoju charakteristickej arómy. Príprava prebieha takto: korene manioku sa olúpajú, umyjú a namočia na dva dni do vody, aby čiastočne zmäkli a fermentovali. Potom sa korene rozomelú na kašu pomocou mlyna. Pasta sa zmieša s čerstvou studenou vodou a nechá sa jeden deň kvasiť. Na získanie surovej škrobovej suspenzie sa vykoná preosievanie. Tá sa vloží do plátenného vrecka a odvodní, čím sa získa škrob, ktorý sa môže rozptýliť v malom množstve studenej vody a miešať v horúcej vriacej vode, až kým nevznikne hladká pasta na výrobu pripraveného loiloi.

### **Attoupkou**

Attoupkou je obľúbené jedlo na juhovýchode Pobrežia Slonoviny. Korene manioku sa najprv olúpajú a nahrubo nakrájajú. Odstránia sa vlákna a potom sa hľuzy umyjú a rozdrvia, čím sa získa maniokové cesto. Získané maniokové cesto sa nechá počas noci fermentovať a vysušiť pod tlakom. Fermentované cesto sa preosieva a odvodňuje pomocou sita, aby sa odstránila časť vlákien. Parením v parnom hrnci sa získa lepkavý koláč, attoupkou, ktorý sa potom balí.

### **Dumby**

Dumby je v Libérii bežným tradičným jedlom. Z manioku sa odstráni šupka, hrubé stredové vlákna a kôra a uvarené hľuzy sa vložia do dreveného hmoždiera a roztlákajú sa ťažkým tláčikom. Keď sa hmota stáva homogénnou, tláčik vydáva hlasné praskanie, pretože hustne. Dumby sa zvyčajne konzumuje s polievkou pripravenou z rôznych druhov mäsa a zeleniny. V Libérii sa z manioku pripravuje dumby, ktoré sa pripravuje tak, že sa do polievky vložia uvarené korene manioku, ktoré sa po rozbití nakrájajú na kúsky a vložia do polievky doplnenej zeleninou. Toto jedlo sa používa na kŕmenie detí pre vysoký obsah bielkovín.

### **Abacha**

Abacha, alebo Akpu-mmiri označuje mokré maniokové lupienky, ktoré sa konzumujú ako obľúbený snack v juhovýchodnej Nigérii. Na prípravu abachy sa koreňové hľuzy manioku umyjú, olúpajú, varia vo vode približne 1 hodinu a nakrájajú na pozdĺžne plátky, alebo hranolčeky. Tieto lupienky sa namáčajú vo vode počas 2 dní, pričom voda sa môže raz, alebo dvakrát vymeniť. Na konci fermentácie (počas ktorej sa chuť lupienkov stáva takmer nevýraznou) sa lupienky nakoniec dvakrát, alebo trikrát premyjú čerstvou studenou vodou. Alternatívnym spôsobom dlhodobého skladovania je niekoľkodňové sušenie na slnku.

### **Kapok pogari**

Kapok pogari je nigérijské jedlo zo stredozápadu, ktoré je podobné príprave gariinu. Jediný rozdiel je v tom, že strúhaná a fermentovaná hmota sa pred pečením nepreosieva. Výsledný produkt má väčšie častice. Kapok pogari sa konzumuje s rybami, kokosom, alebo mäsom.

## Bêdêkouma

Bêdêkouman je fermentovaná potravina z manioku, ktorá sa pochádza z Pobrežia Slonoviny. Vyrába sa najmä v etnickej skupine Aboure N'zima v juhovýchodnej časti krajiny. Je to ako biely chlieb s veľkosťou 10 až 15 cm zabalený v listoch *Tomatococcus danielli*, ktoré sa miestne nazývajú "attiéké listy". Bêdêkouman sa môže skladovať pri izbovej teplote 4 dni. Na výrobu bêdêkouman sa fermentovaná manioková kaša uvarí, vylúpe a vytvaruje do *Tomatococcus danielli*. Konzumuje sa so zeleninou, rybami, alebo mäsom.

## 8.2 Mikroorganizmy súvisiace s fermentovanými potravinami z manioku v Afrike

Na fermentácii fermentovaných potravín z manioku sa podieľa niekoľko mikroorganizmov. Patria medzi ne baktérie mliečneho kvasenia, kmene *Bacillus*, kvasinky, huby a niektoré ďalšie organizmy. Hlavné mikroorganizmy, ktoré sa vyskytujú pri fermentácii manioku sú znázornené v tabuľke 8.1.

**Tabuľka 8.1.** Pridružené mikroorganizmy v manioku, najmä vo fermentovaných potravinách v Afrike

Fermentované potraviny z manioku	Baktérie mliečneho kvasenia a ďalšie baktérie	Kvasinky	Mikroskopické vláknité huby	Hlavný región, alebo krajina výroby
Gari	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus coagulans</i> ; <i>Bacillus species</i> ; <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Limosilactobacillus fermentum</i> ; <i>Levilactobacillus brevis</i> ; <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> ; <i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Leuconostoc</i> , <i>Alcaligenes</i> ; <i>Leuconostoc fallax</i> ; <i>Corynebacterium manihot</i> ; <i>Cornebacterium</i> spp., <i>Pseudomonas mesenteroides</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> ; <i>Corynebacterium</i> ; <i>Bacteriodes</i> spp.; <i>Actinomyces</i> spp.	<i>Saccharomyces fragilis</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Saccharomyces rouxii</i> ; <i>Geotrichum candidum</i>		Západná, stredná a východná Afrika
Koreň a listy	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ; <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> ; <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> ; <i>Weissella confuse</i> ; <i>Weissella paramesenteroides</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> ;			Nigéria

	<i>Enterococcus casseliflavus</i> ; <i>Pediococcus acidilactici</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amylolique</i> ; <i>Bbacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus pasteurii</i> , <i>Clostridium beijerinckii</i>		
Chikwangue	<i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Leuconostoc</i> spp.; <i>Lactococcus plantarum</i> ; <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Clostridium</i> spp.		Krajiny strednej Afriky
Fufu	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Levilactobacillus brevis</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Escherichia coli</i>		Západná a stredná Afrika
Lafun	<i>Klebsiella pneumonia</i> ; <i>Pantoea agglomerans</i> ; <i>Limosilactobacillus fermentum</i> ; <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Weissella confuse</i> ; <i>Corynebacterium</i> spp.; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Listeria</i> spp; <i>Corynebacterium</i> spp.;	<i>Pichia scutulata</i> ; <i>Pichia kudriavzevii</i> ; <i>Pichia rhodanensis</i> ; <i>Pichia scutulata</i> ; <i>Candida glabrata</i> ; <i>Candida tropicalis</i> ; <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Trichosporon asahii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i> ; <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Západná Afrika
Ogiri	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.	<i>Candida</i> spp., <i>Candida valida</i> ; <i>Candida holmii</i>	Nigéria
Attiéké	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Limosilactobacillus fermentum</i> ; <i>Levilactobacillus brevis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Weissella cibaria</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp., <i>Bacillus sphaericus</i> ; <i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus</i> ; <i>coagulans</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i> ; <i>Kloeckera japonica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Côte d'Ivoire, Faso Togo Burkina Mali Senegal Benin
Ikivunde	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ; <i>Levilactobacillus brevis</i> ; <i>Limosilactobacillus fermentum</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	Burundi, Rwanda

*Aspergillus oryzae*;

Iyanye			<i>Aspergillus fumigatus;</i> <i>Penicillium citrinum;</i> <i>Penicillium chrysogenum;</i> <i>Rhizopus stolonifera;</i> <i>Mucor</i> spp.	Burundi
Agbelima	<i>Levilactobacillus brevis;</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum;</i> <i>Ligilactobacillus salivarius;</i> <i>Limosilactobacillus fermentum;</i> <i>Leuconostoc mesenteroides;</i> <i>Bacillus subtilis;</i> <i>Bacillus</i> spp.	<i>Candida tropicalis;</i> <i>Candida krusei;</i> <i>Zygosaccharomyces</i> spp; <i>Zygosaccharomyces bailii;</i> <i>Geotrichum candidum;</i> <i>Rhizopus</i> spp.	<i>Penicillium selectiorum;</i> <i>Penicillium citrinum;</i> <i>Penicillium nodulum</i>	Côte d'Ivoire, Ghana, Togo
Akeyke	<i>Lactiplantibacillus plantarum;</i> <i>Ligilactobacillus salivarius;</i> <i>Levilactobacillus brevis;</i> <i>Limosilactobacillus fermentum;</i> <i>Leuconostoc mesenteroides;</i> <i>Bacillus subtilis;</i> <i>Bacillus licheniformis;</i> <i>Bacillus cereus;</i> <i>Bacillus pumilus;</i> <i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Zygosaccharomyces florentinus;</i> <i>Candida krusei;</i> <i>Geotrichum candidum;</i> <i>Candida tropicalis</i>		Ghana

## Biochemické zlúčeniny vznikajúce počas fermentácie manioku

### Prchavé organické zlúčeniny

Zmena arómy v podobe prchavých a chuťových zlúčenín, ktoré sa nachádzajú vo fermentovaných potravinách na báze afrického manioku, zahŕňa tieto molekuly:

**Aldehydy:** Propanal, 2-metylpropanal, butanal, 3-metylbutanal, 2-metylbutanal, pentanal, 2-ental, hexanal, 2-hexenal, heptanal, 2,4-hexadienal, 2-Heptenal, benzaldehyd, oktanal, 2,4-Heptadienal, furfuryl, 1,3 butándiol, etylacetát, izobutylacetát, fenyletylacetát, benzén acetaldehyd, 2-oktenal, 2-acetylpyrrolín, nonanal, 2-Nonenal, 2,4-Nonadienal, (2Z)-2-fenyl-2-buténal, 2,4-dekadial; Alkohol: (izoamilový alkohol), 2-metylbutanol, fenyletanol, etanol, 3-metyl-1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol;

**Alkány:** Pentán, hexán, heptán, oktán, 2-oktán, dekán, dodekán, tridekán, tetradekán;

**Ketóny:** Acetón, 2,3-butándión, 2-bután, 3-metyl-2-bután, 2-pentán, 2,3-pentándión, 3-hydroxy-2-bután, 2-heptán, 3-oktén-2-ón, 1-oktén-3-ón, 2-nonanón, L-karvón, undekán, mrtyl-onylcetón, piperitón, L-karvón, izo-mentón, mentón; zlúčeniny dusíka: pyridín, 2-etylpyridín, 2,5-dimetylpyrazín, trimetylpyrazín, tetrametylpyrazín, 1-piperidinkarboxaldehyd etyl-3-pyridinkarboxylát; terpény,  $\alpha$ -terpeniol,  $\beta$ -citronellol, guajakol, 1-3 butanodiol;

**Iné:** Myrcen, limonén, eukalyptol, para-cymen,  $\beta$ -ocimen, gama terpinén, 2, terpinen-4-ol, metyl salicylát, estragol, metyl tymol éter, lkarvón, citronellyl formiát.

## Organické kyseliny

Mikroorganizmy, ktoré sa podieľajú na fermentácii manioku, majú homolaktickú a heterolaktickú aktivitu. Proces výroby organických kyselín si vyžaduje počiatočné rozkladanie škrobu na cukry pred tým, ako tieto cukry fermentujú huby a mliečne baktérie.

Hlavné organické kyseliny syntetizované baktériami počas fermentácie manioku sú kyselina maslová, hexánová, oktánová, dekánová, nonánová, dehydrooctová, 2-metylpropánová, šťavelová, citrónová, vínná, jablčná, askorbová, mliečna, octová, fumarová, propiónová, karboxylová, hexánová, oktánová, nonánová.

## Vitamíny

Foláty, alebo vitamín B9 sú základnými kofaktormi pri biosyntéze nukleotidov. Sú preto kľúčové pre bunkovú replikáciu a rast. Rastliny, kvasinky a niektoré druhy baktérií vo fermentovaných potravinách obsahujú cestu biosyntézy folátov a produkujú prírodné foláty. Cicavcom však chýba schopnosť syntetizovať foláty, a preto sú odkázaní na ich dostatočný príjem zo stravy. Bolo identifikovaných niekoľko baktérií mliečneho kvasenia a kvasiniek, ktoré syntetizujú foláty (vitamín B9) v rôznom prostredí. Niektoré z nich boli izolované vo fermentovaných produktoch z manioku. Ide o *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *E. faecium*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Levilactobacillus brevis*, *Ligilactobacillus salivarius*, *S. cerevisiae*. Správny výber probiotických kmeňov produkujúcich foláty je potom stratégiou na vývoj nových funkčných fermentovaných potravín z manioku so zvýšenou výživovou hodnotou.

## 8.3 Úloha a funkcia fermentácie v potravinách z manioku

Kvasenie je metabolický proces, pri ktorom sa sacharidy menia na organické kyseliny. Je to potravinárska technológia používaná niekoľko storočí. Je cenená pre svoje mnohé výhody v potravinárstve. Fermentácia môže zvýšiť obsah bielkovín a vitamínov a zlepšiť rovnováhu esenciálnych aminokyselín. Fermentácia tiež zvyšuje obsah prchavých organických látok a znižuje obsah antinutričných látok.

### Zmena vône a chuti

Fermentácia robí fermentované potraviny z manioku chutnými, pretože zvyšuje ich arómu a chuť. Vďaka týmto organoleptickým vlastnostiam sú fermentované potraviny obľúbenejšie ako nefermentované, pokiaľ ide o ich prijatie spotrebiteľmi. Fermentácia je potom jedinečná v tom, že modifikuje nefermentovanú potravinu rôznymi spôsobmi, čo vedie k novým senzorickým vlastnostiam fermentovaného výrobku. Nie všetky baktérie a huby sú však prospešné pri zlepšovaní chuti potravín. Medzi aromatické a chuťové zlúčeniny, ktoré sa nachádzajú vo fermentovaných potravinách na báze afrického manioku, patria aldehydy, organické kyseliny, alkohol, alkány, terpény, ketóny, dusíkaté zlúčeniny a niektoré ďalšie zlúčeniny. Zložky arómy a chuti závisia od mikroorganizmov zapojených do fermentácie. V niektorých prípadoch môžu spôsobovať kazenie potravín, pretože ich enzýmy môžu viesť k tvorbe fermentačných digestov, ktoré majú nepríjemný zápach, alebo chuť, čím sa potraviny stávajú úplne nechutnými.

## **Fyzikálne a biologické vlastnosti**

Mnohé operačné jednotky fermentačných postupov zahŕňajú dlhodobé namáčanie hľúz vo vode. V mnohých prípadoch sa znížil obsah sušiny. Tento pokles možno pripísať čiastočnému zníženiu obsahu cukru a škrobu a úniku rozpustných zložiek. Okrem toho zmäknutie hľúz môže viesť k zvýšenej absorpcii vody, čo prispieva k zníženiu hmotnosti sušiny. Počas namáčania koreňov pri výrobe potravín z manioku dochádza k výraznej zmene štruktúry koreňov a korene sú mäkké. Obsah vlákniny vo fermentovaných hľúzach sa s časom fermentácie zvyšoval a tento účinok je jednotný pri všetkých odrodách manioku. Zvýšenie obsahu vlákniny je spôsobené pôsobením pektinolytických a celulolytických enzýmov produkovaných fermentujúcimi mikroorganizmami, ktoré rozkladajú bunkové membrány.

## **Konzervovanie fermentovaných potravín z manioku**

Konzervačná aktivita baktérií mliečneho kvasenia a ďalších pridružených mikroorganizmov v niektorých fermentovaných výrobkoch z manioku je jedným z hlavných dôvodov jeho fermentácie. Je to alternatívny problém pre skladovanie potravín z manioku v chudobných komunitách v afrických krajinách. Počas procesu fermentácie manioku vznikajú niektoré biochemické zlúčeniny, ako sú organické kyseliny, aldehydy, alkohol, peroxid vodíka a oxid uhličitý. Predpokladá sa, že antagonizmus baktérií mliečneho kvasenia voči patogénnym, alebo iným baktériám vyplýva z pôsobenia kyselín na cytoplazmatickú membránu baktérií, ktoré narúšajú udržiavanie membránového potenciálu a inhibujú aktívny transport, a môže byť sprostredkovaný disociovanou aj nedisociovanou kyselinou. Antimikrobiálna aktivita každej z nich nie je v korelácii s jej molárnou koncentráciou. Môže inhibovať kvasinky, huby a baktérie. Kyselina propiónová inhibuje huby a baktérie. Podiel aldehydu na aróme je väčší ako jeho biokonzervačné vlastnosti. Kumulácia peroxidu vodíka môže byť inhibičná pre niektoré mikroorganizmy. Táto inhibícia je sprostredkovaná silným oxidačným účinkom na membránové lipidy a bunkové proteíny. Oxid uhličitý, ktorý vzniká počas heterolaktického kvasenia, môže priamo vytvárať anaeróbne prostredie a je toxický pre niektoré aeróbne potravinárske mikroorganizmy, pretože pôsobí na bunkové membrány a má schopnosť znižovať vnútorné a vonkajšie pH. Vďaka týmto vlastnostiam prispievajú pridružené mikroorganizmy k inhibícii rastu patogénnych aj nepatogénnych mikroorganizmov vo fermentovaných potravinách z manioku. Prispievajú tak k jej biologickej konzervácii. Okrem toho niektoré asociované huby môžu výrazne znížiť obsah toxínov v potravinách.

## **Funkčné vlastnosti škrobu**

Funkčné vlastnosti škrobu získaného z fermentovaných hľúz, ktoré boli podrobené fermentácii, sú fermentáciou vždy zmenené. Testy pečenia s použitím sladkých, fermentovaných (20 až 30 dní) a kyselinou ošetrených škrobov ukázali, že kyslý škrob poskytol pečený výrobok s vynikajúcim objemom, alveolárnou voľnou štruktúrou striedky a tenkou chrumkavou kôrkou. Texturálne vlastnosti škrobových gélov z prirodzene fermentovaných a inokulom poskytnutých škrobov ukázali, že tvrdosť, gumovitosť a elasticita múčnych gélov sa vo fermentovaných výrobkoch znížila. Tvrdosť a gumovitosť gélu súviseli so stupňom napučania granúl aj s tvorbou siete vylúhovanej amylozy. Zníženie súdržnosti fermentovaných výrobkov sa vysvetľuje tým, že škrobové zrná neuvolňujú dostatočné množstvo amylozy. Zlepšenie



textúrnej kvality sa pripisuje aj produkcii organických kyselín, ktoré sa komplexujú s rozpustnou časťou amylozy. Štúdie funkčných vlastností kysnutého maniokového škrobu ukázali, že chemické zloženie sa fermentáciou výrazne nezmenilo, zatiaľ čo granulárna štruktúra bola podobná štruktúre, ktorá vznikla po krátkom období mierneho kysnutia. Predpokladalo sa, že CO<sub>2</sub>, kyselina mliečna a kyselina propiónová uvoľnené počas fermentačného kroku výroby kyslej manioky sa absorbovali do granulovaného škrobu a ich desorpcia počas varenia by bola ďalšou hnacou silou expanzie výsledného produktu. Ďalej sa predpokladalo, že rovnakú úlohu môže zohrávať aj odparovanie vody.

### **Zníženie obsahu antinutričných látok vo fermentovaných potravinách z manioku**

Fytáty a triesloviny sú dôležité antinutričné zlúčeniny, ktoré sa nachádzajú v koreňoch a listoch manioku, ako aj v iných hľuzách, koreňoch a strukovinách, ktoré rastliny využívajú na obranu. Fytáty (inozitol hexakisfosfát) sa v manioku vyskytujú vo veľkom množstve, v koreňoch je ich približne 624 mg.100 g<sup>-1</sup>. Kyselina fytová je schopná viazať katióny, ako je horčík, vápnik, železo, zinok a molybdén, a preto môže narúšať absorpciu a využitie minerálnych látok. Kyselina fytová môže tiež viazať bielkoviny, čím zabraňuje ich úplnému enzymatickému stráveniu. Kyseliny fytové však majú aj antioxidantné a antikarcinogénne vlastnosti. Kyseliny fytové totiž môžu znižovať tvorbu voľných iónových radikálov, a tým aj peroxidáciu membrán tým, že komplexujú železo, a fytáty môžu chrániť pred rakovinou hrubého čreva. Fytáty dokázali znížiť sérový cholesterol a triglyceridy na zvieracom modeli kŕmenom stravou obohatenou o cholesterol. Triesloviny ovplyvňujú výživovú hodnotu potravinových výrobkov tým, že vytvárajú komplex s bielkovinami (substrátom aj enzýmom), čím bránia tráveniu a vstrebávaniu. Viažu aj Fe, čím ho znepřístupňujú, a najnovšie dôkazy naznačujú, že kondenzované triesloviny môžu štiepiť DNA v prítomnosti iónov medi. To potom zvyšuje stav podvýživy ľudí, ktorí ju majú ako hlavnú potravinu. Fermentácia je jedným z postupov, ktoré sa používajú na zníženie obsahu trieslovín a fytátov v koreňoch a listoch manioku. Zistilo sa, že fermentácia do značnej miery znižuje obsah fytátov. Vplyv času fermentácie na zníženie obsahu fytátov a trieslovín je tiež zrejmý. Ich obsah vo fermentovaných potravinách závisí od použitých fermentačných techník. Zníženie obsahu fytátov vo fermentovaných potravinách z manioku je spôsobené enzymatickou aktivitou. Tento enzým môže byť prirodzene prítomný v manioku, alebo vylučovaný zúčastnenými mikroorganizmami. Enzým je schopný hydrolyzovať fytát v médiu a znižovať obsah fytátu vo fermentovaných potravinách z manioku. Zníženie fytátov je výraznejšie po 24 až 48 hodinách fermentácie a klesá po 48 hodinách. Pokles pH pravdepodobne prispieva k pomalému rozkladu fytátov po 48 hodinách fermentácie. Anorganický fosfát môže prispievať k inhibícii aktivity enzýmu fytázy vo fermentovaných cestách. Zistilo sa, že fermentácia je účinná aj pri znižovaní obsahu tanínu, ďalšieho dôležitého antinutričného faktora v manioku. Zníženie obsahu fytátov vo fermentovanom ceste sa pohybovalo od 20 % do 67 %. Na zníženie obsahu fytátov však môžu mať vplyv aj niektoré ďalšie operačné jednotky a procesy. Úroveň zníženia celkového obsahu fytátov v surových hľuzách bola 88,78 % v gari z manioku, 95,19 % v eba z manioku gari, 68,59 % v ampesi z manioku a 69,87 % vo fufu z manioku. Zistilo sa zníženie celkového obsahu fytátov v šupkách manioku o 705,1 - 789,7 mg.100 g<sup>-1</sup>. Zistilo sa významné zníženie obsahu trieslovín vo fermentovaných potravinách z manioku, ako je gari a múka. Obsah trieslovín v múke a gari z manioku

fermentovaných *Aspergillus niger* je v porovnaní s obvyklým obsahom trieslovín v maniokových hľuzách (0,4 - 0,5 %) značne nízky a v porovnaní s obsahom trieslovín v múke fermentovanej *Rhizopus oryzae* je priaznivý. Zistilo sa významné zníženie obsahu trieslovín, kyanidov, fytátov a oxalátov v pupuru, fermentovanej potravine z manioku v západnej Afrike, použitím štartovacej kultúry *Lactiplantibacillus plantarum* a *Candida famata*. Pupuru obsahovalo najmenej 0,05 mg.100g<sup>-1</sup> tanínu, 0,24 mg.100 g<sup>-1</sup> kyanidu, 102,4 mg.100 g<sup>-1</sup> fytátu a 2,94 mg.100 g<sup>-1</sup> oxalátu. Zistilo sa tiež, že antinutričný faktor (mg.100 g<sup>-1</sup>), taníny, fytáty, oxaláty a inhibítor trypsínu sa vo vzorkách manioku gari NR8082 znížili z 0,59, 301,21, 46,23 a 7,02 po 0 h na 0,41, 64,38, 13,56 a 1,52 po 120 h v uvedenom poradí.

### Zníženie obsahu kyanidov vo fermentovaných potravinách z manioku

Kyanid je najtoxickjším faktorom obmedzujúcim konzumáciu koreňov a listov manioku. Obsah kyanidu v niektorých odrodách manioku, najmä v horkom, je viac ako 10 mg ekvivalentu kyanidu/kg sušiny, uvádza FAO/WHO. Obsah kyanidu v listoch manioku je najvyšší ako v koreňoch manioku a pohyboval sa od 53 do 1300 mg ekvivalentov.kg DM<sup>-1</sup>. Kyanid je príčinou akútnej toxicity u ľudí. Zvyškový obsah kyanogénov v spracovanom manioku, ktoré existujú ako glukozid, kyanohydrín, alebo voľný kyanid, ktoré sú rovnako toxické ako ich materské zlúčeniny v tepelne neupravenej potravine Na detoxikáciu manioku sa používa niekoľko metód vrátane lúpania, strúhania, namáčania, varenia/varenia, silážovania, sušenia, fermentácie.

Fermentácia je jednou z najpoužívanejších metód pri spracovaní potravín. Výrazne znižuje obsah kyanidov vo fermentovaných potravinách z manioku, zlepšuje chuť a vôňu fermentovaných potravín a prispieva k biologickej konzervácii fermentovaných potravín. Zníženie obsahu kyanidov fermentáciou je spôsobené enzymatickou aktivitou pridružených mikroorganizmov pri fermentácii manioku. Úroveň redukcie sa potom mení v závislosti od času fermentácie a tiež od druhu mikroorganizmov vo fermentačnom médiu. *Neurospora sitophila* a *Geotrichum candidum* nehydrolyzovali významné množstvo linamarínu, zatiaľ čo *Bacillus* spp. hydrolyzoval prakticky všetok. *Mucor racemosus* hydrolyzoval najmenej 90 % linamarínu a *Rhizopus oryzae* 45 až 84 %. Kvantifikovala sa  $\alpha$ -glukozidázová aktivita v rozmedzí od 20 do  $\geq 40$  nmo.4 h<sup>-1</sup> pre *Lactiplantibacillus plantarum*, ktorý sa používal ako štrúdl'a na fermentáciu manioku. Získala sa redukcia kyanidu 95 % počas fermentácie manioku s použitím *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces* spp. a *Rhizopus* spp. ako štartovacej kultúry. Zistilo sa, že v pupuru a gari bolo 0,24 a 126,83 mg.100 g<sup>-1</sup> zvyškového obsahu kyanidu. Použité fermentačné techniky majú vplyv na redukciu kyanidov. Zistil sa obsah kyanidov 15,67, 13,29 a 12,67 mg.kg<sup>-1</sup> vo fufu pri použití tradičnej, soľnej a spätnej fermentácie. Ostatné fermentované potraviny z manioku majú výrazne znížený obsah kyanidov v porovnaní s koreňom manioku ako surovinou. Zistilo sa, že obsah kyanidov v tapiokových lupienkoch je 42 mg.kg<sup>-1</sup> a v tapiokovej múke <1 mg.kg<sup>-1</sup>, zatiaľ čo v placalli sa zistil obsah kyanidov 49 mg.kg<sup>-1</sup>, vo fufu maniok 50 mg.kg<sup>-1</sup> a v boule de manioc 3,1 mg.kg<sup>-1</sup>. Úroveň zníženia bola 50 % v attiéke a 30 % v attiéke garba. Pri laboratórnej analýze sa však zistila hladina kyanidov 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> v attiéke a 0 mg.kg<sup>-1</sup> v attiéke garba.

Na záver možno povedať, že africké komunity vyvinuli niekoľko postupov na výrobu sušených potravín z manioku. Fermentované potraviny z manioku sú niekedy podobné, len ich druhy a zložky sa líšia. Pri fermentácii manioku existuje

rozmanitosť pridružených mikroorganizmov. Tieto mikroorganizmy majú veľký podiel na chuti, vône, antinutrientoch a znížení obsahu kyanidov vo fermentovaných potravinách z manioku. Procesy fermentácie sú hlavným faktorom konzervovania fermentovaných potravín z manioku.

## 9 Choroby húb a ich manažment

Slovo huby je odvodené od francúzskeho slova Fungi (huby) a Mold (plesne). Huby sú makroskopické huby, ktoré majú charakteristické plodnice, ktoré môžu byť epigeické, alebo hypogénne. Hubám chýba chlorofyl. Nemôže si teda syntetizovať vlastnú potravu, takže je závislá na mŕtvych a rozkladajúcich sa materiáloch, ktoré využíva ako potravné materiály v rámci ektomykorízneho vzťahu. A má potenciál riešiť mnohé rastúce globálne problémy, ako je dopyt po potravinách, nezamestnanosť, znečistenie životného prostredia atď. V prírode existuje približne 2 000 druhov, ale asi 25 druhov je všeobecne akceptovaných ako potrava.

Kultivácia húb je pozoruhodný systém biologickej manipulácie, pri ktorom sa minimalizujú organizmy, ktoré sú s najväčšou pravdepodobnosťou škodlivé, a podporujú sa tie, ktoré sú prospešné. Vhodné médium, kompost, je konečným produktom zložitého, ale riadeného biologického procesu, na ktorom sa podieľajú baktérie, huby a aktinomycéty, ak je dobre pripravený; je to živý ekosystém, ktorý je vhodný na rast húb. Mycélium húb po zavedení do kompostu podstatne ovplyvňuje systém a rozvoj ostatných mikroorganizmov môže byť minimalizovaný konkurenciou a pravdepodobne antagonizmom. Kompost na huby však nie je selektívnym médium v prísnom zmysle slova a iné huby zavedené po ukončení kompostovania a pred vznikom húb môžu tiež dobre rásť často na úkor mycélia húb.

Huby sú zrejme bohatým zdrojom živín, najmä bielkovín, minerálov, vitamínov, ako aj bioaktívnych zložiek, ako sú fenolové zlúčeniny, terpény, steroidy a polysacharidy. Huby sú vynikajúcim zdrojom pre rastliny. Pestovanie húb sa môže okrem veľkého rozsahu vykonávať aj na chalupárskej a malej úrovni. Pestovanie húb je jedným z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich a technologicky najprepracovanejších záhradníckych odvetví na svete. Neobsahujú cholesterol a prakticky žiadny tuk ani sodík. Huby dodávajú vlákninu a sú dobrým zdrojom niekoľkých dôležitých vitamínov skupiny B, najmä niacínu a riboflavínu. Huby majú svoje liečivé aj jedlé vlastnosti. Jednotlivé druhy húb majú liečivé vlastnosti. Pomáhajú v boji proti cukrovke a rakovine. Vďaka vysokému pomeru draslíka a sodíka sú ideálne pre ľudí trpiacich srdcovými chorobami a hypertenziou. Je známe, že druhy húb majú širokú škálu metabolitov, ako sú protinádorové, antioxidantné, antigénne toxické, proti agregácii krvných doštičiek, antihyperglykemické, antimikrobiálne a antivírusové aktivity. V súčasnosti sa huby komerčne pestujú v uzavretom prostredí s kontrolovanou atmosférou, produkcia je preto do značnej miery nezávislá od prostredia. V priemyselne najrozvinutejších krajinách, t. j. v USA, Veľkej Británii, Číne, Holandsku a Francúzsku, je produkcia húb technologicky náročnejšia. Naopak, v rozvojových krajinách sa huby pestujú za polovedeckých podmienok (používanie čiastočne sterilizovaných médií a pôdy, používanie náradia, nádob atď., zriedkavo ošetrené formalínom atď.) s obmedzenými vstupmi. Ostatné biotické stresy, ako sú hmyz, baktérie, huby, vírusy a háďatká, spôsobujú veľké straty.

Prežívanie a rozmnožovanie húb súvisí s viacerými faktormi, ktoré môžu pôsobiť jednotlivo, alebo majú medzi sebou interaktívny účinok. Intenzívne pestovanie jedlých húb môže byť často ovplyvnené niektorými hubovými a bakteriálnymi chorobami, ktoré pomerne často spôsobujú dramatické straty produkcie. Tieto infekcie sú uľahčené osobitnými podmienkami, v ktorých sa pestovanie húb bežne vykonáva, ako sú vysoké teploty, vlhkosť, hladina oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) a prítomnosť škodcov. Z týchto dôvodov sa pestovatelia húb často stretávajú s bakteriálnymi a hubovými chorobami húb. Hoci sa pestovanie húb venuje čoraz viac komerčných fariem, pestovatelia čelia vážnym problémom spôsobeným rôznymi vírusovými infekciami. Hubové vírusy, konkrétne mykovírusy, vytrvalo infikujú taxonomické skupiny húb vrátane rastlín patogénnych húb a húb. Je známe, že infekcia spôsobuje len málo významných fenotypových účinkov na huby. Hoci starostlivé riadenie farmy a extrémna hygiena môžu zabrániť väčším útokom, niektoré choroby sa veľmi ťažko kontrolujú. Okrem toho kvalitu trvanlivosti vážne ovplyvňujú choroby, ktoré sú v čase zberu ešte bez príznakov.

Epidemiologické štúdie vykonávané odborníkmi na huby na celom svete budú užitočné pri určovaní najlepších metód šírenia a prenosu určitých infekcií na farme. Aby sa zabránilo hromadeniu patogénov na farme, budú potrebné prísne hygienické normy (dezinfekcia, varenie, namáčanie nôh, tesnenie dverí, filtre, kontrola múch), a to každý deň a pri každej plodnici. Vzhľadom na vysoké náklady a obmedzenia pri udeľovaní licencií na nové chemické látky, ako aj rastúce požiadavky spotrebiteľov a obchodníkov na zníženie používania pesticídov, bude nových zlúčenín málo. Keďže je k dispozícii menej pesticídov na zvládnutie prepuknutia chorôb v hubárskom priemysle a objavujú sa nové a meniace sa patogény, poľnohospodári budú čoraz viac závislí od rýchleho odhalenia a potlačenia prepuknutia chorôb ako prvej línie obrany. Hoci je pravdepodobnejšie, že biologické kontrolné prípravky budú akceptované, nemusia byť tak účinné ako tradičné chemikálie. Spoločné výskumné štúdie v krajinách, ktoré sú hlavnými producentmi húb, by mohli pripraviť pôdu pre identifikáciu a registráciu všetkých produktov, ktoré sa ukážu ako prospešné. Novozaložená celosvetová skupina pre diagnostiku húb chce zdieľať odborné poznatky o diagnostike chorôb húb a je skvelým miestom na prácu na medzinárodných projektoch spolupráce a šírenie informácií.

Okrem toho sa na tento účel testujú pôvodné rastliny v Brazílii, Číne, Indii a Spojených štátoch. Na to, aby sme mali dostatok surovín, ktoré sa budú používať na výrobu insekticídov na báze rastlín, bude takmer určite nevyhnutné rozšíriť plochu osiatych užitočných plodín. Okrem toho sa mnohé pôvodné rastliny nachádzajú v hojnom počte na dedinách, ale poľnohospodárom chýbajú informácie o vhodných postupoch zberu a skladovania. V záujme zníženia nákladov na aplikáciu pestovatelia často kombinujú chemické látky a rastlinné produkty. Štandardizácia alelochemikálií a komplikovaných extraktov je za takýchto okolností problematická. Podobne aj extrakcia, izolácia, syntéza a formulácia rastlinného materiálu je časovo a finančne náročná operácia. Nové prístupy na presnú a rýchlu kvantifikáciu alelochemikálií, alebo zachovanie noriem kvality môžu pomôcť zmierniť tento problém. Napríklad vysokoúčinná tenkovrstvová chromatografia je metóda, ktorá používa menej rozpúšťadiel a je účinnejšia ako iné postupy.

Počas pestovania húb boli zaznamenané rôzne dominantné kontaminanty. *Trichoderma harzianum*, *Coprinus* spp., *Aspergillus niger* a *Penicillium* spp. sa získali

počas inkubácie a kultivácie výtrusov hlivy ustricovej, *Pleurotus ostreatus*. Pri pestovaní húb sa vo všeobecnosti používajú dezinfekčné prostriedky, ako je chlór (bielidlo pre domácnosť) a aplikácia vybraných fungicídov, čo si vyžaduje značné náklady. Okrem toho používanie chemikálií pri pestovaní zanecháva nežiaduce rezíduá, z ktorých viaceré boli zakázané používať. Väčšina chemikálií, ktoré sú stále povolené, nedokázala primerane kontrolovať hlavné choroby húb, pretože sa u nás ľahko vyvoláva rezistencia. Preto je potrebné nájsť vhodné alternatívy.

### Druhy húb a choroby

Huby sú mäsité plodnice húb a patria k nim jedlé druhy rodu *Agaricus*, *Pleurotus* (hliva ustricová) a *Volvariella* (slamové huby). Vzhľad húb je veľmi variabilný v závislosti od štádia ich vývoja a odrody. Hríby *Agaricus* majú klobúk a stopku, pričom klobúk je bledosivej, alebo hnedej farby a v čase, keď nie je zrelý, je guľatejší, ale keď dosiahne zrelosť, sploští sa a môže dosiahnuť priemer 5 - 10 cm. Huby *Pleurotus* nemusia mať stopku a namiesto toho môžu byť bočne pripevnené k rastúcemu substrátu, ako je kôra stromu. Huby *Pleurotus* sú hladké a podlhovasté a môžu dosahovať priemer 4 - 5 cm. Huby *Volvariella* sú malé, s ružovými žiabrami a charakteristickým vreckovitým obalom (volva) na báze stonky. Klobúk môže dosahovať priemer 5 - 15 cm. Vyskytujú sa dva druhy chorôb húb; biotické, alebo infekčné choroby spôsobené hubami, baktériami, vírusmi atď. (Tabuľka 9.1) a abiotické, alebo neinfekčné choroby, alebo poruchy spôsobené faktormi prostredia.

**Tabuľka 9.1.** Zoznam infekčných ochorení húb a ich pôvodcovia

Ochorenie	Pôvodcovia ochorení
Hubové ochorenie	
Olivovo zelená pleseň	<i>Chaetomium olivaceum</i> a ďalšie species
Zelená pleseň	<i>Trichoderma aggressivum</i> <i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cephalosporium</i> spp., <i>Gliocladium</i> spp., <i>Papulospora</i> spp.
Čierna pleseň	<i>Scopulariopsis fimicola</i>
Biela pleseň	<i>Papulospora byssina</i>
Hnedá pleseň	<i>Sporendonema purpurascens</i>
Ružová pleseň	<i>Diehliomyces microsporus</i>
Falošná hľuzovka	<i>Peziza ostracoderma</i>
Škoricová pleseň	<i>Mycogone perniciosa</i>
Mokrý bubliny	<i>Cladobotryum dendroides</i>
Pavučina	<i>Trichothecium roseum</i>
Ružová pleseň	<i>Fusarium</i> spp.
Fusarium pleseň	<i>Cladobotryum dendroides</i>
Mäkká pleseň, alebo pavučina	<i>Coprinus lagopus</i> , <i>Coprinus comatus</i>
Atramentová čiapka	<i>Pseudobalsamia microspora</i>
Choroba hľuzoviek	<i>Lecanicillium fungicola</i>
Suché bubliny	<i>Chrysosporium luteum</i>
Mat	

Konfety	<i>Chrysosporium merdarium</i> (teleomorfa <i>Gymnoascus uncinatus</i> )
Sepedonium žltá pleseň	<i>Sepedonium niveum</i> (teleomorph <i>Hypomyces</i> spp.)
Huby chytajúce háďatka	<i>Arthrobotrys</i> spp.
Aphanocladium škvrnitosť	<i>Aphanocladium album</i>
Chlpatá stonka	<i>Mortierella bainieri</i>
<b>Bakteriálne ochorenia</b>	
Bakteriálna škvrnitosť	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
Mokrú škvrna/kyslá hniloba	<i>Bacillus</i> spp.
Múmie	<i>Pseudomonas tolaasii</i> <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Micromonospora</i> ,
Actinomycetes kolónie	<i>Thermomonospora</i> spp., <i>Thermomonospora chromogena</i> a iné
<b>Vírusové ochorenia</b>	
Hubový vírus X	Mushroom virus X (MVX)
La France	La France isometric virus (LIV)

## 9.1 Hubové ochorenia

Mikroorganizmy spôsobujú obrovské straty na komerčných hubárskych farmách na celom svete. Existujú rôzne konkurenčné huby a patogénne huby, ktoré rastú na rôznych druhoch húb, alebo ich infikujú. Medzi tie, ktoré sa vyskytujú najmä v komposte, patrí *Chaetomium olivaceum* a iné spp., *Coprinus* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. a *Trichoderma* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp., *Cephalosporium* spp., *Gliocladium* spp. a *Papulospora* spp.). Huby vyskytujúce sa v komposte a v pôde v obale sú: *Scopulariopsis fimicola*), *Papulospora byssina*, *Sporendonema purpurascens*, *Diehliomyces microsporus*. Huby, ktoré sa vyskytujú na pôde a/, alebo na rastúcich hubách a obklopujú ich, sú *Peziza ostracoderma*, *Mycogone perniciosa*, *Lecanicillium fungicola*, *Cladobotryum dendroides*, *Trichothecium roseum*. Choroba, pri ktorej huby napádajú telá plodov, sa označuje ako fuzáriová hniloba spôsobená hubami *Fusarium* spp. Niektoré hubové choroby, príznaky pôvodcov a ich manažment sú navrhnuté nižšie:

*Cladobotryum dendroides* je kauzálny organizmus. Príznaky: Na povrchu pôdy v plášti rastie nadýchaná, biela, pavučinovitá pleseň. Spočiatku je biela, ale neskôr sa mení na ružovú. Hlavnými zdrojmi infekcie sú pôda, vzduch, vlhký povrch a vysoká vlhkosť. Kontrola: Dobré vetranie a zabránenie nadmernej vlhkosti. PCNB (pentachlórnitrobenzén) 0,1 % a dithán Z-78 0,2 %.

**Hnedá forma:** Pôvodcom je *Papulospora byssina*. Príznak: Vyskytuje sa na orezávanom dreve, spočiatku zakalený biely vzhľad neskôr sa mení na hnedý. Pôvodne huba vyrastá v komposte. Príliš vlhký kompost, vysoká teplota (28 – 32 °C) počas plodenia a pestovanie pri teplote vyššej ako 18 °C podporujú infekciu. Kontrola: Udržujte vhodnú teplotu počas trenia a orezávania 2 % formalínu.

**Biela forma:** Príčinou je *Scopulariopsis fumaroles*. Príznaky: Spočiatku sa veľmi podobá na pleseň sádrovú, ale neskôr sa mení na ružový odtieň. Príliš veľa vody v anaeróbnom kompostovacom vrchole tepla vedie k rastu huby. Kontrola: Formalín 2 % a ditián Z-78 0,2 %.

**Olivovozelená pleseň:** *Chaetomium olivaceum* je pôvodca. Príznaky: Objavujú sa v komposte, alebo v truse pred vyliatím. Spočiatku biele a neskôr sa menia na olivovo zelené. Vedie k nemu nesprávna pasterizácia a nedostatočné vetranie. Kontrola: Teplota počas pasterizácie sa udržiava pod 60 °C. Postrek 0,2 % thiramu a 0,05 % kaptánu na podnosy.

**Atramentová čiapka:** *Coprinus lagopus* a *Coprinus comatus* je pôvodca. Príznaky: V komposte sa objavuje dlhá valcovitá stopka s malou tenkou čiapočkou, ktorá sa mení na čiernu atramentovú tekutinu. Kontrola: Zásobníky kompostu by sa mali zbaviť amoniaku. Opätovná pasterizácia zásobníkov s plodnicami pri teplote 60 °C počas 2 hodín a ich opätovná pasterizácia.

**Zelená pleseň:** *Trichoderma aggressivum* je pôvodca. Symptóm: Objavuje sa ako zelené škvrny na výtrusoch a obalovom materiáli. Huba rastie na odumretej rozloženej hmote a odumretom tkanive húb. Zodpovedná je aj nesprávna pasterizácia a vysoká vlhkosť. Kontrola: Postrek 0,05 % benlátu.

**Hľuzovkové ochorenie:** *Pseudobalsamia microspora* je pôvodca. Príznaky: Vzhľad: okrúhly, krémovo sfarbený a zvráskavený povrch, ktorý pripomína mozog. V čase zrelosti sa zmení na červenohnedý a uvoľní spóry. Vedie k nemu nedostatočné vetranie a vysoká vlhkosť. Kontrola: Vyhýbanie sa teplote <18 °C a vysokej vlhkosti vzduchu.

**Wet bubble diseases:** *Mycogone perniciosa* je pôvodca. Symptóm: Hustá biela rohož mycélia, ktorá vedie k zníženiu úrody. Opuchnutá stonka a zmenšená čiapočka v ranom štádiu. Vedie k tomu aj nepasterizovaný kompost. Kontrola: Sterilizované záhony 2 % formalínom. Spraydithane Z-78 0,2 % a benlát 0,05 %.

**Dry bubble or brown spot disease:** *Lecanicillium fungicola*, alebo *Verticillium psialliste* je pôvodca. Symptóm: Hnedá škvrna na klobúku, ktorá pri silnej infekcii vedie k nepravidelným škvrnám, ktoré deformujú hubu. Napadnuté huby sú kožovité. Kontrola: Dithane Z-78 0,2 % 3-krát v obale. Kontrola vysokej teploty v črievku a správneho vetrania.

**Mat:** Príčinou mat (vert de gris) je *Chrysosporium luteum*. Choroba sa vyskytuje často a straty v celom hubárskom priemysle nie sú známe. Straty na jednotlivých farmách však môžu byť pomerne veľké. Choroba Mat sa tiež nazýva vert de gris. Príznaky: Primordiá (kolíky) sa nevytvárajú v puzdre, a preto sa huby nevyvíjajú. Bavlnené, biele mycélium *C. luteum* sa môže zoskupiť do výraznej matnej vrstvy, ktorá sa nachádza medzi kompostom a obalom. Malé oválne konídie s veľkosťou 3,0 až 4,5 µm sú nepravidelne umiestnené na napučaných bunkách a na stopke sa môžu vytvárať

krátke reťazce dvoch, alebo troch konídií. Druh je závažnejší, ak sa ako obal použije minerálna pôda a nie rašelinový mach.)

**Confetti:** Pôvodcom konfet je *Chrysosporium merdarium* (teleomorfa *Gymnoascus uncinatus*). Choroba sa vyskytuje často s neznámou predikciou straty úrody. Príznaky: *C. merdarium* spôsobuje mycéliové rohože podobné konfetám, ktoré sú roztrúsené po celom komposte. Tieto malé rohože starnutím žltnú a môžu byť voľným okom ťažko viditeľné. Tento druh sa vyskytuje častejšie, ak sa ako obal používa minerálna pôda a nie rašelinový mach. Tvorba rohoží v komposte v prípade choroby konfet a na povrchu kompostu v prípade choroby rohoží odráža rastové štádium patogénu a jeho interakciu s mycéliom húb. Predpokladá sa, že sekundárne metabolity zasahujú do tvorby primordia húb. K prvotnému zamoreniu kompostu pravdepodobne dochádza zo zdrojov mimo hubárskych prevádzok, napríklad okolité polia sú zorané, alebo erodované vetrom. Napadnutý kompost môže byť tiež zdrojom veľkého množstva inokula. Kompost vystavený inokulu *Chrysosporium* pri jeho vzniku bude dôkladne zamorený a dôjde k stratám na úrode.

**Inokuly mat a confett,** ak sú prítomné v komposte, sa dajú zvládnuť len pasterizáciou (12 hodín pri 70 °C) pred odstránením kompostu z pestovateľských priestorov. Druhy rodu *Chrysosporium* sa kontrolujú ťažšie ako iné huby, preto je potrebné použiť vyššiu teplotu a dlhší čas pasterizácie. Inak je manažment chorôb založený na znižovaní počtu spór uvoľňovaných do ovzdušia v blízkosti rozmnožovacej prevádzky. V priestore neresu by sa mali používať vysokoúčinné filtre proti časticiam (HEPA) a pozitívny tlak vzduchu, aby sa minimalizovalo zamorenie kompostu.

**Žltá pleseň:** Pôvodcom je *Sepedonium niveum* (teleomorf *Hypomyces* spp.). Silné napadnutie žltou plesňou je spojené so stratou úrody plodín. Príznaky: Biela pleseň produkovaná *Sepedonium* sa v čase dozrievania mení na matne žltú až hnedú, ktorá konkuruje mycéliu huby. Bola zistená v spodných vrstvách tunelov pri metódach pasterizácie a úpravy vo veľkom. V kultúre je thallus v mladosti biely, potom sa mení na zlatožltý v substráte aj na ňom. Konídie sú veľké (13 až 17 µm), guľovité, hrubostenné a hrubostenné, svetložlté a vyrastajú jednotlivo na vrchole krátkeho konídióforu. Výtrusy *Sepedonium* prežívajú vrcholné horúčavy, pretože sú odolné voči vysokým teplotám a môžu sa ľahko šíriť do kompostu vzdušnými prúdmi počas plnenia a neresu, alebo počas neresu. Nevyčistený, alebo spotrebovaný kompost prilepený na záhony, alebo zásobníky môže túto starinu rozšíriť na plodiny.

**Postupy riadenia kultúry:** Žltým plesniam možno predchádzať starostlivým udržiavaním hygienického stavu a správnu filtráciou vzduchu. Potrebné je aj dôkladné monitorovanie v každej fáze výroby a pasterizácie po zbere.

**Huby chytajúce háďatká:** Pôvodcami infekcie sú *Arthrobotrys* spp. Príznaky: Pri vysokej populácii háďatiek sa na povrchu plášťa často vyskytujú povrchové, riedke, tenké, biele výrastky, ružové, alebo hnedé kolónie huby v závislosti od druhu prítomného na povrchu plášťa. Postihnutá oblasť môže mať priemer väčší ako 1 m. Táto huba zachytáva a živí sa voľne žijúcimi saprofytickými háďatkami (*Rhabditis*



spp.). Konidiofóry sú vzpriamené, vyrastajú zo substrátu, alebo z fascikulárnych vzdušných hýf a sú jednoduché, alebo rozvetvené. Vytvárajú apikálne zhluky dvojbunkových hyalinných konídií postupne na sympodiálnych vetvách. Keďže huba potrebuje na svoje prežitie háďatká, objavuje sa len v súvislosti s vrcholom zamorenia a zvyčajne ku koncu plodnice húb.

**Postupy riadenia kultúry:** Sanitácia a iné postupy, ktoré znižujú hromadenie saprofytických háďatiek v črevách, môžu pomôcť zabrániť rastu *Arthrobotrys* spp.

**Iné hubové ochorenia:** Ďalšie menej časté a nezvyčajné hubové choroby vrátane *Aphanocladium* škvrnitosť spôsobenej *Aphanocladium album*, pleseň spôsobená *Cephalosporium* spp., *Hormiactis* škvrnitosť spôsobenej *Hormiactis alba* a *Shaggy stípe* spôsobenej *Mortierella bainieri*. Tieto menej bežné hubové choroby príležitostne spôsobujú významné straty na výnosoch komerčnej produkcie húb.

Všeobecné postupy riadenia hubových chorôb:

Najlepšie a bežné prístupy v boji proti chorobám a environmentálne kontrolné opatrenia pre huby sú tieto:

- Všetky činnosti súvisiace s pestovaním húb by sa mali vždy vykonávať na novších plodinách pred staršími.
- Materiály skladujte na miestach, kde nedôjde k ich kontaminácii.
- Pred zalievaním, alebo zberom odstráňte všetky napadnuté huby. Na hubárskej farme venujte veľkú pozornosť zavlažovaniu a hospodáreniu s náradím.
- Nepremiestňujte dýzy, alebo hadice zo starých na nové plodnice, na ktorých rastú huby, pokiaľ neboli predtým dezinfikované.
- Používajte len nové, alebo vydezinfikované zberné boxy, ktoré neboli znečistené kontaminovanými plodnicami.
- Nepreťahujte cyklus zberu plodníc dlhšie, ako je potrebné.
- Po skončení cyklu plodníc hubovú farmu dôkladne vyčistite a vydezinfikujte.

## 9.2 Bakteriálne ochorenia

Celosvetový prieskum ukázal, že zástupcovia všetkých hlavných komerčne významných rodov jedlých húb, *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Flammulina*, *Volvariella* a *Auricularia*, sú postihnutí bakteriálnymi chorobami. Pseudomonády sú pôvodcami vo väčšine prípadov a straty na plodniciach sa zvyšujú s používaním intenzívnejších metód pestovania. Pestovaná huba *Agaricus bisporus* je najcennejšou chránenou plodinou pestovanou v Spojenom kráľovstve. Straty spôsobené skazou spôsobenou bakteriálnou škvrnitosťou (*Pseudomonas tolaasii*) sa odhadujú na 5 – 10 % z celkového množstva vypestovaných húb, pričom približne o ďalších 10 % sa znižuje ich trhovú hodnotu.

**Hnedá škvrnitosť:** Ochorenie spôsobuje *Pseudomonas tolaasii*. Hnedá škvrnitosť je najčastejšou bakteriálnou chorobou komerčných húb a každoročne spôsobuje značné hospodárske straty v dôsledku zníženia kvality. Príznaky: Najčastejšie pozorované príznaky sú bledožlté plochy, alebo škvrny na klobúku, ktoré sa neskôr zmenia

na zlatožlté, žltohnedé, alebo čokoládovo hnedé. Postihnutá môže byť aj stopka (stonka). Príležitostne majú klobúky celkovo mdlú farbu a po zbere sa rýchlo zhoršuje ich kvalita a farba. Príznaky sa častejšie vyskytujú na hubách, ktoré zostávajú dlho mokré, a na miestach, kde sa navzájom dotýkajú. Príznaky sa môžu zamieňať s príznakmi iných chorôb, ako je napríklad verticiliová škvrnitosť. Hlavným zdrojom infekcie je infekcia v pôde a oddelene prostredníctvom mušiek, mali by tu byť roztoče.

**Manažment kultúry:** Najlepším postupom na zvládnutie hnedej škvrnitosti je manipulácia s rastovým prostredím. Vysoká relatívna vlhkosť a povrchová vlhkosť podporujú prejav symptómov choroby. Škvrnitosť sa môže ľahko rozvinúť, ak huby zostanú vlhké dlhšie ako dve až tri hodiny. Zalievanie a následné dodatočné vetranie pomôže pri vysychaní. Udržiavanie stabilného rozdielu 1 až 1,5 °C medzi údajmi o vlhkom a suchom teplomere zníži možnosť kondenzácie a výrazne obmedzí výskyt škvrn. Úroda by sa nemala zalievať v po sebe nasledujúcich dňoch a pestovatelia by sa mali vyhnúť zalievaniu húb, ktoré sú v priebehu jedného, alebo dvoch dní pred zberom.

**Chemická kontrola:** Používanie chlóranej vody môže znížiť počet baktérií na povrchu húb, a tým znížiť množstvo škvrn, hoci samotný chlór na vyliečenie tejto choroby nestačí. Použitie chlóru môže negovať účinnosť fungicidov, ktoré boli predtým aplikované na povrch čreva, prostredníctvom procesu chemickej inaktivácie. Na zníženie závažnosti bakteriálnej škvrnitosti sú dôležité odporúčané postupy zavlažovania a správna regulácia vlhkosti.

**Kyslá hniloba:** *Bacillus* spp. tepelne odolné endospory. Príznak: matný sivý až slizovitý hnedastý sliz, ktorý sa vyznačuje silným, ale nepríjemným zápachom, ktorý sa rôzne opisuje ako zápach po hniúcich jablkách, špinavých ponožkách, alebo spálenej slanine. Manažment: Namáčanie zrna pri izbovej teplote 12 – 24 hodín pred sterilizáciou.

**Múmia:** Predpokladá sa, že patogén je fluorescenčná pseudomonáda, blízka *Pseudomonas tolaasii*. Múčnatka sa často vyskytuje v plodniciach húb; údaje o ročných hospodárskych stratách však nie sú k dispozícii, pretože strata sa zvyčajne týka len časti každej komory na pestovanie húb. Príznaky - nie je známy žiadny vplyv tejto choroby na plodnice, alebo priebeh puzdier, ale po začatí plodenia sa objavia príznaky. Prvým príznakom môže byť oneskorený prvý zlom. Huby postihnuté chorobou múmie sa vyznačujú zakrivenými stopkami s naklonenými klobúčikmi. Na báze stonky sú rhizomory vláknité a priliehajú k puzdru. Základňa je často napuchnutá a pokrytá nadýchaným porastom mycélia. Pri zbere sa na báze drží veľké množstvo obalu. Napadnuté huby odumierajú, vysychajú a sú tvrdé a kožovité. Zberači môžu chorobu často zistiť podľa tvrdého pocitu na stopkách pri rezaní. Vnútorne tkanivo stonky má často pozdĺžne hnedé pruhy, alebo je zafarbené a pri priečnom reze sú viditeľné drobné hnedé škvrny.

## **Manažment ochorenia múmie**

**Monitoring:** Po pasterizácii kompostu vo fáze II by sa mala skontrolovať vlhkosť kompostu. Vlhké miesta na povrchu kompostu v čase obalov, alebo miesta, kde obaly rýchlo vysychajú, by sa mali dôkladne preskúmať na prítomnosť choroby.

**Manažment kultúry:** Po identifikácii múmie by sa mali choré plochy oddeliť od neinfikovaných tak, že sa úplne odstráni kompost aspoň 1,5 m po oboch stranách postihnutej plochy na šírku 20 cm a zakryjú sa igelitom. Na konci zberu by sa mal kompost dôkladne pasterizovať. Siete a regály by sa mali pred opätovným použitím starostlivo vyčistiť a dezinfikovať.

**Chemická kontrola:** Napadnuté siete a regály by sa mali ošetriť roztokom formalínu, alebo hydratovaným vápnom.

**Aktinomycetové plesne:** Komposty sú už dlho známe ako dôležité zdroje aktinomycét a čoskoro sa zistilo, že mnohé druhy v týchto materiáloch sú termofilné a schopné rásť pri teplotách do 65-70 °C. Takéto vysoké teploty sú dôsledkom silnej mikrobiálnej aktivity, ktorá je možná pri dostatku vody, živín a kyslíka, pričom sa energia uvoľňuje ich dýchaním rýchlejšie, ako sa môže rozptýliť. Kompost na huby sa zvyčajne pripravuje špecializovaným dvojfázovým procesom, ktorý zahŕňa umelé zahrievanie počas druhej fázy. Mikrobiológia tohto procesu však bola preskúmaná dôkladnejšie ako kompostovanie iných materiálov a v tomto príspevku sa použije ako základ pre diskusiu o výskyte a úlohe aktinomycét v kompostoch. Všeobecné aktinomycéty nájdené v komposte sú *Thermoactinomyces* (biela, žltá kolónia), *Micromonospora* (oranžovo-čierna kolónia), *Promicromonospora* (žltá kolónia), *Thermomonospora* spp. a *T. chromogena* (biela kolónia), *Saccharomonospora* (modrá, zelená, fialová, *Saccharopolyspora* (biela, ružová, hnedosivá kolónia), *Microtetraspora* (modrošedá, krémová, sivá, ružová, fialová, žltá, biela kolónia), *Actinomadura* (biela, žltá, ružová, modrá, zelená, sivá kolónia), *Nocardiosis* (biela až žltosivá kolónia), *Saccharothrix* (žltobiela, žltosivá kolónia), *Nocardia* (biela, ružová kolónia), *Pseudonocardia* (biela kolónia), *Thermocrispum* (biela kolónia), *Amycolatopsis* (biela kolónia) a *Streptomyces* (biela, žltá, zelená, sivá, modrá, ružová, červená, fialová kolónia). Komposty z odpadových vôd obsahujú niekoľko izolátov vrátane *Nocardia*, *Saccharopolyspora* a *Saccharomonospora* spp. a *Streptomyces* spp. a termofilných megaspor Stm. *Macrosporus*, Stm. *Thermolineatus*, *Promicromonospora citrea* a *Thermoactinomyces vulgaris*.

**Kontrola aktinomycét:** Preto môžu byť potrebné hygienické postupy a opatrenia na kontrolu prašnosti, alebo uzavretie kompostovacích zariadení. Pracovníci by mali byť vždy plne chránení pred vdýchnutím a kontamináciou aktinomycétami.

## **Manažment bakteriálnych ochorení**

Najlepšie a bežné prístupy k boju proti chorobám a environmentálnym opatreniam na kontrolu húb sú tieto:

Najlepšími prístupmi v boji proti chorobám je dodržiavanie prísnych opatrení na kontrolu čistoty a životného prostredia:

- Utrite povrch kultúry od všetkých karpofórov.
- Zvýšiť odparovanie z povrchu kultúry a povrchu karpofórov.

- Pri kompostovaní sa vyhýbajte nízkym teplotám.
- Odstráňte všetky zvyšky vody na povrchu plodníc.
- Po zavlažovaní spustíte 2-hodinový cyklus sušenia.
- Udržiavajte presnú kontrolu teploty, aby sa nedosiahol rosný bod. Treba sa vyhýbať teplotným výkyvom.
- Zabráňte zaplavovaniu materiálu puzdra počas cyklu zberu.
- Všetky nástroje udržiavajte v čistom prostredí.

### 9.3 Vírusové ochorenia

Je známe, že mnohé huby obsahujú častice, ktoré sú veľmi podobné časticiam rastlinných vírusov. Existuje pomerne málo prípadov, keď je ich prítomnosť spojená s príznakmi ochorenia, pričom *Agaricus bisporus* je jedným z mála. Nie je známy žiadny prenášač hubových vírusov. Rôzne ochorenia ako La France, hnedá choroba a vodnatý pruh, choroba X, choroba odumierania. Príznaky: huby sú vyschnuté, kožovité a hnedo sfarbené. Vo vlhkých podmienkach sa pruh stáva vodnatým a sivým. Krémové a bezfarebné huby trpia menej ako čistá odroda. La France vírusová choroba X choroba húb. Manažment vírusových ochorení je potrebné znížiť, alebo odstrániť schopnosť vírusu dostať sa do čerstvých plodníc v akomkoľvek štádiu, či už prostredníctvom spór, alebo úlomkov kontaminovaného mycélia. Povrchy, stroje a oblečenie pracovníkov by sa mali čistiť a dezinfikovať ako súčasť hygienického programu.

Na zvládnutie vírusových ochorení by sa mali prijať nasledujúce opatrenia.

- Je potrebný prísny hygienický, alebo sanitačný program.
- Zvýšte tlak v oblasti neresu.
- Pohyb pracovníkov v oblasti neresu by sa mal obmedziť.
- Chorým hubám sa nesmie dovoliť, aby sa otvorili a uvoľnili svoje spóry, pretože spóry sú hlavným prenášačom vírusov.
- Ventilačné systémy musia byť tesné a nesmú vytvárať podtlak a nasávať spóry za filtrom na zachytenie spór 5 až 7 hodín v hubárni.
- Pred uvoľnením spór zbierajte nezrelé karpofóry.
- Pred použitím sa musí každé zariadenie v kompostárni vyčistiť a vydezinfikovať.
- Rozbitie mycélia a jeho premiestnenie vo vrstve obalu pomocou techniky rozrušovania obalu.
- Obalové materiály sa musia udržiavať v čistom prostredí.
- Dôkladné vyvarenie plodín (ošetrenie parou).
- Počas inkubačnej fázy umiestnite na povrch substrátu listy papiera, alebo plastu, aby spóry nepadali na kompost.
- Pred použitím opakovane použiteľných plastových nádob sa uistite, že sú čisté.
- Výmena kmeňov výtrusov, alebo striedanie odrôd, ktoré neanastomujú, minimalizuje úroveň inokulácie vírusov.
- *Agaricus bitorquis* je údajne tolerantný voči vírusovým ochoreniam.
- Je potrebné vyhnúť sa preprave a skladovaniu huby v tej istej chladničke.

- Spoločné vybavenie medzi farmami, alebo prepravné/skladovacie nádoby by sa mali pred použitím dezinfikovať. – Účinné je vyhrievanie pestovateľskej miestnosti + zásobníka a kompostu na 70 °C počas 12 hodín.
- Ošetrovanie zásobníka 4 % pentachlórfenátom sodným, 0,5 – 1 % roztokom sódy.
- Dezinfekcia dverí, podlahy a stien 4 % formaldehydom.

### **Neinfekčné ochorenia**

Odchýlky v parametroch prostredia od optimálnych požiadaviek môžu u húb spôsobiť mnohé abnormality. Veľký počet abiotických faktorov vytvára nepriaznivé prostredie pre správny rast húb, čo vedie ku kvantitatívnym aj kvalitatívnym stratám. Medzi tieto abiotické faktory patrí nízka, alebo vysoká vlhkosť substrátu, pH a teplota, koncentrácia CO<sub>2</sub> v miestnosti, rýchlosť vetra, výpary a relatívna vlhkosť. Mnohé z týchto faktorov spôsobujú, že substrát nie je selektívny pre mycélium húb a podporuje iné plesne a škodcov, zatiaľ čo niektoré z nich bránia normálnej produkcii húb. V celosvetovej produkcii húb sa pomerne často vyskytujú tieto abiotické poruchy. Popraskané huby: Je známa aj ako deformovaná huba. Kolísanie vlhkosti a teploty vedie k praskaniu húb.

**Flock** je fyziologicky vyvolaná deformácia klobúka a žiabrového tkaniva huby. Klobúčik sa predčasne otvára a žiabre postihnutých húb sú rudimentárne, slabo vyvinuté a málo pigmentované. Pri pohľade zhora sa postihnuté huby javia normálne. Pri pohľade zdola sú však otvorené a chýba im závoj. Žiabre sú ružové, alebo často biele. Niekedy sú žiabre deformované a pripomínajú žiabre mnohobunkovcov. Čiapočka je tvrdá a krehká. Mycélium dobre prerastá cez kompost a obal. Prvý zlom je oneskorený a čas medzi zlomami sa predlžuje. Tento stav sa vyskytuje počas celej plodiny. Produkcia húb sa môže znížiť až na 20 % normálnej úrody.

**Manažment kultúry:** Pestovatelia by mali dodržiavať postupy odporúčané na udržiavanie plodníc a rast húb.

**Otvorený závoj:** Zalievanie pred zberom môže spôsobiť predčasné otvorenie húb. Často sa to stáva, keď boli huby pod stresom z vody a nasledovalo výdatné zalievanie. Teplotné výkyvy môžu tiež spôsobiť otvorenie závoja, ako aj nadmerné množstvo oxidu uhličitého počas zberu. Príznaky: Klobúčik sa predčasne otvorí a žiabre sú plne vyvinuté a hnedo pigmentované. Niekedy je čiapočka neúmerne menšia ako stonka. Otvorený závoj môže byť niekedy príznakom vírusového ochorenia.

**Manažment kultúry:** Vo všeobecnosti sa dá otvorenému závoju predísť udržiavaním vhodných pestovateľských podmienok a nevystavovaním plodiny stresu.

### **Stroma**

Stroma sú nápadné zoskupenia hubového mycélia na povrchu vyplaveného kompostu puzdra. Súvisia s genetickými vlastnosťami kmeňa huby. Môže k nim dôjsť v dôsledku použitia staršej opakovane rozmnoženej huby. Pre niektoré kmene je to charakteristické, že sa vyskytujú častejšie ako iné. Tieto príznaky môžu spôsobiť aj zmeny vlhkosti a vlhkosti. Nadmerné množstvo CO<sub>2</sub>, vysoký obsah vody v komposte

a predĺžené obdobie výteru môžu tiež spôsobiť stroma. Niekoľko sektorov neovplyvní negatívne úrodu, ale prítomnosť nadmerného množstva stromy môže znížiť úrodu. Stroma sa však môže zvýrazniť nesprávnym zaobchádzaním s výterom pri preprave, skladovaní, alebo počas prípravy. Nerovnomerná vlhkosť čreva, najmä vlhké oblasti, sa často spájajú s výskytom stromy. Príznaky mycélium na povrchu kompostu, alebo čreva sa zoskupuje do diskretných bielych škvrn, ktoré sa neskôr vyvinú do hustej vrstvy, ktorá sa dá odlúpnuť z povrchu substrátu. K tvorbe stromy dochádza v predstihu pred pripínaním.

**Manažment kultúry:** S ikrami by sa malo opatrne zaobchádzať a skladovať, aby sa minimalizovalo riziko tejto poruchy..

Z klobúka húb sa zvyčajne vylúči značné množstvo vody. Ak zo stonky, alebo klobúka vytekajú malé kvapôčky vody, huby sa nazývajú úniky. Rozdiel medzi únikom a výtokom je v tom, že kvapôčky vody zostávajú ako kvapky na úniku, zatiaľ čo z výtokového huby voda skutočne padá, alebo vyteká. Plačky si zvyčajne všimneme, pretože sú dosť nezvyčajné. Zdá sa, že hladká biela huba má určitý druh ochrany pred únikovkami a plačkami. Ostatné hlavné druhy - biela, krémová, zlato biela – sú náchylné na túto chorobu.

**Mass pinning:** Mass pinning, alebo pripínanie pod pláštom je bežné, najmä počas sezónneho pestovania. Náhly pokles teploty, nadmerné prevzdušňovanie, alebo skoršie zníženie koncentrácie CO<sub>2</sub>, ako sa odporúča, môže viesť k takýmto príznakom. Mnohé z abiotických porúch sú špecifické pre kmeň a niektoré vysoko výnosné kmene môžu byť citlivejšie.

**Duté jadro a hnedá dužina:** Zdá sa, že tieto dve poruchy postihujú smotanový kmeň oveľa viac ako iné kmene, hoci aj iné kmene môžu mať duté jadro. Keď sa po zbere odrežú spodné časti stoniek, v strede stonky sa objaví kruhová medzera. Táto diera môže byť dlhšia, alebo kratšia ako stonka. Ak má dutá odrezaná koncová časť hnedú farbu, predajná cena sa výrazne znižuje.

**Ružový hrebeň:** Niekedy môžeme na čiapočke pozorovať ružovkasté žiabre, ktoré majú abnormálny vzhľad a vytvárajú vzhľad hrebeňa. Takéto huby nie sú predajné. Táto abnormalita súvisí s uhlíkovými, fenolmi a inými zlúčeninami, ktoré kontaminujú obal, alebo sa dostávajú do kontaktu s povrchom huby. Za hlavný zdroj týchto chemikálií sa považuje nafta, petrolej, benzín, výfukové plyny z motorov a pesticídy, alebo ropné produkty na báze ropy. Huby môžu dokonca prasknúť, alebo sa rozštiepiť a potom zhnednúť. Huby sú groteskné a nepredajné.

**Manažment kultúry:** Pestovatelia by sa mali vyhýbať vystavovaniu plodníc húb škodlivým chemikáliám, ktoré sa spájajú s touto poruchou. Na posúdenie ich možnej toxicity by sa mali farby, tesniace zmesi a iné výrobky, ktoré sa majú používať v pestovateľských priestoroch, aplikovať na palubu a umiestniť vedľa vyvíjajúcich sa húb. Ak sa nevyvinú žiadne symptomatické huby, materiál je pravdepodobne bezpečný na použitie.

**Hnedé sfarbenie:** Zhnednutie malých špendlíkových hlavičiek, alebo polorozvinutých húb je na sezónnych hubárskych farmách veľmi časté. Môže to byť spôsobené vysokou teplotou, kropením pri vysokom tlaku vody (maximálny tlak je 0,4 atm), chlôrovaním s príliš vysokou dávkou chlóru (maximálna dávka je 500 ml (10 %) na 100 litrov vody na 100 m<sup>2</sup>), alebo nesprávnym použitím formalínu, napr. postriekaním húb roztokom formalínu.

**Šupiny, alebo krokodíly:** Šupiny vznikajú tak, že povrchové tkanivo nerastie, zatiaľ čo čiapočka sa vyvíja ďalej. Hlavnou príčinou vzniku šupín je nedostatočná kontrola klímy, najmä prílišné vysušenie, alebo príliš veľká rýchlosť prúdenia vzduchu. Silné výpary formaldehydu, alebo nadbytok pesticídov môžu tiež spôsobiť odtrhnutie vonkajšej vrstvy šupiny polorozpadnutých húb. Pri ďalšom raste huby pokožka praskne a vytvorí sa takzvaná "krokodília" pokožka. Kmene húb s bielou a krémovou farbou sú na šupinatost' citlivejšie ako biele huby.

**Dlhé stonky:** Prítomnosť dlhých stoniek v kombinácii s viacerými ďalšími príznakmi môže poukazovať na vírusové ochorenia, ale často je to dôsledok príliš vysokej koncentrácie CO<sub>2</sub>, takže stonky sa viac predlžujú (bubienky). Takýmto stavom sa dá predísť zlepšením prevzdušňovania.

**Iné abnormality:** Existuje množstvo ďalších abiotických podmienok, ktoré vedú k tvorbe abnormálnych plodníc, ako sú duté jadrá, chĺpkovité stonky, fialové stonky a ovisnuté časti. Hoci sú tieto stavy zriedkavé, často znepokojujú pestovateľov.

### **Všeobecné postupy riadenia neinfekčných chorôb**

Neinfekčné choroby sú spôsobené nevhodným prostredím pre rast húb. Kontrola a zabezpečenie vhodného prostredia pre huby pomáha predchádzať väčšine neinfekčných chorôb.

Niekoľko postupov riadenia neinfekčných chorôb je nasledujúcich:

- Na prípravu kompostu použite čerstvý substrát. Podlaha na prípravu kompostu by mala byť vybetónovaná, alebo vyložená dlaždicami a zakrytá strechou.
- Výhonok by mal byť čerstvý a zbavený všetkých nečistôt. Priestor na trenie musí byť čerstvý a dezinfikovaný 2 % formalínom.
- Čerstvý vzduch by sa mal pred vstupom do pestovateľských priestorov filtrovať, aby sa vylúčili všetky častice s veľkosťou 2 mikróny a viac.
- Miestnosti by mali byť vždy čisté a je dôležité ich pravidelne čistiť/bieliť/striekať/opravovať, aby bolo postarané o miesta, kde môžu spóry pretrvávať, alebo sa dostať do miestnosti. Po naplnení miestností a zapuzdrení vriec vzniká veľa nečistôt. Zvyšky starostlivo odstraňte. Nezametajte ani nepoužívajte na čistenie vodné trysky.
- Udržiavajte optimálne podmienky prostredia, pokiaľ ide o teplotu a vlhkosť v miestnostiach na pestovanie plodín.

Intenzívne pestovanie jedlých húb môže byť často postihnuté niektorými bakteriálnymi, hubovými a vírusovými chorobami, ktoré pomerne často spôsobujú dramatické straty produkcie. Tieto infekcie sú uľahčené osobitnými podmienkami, v ktorých sa huby

bežne pestujú, ako sú vysoké teploty, vysoká vlhkosť a nízka miera prevzdušňovania. Nehygienické podmienky pestovania húb poskytujú priaznivé prostredie pre mnohé choroby a škodcov. Čisté prostredie je preto v poslednom čase nevyhnutné aj pre produkciu húb. Medzi dôležité aspekty patrí vopred vyčistené náradie a udržiavanie celkovej hygieny. Na vhodnú a efektívnu produkciu húb je potrebné pochopenie príznakov a kontrol ošetrovania. V budúcnosti by mali potravinársky priemysel, exportné firmy a vlády venovať väčšiu pozornosť produkcii húb a správne mu zvládaniu chorôb a vytvárať skupiny/združenia (súkromné, verejné a mimovládne organizácie) na zvyšovanie hodnoty. Na podporu výrobcov, aby využívali rastlinný tovar, by sa mali posilniť vládne dotácie a iniciatívy všade tam, kde sú k dispozícii.

## 10 Kvasenie vína z tropického a subtropického ovocia

Ovocie je najdôležitejšou potravinou ľudstva, pretože je nielen výživné, ale aj nevyhnutné na udržanie zdravia. Ovocie v čerstvej aj spracovanej forme nielen zlepšuje kvalitu našej stravy, ale poskytuje aj základné živiny, ako sú vitamíny, minerály, sacharidy atď. Pozberové straty ovocia sú jedným z najväčších problémov tropických krajín, ako je India. Kvôli nesprávnym pozberovým postupom a nedostatočným spracovateľským zariadeniam sa takmer 35 až 40 % záhradníckej produkcie vyhodí. Náklady na plytvanie sa odhadujú na 40 000 rupií ročne. Ovocinársky a zeleninársky priemysel v Indii využíva na spracovanie menej ako 2 % celkovej produkcie ovocia a zeleniny v porovnaní so 40 až 50 % vo vysoko rozvinutých krajinách.

V závislosti od rôznych vlastností, ako je odroda, štádium dozrievania ovocia, chemické zloženie šťavy, použitie prídavných látok do muštu, techniky vinifikácie a zrenia vína, závisí obsah alkoholu a cukru vo víne. Klasifikujú sa ako prírodné vína (9 – 14 % alkoholu), dezertné a aperitívne vína (15 – 21 % alkoholu). Suché víno, sladké stolové víno, špeciálne víno, šampanské, muškátové a burgundské víno sú prírodné vína, zatiaľ čo sladké víno, sherry, vermut a portské víno sa považujú za dezertné a chuťové vína. Obsahujú výživné zložky, ako je etylalkohol, cukor, kyseliny, vyššie alkoholy, triesloviny, aldehydy, estery, aminokyseliny, minerálne látky, vitamíny, antokyány, menej významné zložky, ako sú aromatické zlúčeniny atď. Vinárstvo sa nazýva enológia. Ovocné vína sú nedestilované alkoholické nápoje, ktoré majú výživné, nové chutné a mierne povzbudzujúce účinky. Vína vyrobené z ovocia. Žiadny iný nápoj okrem vody a mlieka si v priebehu vekov nezískal také celosvetové uznanie a úctu ako víno. Keďže víno je fermentovaný a nedestilovaný produkt obsahujúci ovocie, obsahuje väčšinu živín prítomných v pôvodnej ovocnej šťave. Výživná hodnota vína sa zvyšuje najmä uvoľňovaním aminokyselín a ďalších živín z kvasiniek počas kvasenia. Ovocné vína obsahujú 8 až 11 % alkoholu a 2 až 3 % cukru s energetickou hodnotou od 70 do 90 kcal na 100 ml. Obsah etanolu vo víne zlepšuje chuť potravín.

Alkoholický nápoj je nápoj, ktorý obsahuje najmä etanol. Na účely zdaňovania a regulácie výroby sa delia do troch spoločných tried, a to na pivo, víno a destilované nápoje, ako sú whisky, rum, gin, vodka atď. Pivo sa vyrába kvasením spojením kvasiniek a obilného sladku, najmä jačmeňa, kukurice, raže, pšenice, alebo zmesi viacerých obilnín, a zvyčajne sa ochucuje chmeľom. Obsahuje 4 až 8 % alkoholu a jeho energetická hodnota sa pohybuje od 28 do 73 kcal na 100 ml. Destilované



alkoholické nápoje sa spracúvajú destiláciou etanolu kvasením obilia, ovocia, alebo zeleniny a zvyčajne sa pripravujú zo šťavy z cukrovej trstiny, melasy, kvasenej kaše z obilnín a zemiakov a kvaseného sladu z jačmeňa a raže. Obsah alkoholu v destilovanom alkoholickom nápoji sa zvyčajne pohybuje medzi 40 a 60 %.

### **História fermentácie**

Fermentácia je v tomto svete jednou z najstarších foriem technológie konzervovania potravín. Domorodé fermentované potraviny, ako je chlieb, syr a víno, sa vyrábajú a konzumujú už tisíce rokov a sú silne spojené s kultúrou a tradíciou, najmä vo vidieckych domácnostiach a dedinských komunitách. Pokročilý vývoj fermentačných technológií sa stráca uprostred histórie. Antropológovia postulovali, že práve výroba alkoholu podnietila primitívnych ľudí, aby sa usadili a stali sa poľnohospodármi. Niektorí úroveň považujú konzumáciu kvasených potravín za predhumánnu. Prvé fermentované potraviny, ktoré sa konzumovali, sú pravdepodobne fermentované ovocie. Lovci-zberači by konzumovali čerstvé ovocie, ale v čase nedostatku by jedli nahnité a fermentované ovocie. Opakovaná konzumácia by viedla k zlepšeniu chuti na kvasené ovocie. Existuje spoľahlivá informácia, že kvasené nápoje sa vyrábali pred viac ako 7000 rokmi v Babylone, pred 5000 rokmi v Egypte, pred 4000 rokmi v Mexiku a pred 3500 rokmi v Sudáne. Existuje aj potvrdenie o výrobe fermentovaného mäsa pre babylonského kráľa Nabuchodonozora. Za rodisko fermentovanej zeleniny a používania húb *Aspergillus* a *Rhizopus* na prípravu potravín sa považuje Čína. V knihe s názvom "Shu-Ching" napísanej za dynastie Čou v Číne sa spomína používanie "chu", fermentovaného obilného produktu.

Znalosti o tradičných technológiách fermentácie sa po stáročia odovzdávali z rodičov na deti. Tieto kvasené ako víno a iné sa prispôbovali generáciám; niektoré a postupy nepochybne ustúpili do úzadia. Tie, ktoré zostali dodnes, nielenže prežili skúšku času, ale v podstate aj viac zodpovedajú technickým, sociálnym a ekonomickým podmienkam danej oblasti. Prirodzený priebeh kvasenia znamená, že ho ľudia pravdepodobne prvýkrát spozorovali už dávno. Najprimitívnejšie použitie slova "kvasenie" v súvislosti s výrobou vína sa vzťahuje na zdanlivé "varenie" v mušte, ktoré vzniklo anaeróbnou reakciou kvasiniek s cukrami v hrozrovej šťave a uvoľnením CO<sub>2</sub>. Latinský výraz "fervere" doslova znamená variť. V polovici 19. storočia si Louis Pasteur všimol súvislosť medzi kvasinkami a procesom kvasenia, pri ktorom kvasinky pôsobia ako médium prostredníctvom série reakcií, ktoré premieňajú cukor na alkohol. Objav Embden-Meyerhofovej-Parnasovej cesty Gustavom Embdenom, Ottom Fritsom Meyerhofom a Jakubom Karolom Parnasom začiatkom 20. storočia prispel k hlbšiemu premýšľaniu o zložitých chemických procesoch, ktoré sa podieľajú na premene cukru na alkohol.

Indický trh s vínom Výroba vína Tri hlavné vinárske oblasti v Indii sú Maháraštra, Karnátaka a Himáčalpradéš. V nich je Maháraštra najväčším producentom a spotrebiteľom vína. Po desaťročí stabilného rastu v rokoch 2000 až 2010 sa produkcia vína v Indii znížila z 13,0 mil. litrov v roku 2010 na 11,0 mil. litrov v roku 2011. Produkcia vína v štátoch Maháraštra a Karnátaka v roku 2014 predstavuje 14,2 mil. litrov (1,58 mil. debien), keďže chladnejšie teploty počas februára a marca zvýšili úrodu a kvalitu hrozna. Produkcia vína sa znížila najmä v dôsledku prechodu pestovateľov na stolové hrozno a iné plodiny, zmeny spotrebiteľských návykov, poklesu cestovného

rchu, vysokých nákladov na pôdu a štátneho stropu na pôdu, vinárskej politiky a znehodnotenia rupie. Aj napriek všetkým týmto prekážkam vlády štátov Maháraštra a Karnátaka podporili domáci vinársky priemysel tým, že uvoľnili spotrebné dane na miestne vína, zmiernili obmedzenia dodávok a poskytli daňové stimuly na zakladanie vinárstiev a vinohradov a zaviedli spotrebné dane na dovážané vína a vína z iných štátov.

### **Spotreba vína**

India je na 77. mieste v celosvetovej spotrebe vína. Spotreba vína na obyvateľa v Indii je len 0,07 l/osoba/rok. Indická krajina sa na celkovej spotrebe vína v Ázii podieľa 0,8 %. V Indii sa 80 % spotreby vína sústreďuje na veľké mestá, ako sú Bombaj (39 %), Dillí (23 %), Bengalúru (9 %) a Goa (9 %). Hlavnými faktormi, ktoré prispievajú k zvýšenej spotrebe vína, sú rastúca populácia, vyššie nenávratné príjmy, uvoľnenie vládnych usmernení a politík. Podľa informácií All India Wine Associations sa spotreba vína v Indii v rokoch 2014 – 2015 pravdepodobne zvýši približne o 18 %. V prognóze prieskumu Vinexpo sa uvádza, že spotreba vína v Indii by mala do roku 2017 dosiahnuť 2,1 milióna debien, čo predstavuje nárast o 73 % oproti roku 2013. Na Indov pripadá do roku 2017 spotreba 1,15 milióna debien červeného vína, 0,63 milióna debien bieleho vína a 0,10 milióna debien ružového vína.

### **Export vín**

Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc a Chenin Blanc sú exportné akostné vína, ktoré zvyšujú význam indického vína na svetovom trhu. Čína, Singapur, Japonsko, Nepál a Bhután sú pravdepodobnými trhmi pre indické vína a získavajú si väčšie uznanie aj v USA a Francúzsku. V súčasnosti dovážajú vína do Indie Malajzia, Spojené arabské emiráty, Bhután, Nemecko, Spojené kráľovstvo, Srí Lanka, Maldivy a Nový Zéland. V roku 2010 došlo k miernemu nárastu vývozu indického vína o 2,6 ML a v roku 2012 dosiahol 739 000 l (2100 prípadov). Vývoz vína z Indie predstavoval približne 80 – 100 crores a očakáva sa, že v nasledujúcich 5 rokoch sa zvýši o 500 crores.

### **Import vín**

Podľa aktuálnych údajov o indickom obchode sú tromi najväčšími dodávateľmi vína do Indie Francúzsko, Austrália a Taliansko a dovoz vína z vinárskych krajín "nového sveta" rastie, najmä v prípade austrálskeho, amerického, juhoafrického a novozélandského vína, zatiaľ čo dovoz z Francúzska a Talianska klesol. Teroristické útoky v Bombaji a zákaz dovozu vína, došlo k obrovskému poklesu dovozu indického vína. Dovezené vína sa predávajú prostredníctvom pohostinstva (63 %) a maloobchodu (30 %), čo sú dva dôležité segmenty odbytu. Od roku 2009 došlo k nárastu dovozu vína, ktorý v roku 2011 dosiahol 44 000 hl a v roku 2012 by sa mal vyrovnáť tejto úrovni. Zdá sa, že nižšia domáca produkcia a vytrvalé propagačné úsilie prinášajú dovážaným vínam výsledky.

### **Zdravotné výhody fermentovaných nápojov:**

Ovocie je bohatým zdrojom fytochemikálií, ktoré sú nevyhnutné pre ľudské zdravie a ktoré si spotrebitelia vychutnávajú v každom ročnom období. Na celom svete existujú stovky druhov jedlého tropického ovocia a niektoré z nich majú veľmi vysoký

exportný potenciál. Väčšina tropického ovocia je dôležitým zdrojom antioxidantov, vitamínov, vlákniny a minerálnych látok a tvorí veľmi zdravú súčasť našej stravy. Ovocné šťavy boli dobrým prostredím na pestovanie probiotík. Okrem toho ovocie a zelenina neobsahujú žiadne alergény, ako je to v prípade mliečnych výrobkov, ktoré by mohli u niektorých skupín obyvateľstva spôsobiť alergiu. Môže znížiť depresiu, anémiu, krvný tlak, riziko mozgovej príhody, pálenie záhy, vredy, stres, zápchu a hnačku. Poskytuje ochranu zraku, zdravých kostí a porúch obličiek, rannej nevoľnosti, svrbenia a opuchov, zlepšuje nervové funkcie a údajne pomáha ľuďom prestať fajčiť. Alkohol vo víne, stimuluje žalúdočnú sekréciu, tlmí nervový systém a ponúka relaxáciu. Polyfenoly vo víne znižujú hladinu cholesterolu v krvi. Víno zvyšuje hladinu lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL), ktoré sú známe aj ako dobrý cholesterol v tele. Pri cukrovke sa používa zlúčenina obsahujúca chróm, ktorá sa nazýva glukózový tolerančný faktor (GTF). Prítomnosť resveratrolu zabraňuje vzniku rakoviny. Červené vína môžu vyliečiť riziko rakoviny pľúc. Mierne množstvo pitia vína môže zvýšiť kostnú hmotu u starších žien. Ľudia chcú víno používať aj na zníženie úzkosti, povzbudenie chuti do jedla a zlepšenie trávenia zvýšením obsahu žalúdočných kyselín.

## 10.1 Technológia výroby vína

Výroba vína pozostáva najmä z troch kategórií operácií, a to: predkvasenie, kvasenie a dokvasenie. V prípade vín vyrábaných z hrozna zahŕňa predkvasenie rozdrvenie ovocia a uvoľnenie šťavy. V prípade bieleho vína sa šťava oddeľuje od šupky, pri červenom víne sa šupka od šťavy neoddeľuje. Čírenie šťavy a bieleho vína sa zvyčajne dosahuje sedimentáciou, alebo odstredovaním. Potom sa do vyčistenej šťavy primiešajú kvasinky, aby sa začalo kvasenie. Pri výrobe červeného vína sa dužina, šupky a jadrá hrozna po rozdrvení a počas celého kvasenia, alebo jeho časti uchovávajú spolu. Robí sa to na získanie farby a chuti. Pri výrobe červeného vína sa do roztláčenej dužiny (muštu) na prípravu pridávajú kvasinky. Kvasenie zahŕňa reakciu, pri ktorej sa cukry menia na alkohol a CO<sub>2</sub>. Kvasinky využívajú cukry počas kvasenia. Klinové kvasenie nastáva vtedy, keď kvasinky úplne nevyužijú dostupný cukor a rýchlosť kvasenia sa spomalí a/, alebo zastaví. Čírenie sa dosiahlo scedením, filtráciou a/, alebo odstredením. Kvasenie vína prebieha v anaeróbných podmienkach a môže sa podporiť fosforečnanom amónnym (DAP) na doplnenie dusíka. Je potrebný na rast kvasiniek pri netradičnom prístupe výroby vína. Postfermentačné postupy sa vykonávajú po dosiahnutí požadovanej úrovne kvasenia vína, alebo po ukončení kvasenia. Víno sa odoberá z kvasiniek menej a zvyčajne sa uchováva v nádobách z nehrdzavejúcej ocele, alebo v dubových sudoch. V období skladovania vína sa víno môže filtrovať, stabilizovať za studena, zjemňovať a/, alebo miešať. Na podporu čírenia vína sa komerčne nakupujú a pridávajú rôzne číriace a zjemňujúce látky, ako sú enzýmy, bentonit, diatomit, vaječný bielok atď. Víno sa počas zrenia ďalej menilo, filtrovalo a plnilo do fliaš na uskladnenie.

## 10.2 Vína z tropického a subtropického ovocia

Mnohé tropické a subtropické ovocie vrátane hrozna, jabík, hrušiek, marhúľ, bobuľovín, broskýň, čerešní, pomarančov, manga, sliviek, karondy, granátového

jablka, guavy, banánov a ananásu poskytuje pri extrakcii dobré množstvo šťavy. Pri kvasení vína sa ovocné šťavy môžu zmeniť na víno.

### 10.2.1 Mangové víno

Mango, pýcha Indie, je dôležitým tropickým ovocím, ktoré zaberá približne 60 % celkovej pestovateľskej plochy v Indii. V Indii je k dispozícii dvadsaťpäť rôznych odrôd manga, ktoré sú cenené pre svoju svetložltú až jasne žltú farbu. Má sladkú a lahodnú chuť, vysokú výživovú hodnotu (vysoké množstvo aminokyselín, dobrý zdroj vitamínu A a B<sub>6</sub> a nízky obsah nasýtených tukov, cholesterolu a sodíka), ako aj prijateľnú trhovú cenu. Šťava z manga sa spolu s aromatickými látkami odporúča ako posilňujúce tonikum, pretože obsahuje dobré množstvo vitamínu A a C a je užitočná pri apoplexii z tepla. Plody manga s vysokým obsahom β-karoténu sú užitočné ako prevencia rakoviny. Bola zaznamenaná percentuálna strata po zbere 45 % a ako hlavný dôvod sa uvádzal prebytok plodov na trhu počas hlavnej sezóny. Výroba vína z plodov manga bola jedným z alternatívnych spôsobov, ako využiť a premeniť nadbytočnú produkciu na hodnotný produkt a minimalizovať straty po zbere.

Prípravené víno z odrody Apple mango s rôznou teplotou (20 °C, 25 °C, 30 °C a 35 °C) a koncentráciou kvasiniek (0,0065 %, 0,01 %, 0,05 % a 0,1 %). Koncentrácia kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) 0,05 % a teplota 25 °C poskytli optimálne vlastnosti vína z jablkového manga.

Skúmali sa podmienky fermentácie (ako sú kmene kvasiniek, enzým pektináza, pH a teplota), produkcia vyšších alkoholov a iných prchavých zlúčenín počas fermentácie vína z plodov manga. *Saccharomyces cerevisiae* CFTRI 101 produkovala najpriateľnejšie víno s vyšším obsahom alkoholu (150 – 300 mg.l<sup>-1</sup>) v porovnaní s ďalšími dvoma kmeňmi, ako sú pekárske kvasinky (123 – 200 mg.l<sup>-1</sup>) a (PWY1) izolát palmového vína (100 – 185 mg.l<sup>-1</sup>). Dobrá chuť a priaznivé zložky boli pozorované vo víne vyrobenom z odrody "Banganapalli" (343 mg.l<sup>-1</sup>) ako vo víne z odrody "Totapuri" (320 mg.l<sup>-1</sup>).

Skúmal sa vplyv podmienok fermentácie [teplota (15 – 35 °C), pH (3,5 – 6,0), SO<sub>2</sub> (100 – 300 ‰) a prevzdušňovanie (počiatočný rozpustený O<sub>2</sub> a trepanie pri 30 otáčkach za minútu)] na fermentáciu mangového vína na základe rastu kvasiniek, trvania, rýchlosti fermentácie a zloženia prchavých látok. Štúdia ukázala, že teplota mala významný vplyv na rast kvasiniek a na rozsah prchavých zlúčenín. Optimálnymi parametrami spracovania boli teplota (25 °C), pH (5), SO<sub>2</sub> (100 ‰) v mušte s počiatočným kyslíkom na dosiahnutie dobrej kvality výroby vína z plodov manga.

**Tabuľka 10.1.** Ovocie, odroda, štartovacia kultúra a kmene používané na kvasenie ovocného vína

Ovocie a odrody	Štartovacia kultúra a kmeň
Hrozno (Chenin blanc Black) cornichon	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hrozno (Chholtu Red, Chholtu White, Rang Spray, Thompson Seedless a Anab-e-Shahi)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hrozno (Chenin blanc)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Jablko (Golden Delicious a Red Delicious)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mango (Fazri, Langra a Chausa Dashehari)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mango (Totapuri, Nekkare, a Mallika)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Granátové jablko (Ganesha)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Granátové jablko (Ganesha a Bhagwa)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM-3095
Granátové jablko (Ganesha a Bhagwa)	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> NCIM N
Jamun (Kath Jamun a Pharendra)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Jamun	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> strain SC3287
Jamun	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Jamun	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Jamun (Čierny jamun)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Banán	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Banán	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Banán	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM 3594
Ananás	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Kešu jablko	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Kešu jablko (Bayanus)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Guava	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM 3095 and NCIM 3287
Guava	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3090, 3095, 3287
Papaya (C02)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Jack fruit (Vellipala)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Extrakty z ovocia (rajčiak, mandľa, pomaranč, citrón a africká hviezda)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sapota (Kalipatti a cricket ball)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sapota (Kalipatti)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sapota (Kalipatti)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM-3095
Karonda	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Hviezdicový egreš	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Jahoda (Sujatha)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ber	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mrkva	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> strain No. 522
Pomaranč	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Muskmelon	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Marhuľa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Karambola	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Liči	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MTCC178
Sušený fikus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM 3282
Tendu	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### 10.2.2 Hroznové víno

Uvádza sa, že spomedzi tridsiatich odrôd hrozna sú Chenin Blanc a Black Cornichon známe ako kvalitné suché stolové vína. Zistilo sa, že relatívny obsah kyselín vo víne ôsmich odrôd hrozna fermentovaných pomocou *Schizosaccharomyces pombe*

je v porovnaní so *Saccharomyces cerevisiae* nízky. Spomedzi rôznych odrôd hrozna, Muškát skorý, Perla Csaba, Šampión, Mandelinka, Bianshi Rai, Rizling rýnsky a Jaosbeli, sa kvalitné biele suché stolové víno získalo zo Šampióna, Perly Csaba a Muškátu skorého. Štyri odrody hrozna, a to Arkavati, Arka Kanchan, Arka Shyam a Arka Hans, boli vhodné na výrobu kvalitného suchého vína a prvé tri odrody mali aj kvalitnú sladkú odrodu. Vína pripravené z odrôd Chholtu Red, Chholtu White, Rang Spray, Thompson Seedless a Anab-e-Shahi z tretieho zberu mali dobrú kvalitu a víno z odrody Thompson Seedless malo najvyššiu mieru fermentácie a obsah alkoholu.

### 10.2.3 Banánové víno

Banán je tropické ovocie patriace do čeľade Musaceae a rodu *Musa* spp., ktoré sa hojne pestuje v Indii. Banány sú štvrtou najdôležitejšou plodinou po ryži, pšenici a kukurici a medzinárodný obchod s banánmi sa odhaduje na približne 5 miliárd USD ročne. Banány majú vysoký obsah zdrojov výživy, ako sú sacharidy, minerálne látky, najmä draslík, a vitamíny ako B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>12</sub>, C a E. Môžu sa sušiť a spracovať na múku, lupienky a sušené ovocie. Banány na varenie sa drvia na kašu a používajú sa na výrobu piva. Vlákno sa používa na výrobu povrazov, vriec a rohoží. Z banánovej šupky sa vyrábajú listy papiera a lepenky. Na prípravu banánového vína sa banány uvaria, vylisuje sa z nich šťava, pridajú sa vínne kvasnice, kyselina citrónová, cukor a kukuričná múka a nechajú sa 2 dni odstáť v hrnci. Potom sa preleje do kanistra so vzduchovým uzáverom na 14 až 30 dní a následne sa filtruje filtračným sífonom do iného kanistra. Pred konzumáciou sa nejaký čas uchováva.

Bolo zaznamenané víno zo zrelých banánov s použitím enzýmu pektinázy a dvoch kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3283 a NCIM 3046 s prijateľnými vlastnosťami, pokiaľ ide o arómu, chuť, čírosť a celkové vlastnosti. Bolo zaznamenané banánové víno s použitím *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3594 s použitím 50 % banánovej dužiny a vody (v/v). Celková rozpustná sušina (TSS) a pH banánovej dužiny sa upravili na 24 ° brix a 3,8 až 4,2 pridaním práškoveho cukru a kyseliny citrónovej. Senzorické hodnotenie ukázalo, že banánové víno malo 10 až 14 % obsahu alkoholu s vynikajúcimi senzorickými vlastnosťami, ako je čírosť, farba (zlatožltá), vôňa, chuť a celková prijateľnosť.

### 10.2.4 Jablčný cider a víno

(*Malus domestica*) sa používa na prípravu jemných alkoholických nápojov, ktoré sú výživnejšie ako destilované nápoje. Plody jablák sa spájajú skôr s jablčným muštom ako s inými alkoholickými nápojmi. Cider je nápoj s nízkym obsahom alkoholu, ktorý sa vyrába kvasením jablčnej šťavy a predpokladá sa, že sa vyrába už viac ako 2 000 rokov. Cider je vo svete známy pod rôznymi názvami, ako napríklad cidre (Francúzsko), sidre (Taliansko), sidra (Španielsko) a apfel wein (Nemecko a Švajčiarsko). Cider môže byť sladký, alebo suchý. Podľa obsahu alkoholu sa cider delí na mäkký (1 – 5 %), alebo tvrdý (6 – 7 %). Šumivé cidre obsahujú málo cukru a CO<sub>2</sub>, sladké cidre a tiché cidre zvyčajne neobsahujú CO<sub>2</sub>, zatiaľ čo suché cidre obsahujú málo cukru a obsah alkoholu okolo 6 – 7 %. Súčasou fermentáciou jablčnej šťavy s baktériami *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* sa získal cider s prijateľnou hladinou alkoholu a kyslosti. V súčasnosti sa na fermentáciu jablčného vína používajú väčšinou nádrže z nehrdzavejúcej ocele, hoci tradične sa

na tento účel používali dubové sudy. Teplota 40 °C je vhodná na hromadné skladovanie muštov. Po kvasení sa cider prefiltruje. Počas zrenia sa väčšina suspendovaného materiálu usadí a zvyšok tekutiny zostane číry, ktorý sa môže vyčistiť bentonitom, kazeínom, alebo želatínou, po ktorých nasleduje filtrácia. Po vyzretí a vyčistení sa cider musí pasterizovať pri teplote 60 °C približne 20 – 30 minút, alebo sa môže použiť SO<sub>2</sub>. Jablčné víno je ďalší produkt vyrobený z jablčnej šťavy alkoholovým kvasením a má obsah alkoholu od 11 do 14 %. Podobne ako jablčný mušt je základnou surovinou jablčná šťava, alebo koncentrát, ale keďže obsah alkoholu vo víne je vyšší ako v jablčnom mušte, je nevyhnutné jeho vylepšenie cukrom, alebo koncentrovanou šťavou.

### 10.2.5 Granátové víno

Predbežné štúdie výroby vína z granátového jablka ukázali, že zo šťavy z granátového jablka možno úspešne pripraviť kvalitné víno. Rýchlosť kvasenia šťavy z granátového jablka však bola pomalšia ako pri hroznovej šťave. Zo štúdií sensorického hodnotenia vyplynulo, že víno z granátového jablka malo lepšiu chuť a farbu ako hroznové víno. Zisťoval sa vplyv štádia zrelosti plodov na kvalitu vína zo šťavy granátového jablka odrody Ganesh. Šťava z granátového jablka získaná metódou ručného lisovania bola vhodná na výrobu granátového vína. Úroveň inokula (5 %) a pH (4,0) muštu sú optimálne podmienky na prípravu granátového vína.

### 10.2.6 Víno Sapota

Na výrobu sapotového vína štandardnej kvality sa použila šťava získaná z rôznych štádií sapoty (polozrelá, zrelá a prezretá). Výsledok štúdie ukázal, že sapotové víno pripravené zo šťavy zo zreých plodov bolo najlepšie v porovnaní s polozrelými a prezretými plodmi. Zistilo sa, že ošetrenie 0,1 % pektinázy a zriedenie šťavy zo sapoty v pomere 1:1 zvýšilo kvalitu sapotového vína. Miešanie šťavy zo sapoty s miestnou šťavou z manga a mangom alphonso v pomeroch 1:0,5, 1:1, 1:1,5 a 1:2 nemohlo zlepšiť kvalitu sapotového vína. Kvalita pripraveného vína sa mierne zvýšila počas šesťmesačného zrenia pri teplote 13 až 15 °C.

### 10.2.7 Jackfruit víno

Skúmal sa vplyv pekárskych kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) a počiatočných koncentrácií cukru na výrobu vína z jackfruitovej šťavy. Vyčistená šťava z jackfruitu (14 % TSS) sa fermentovala pomocou 0,5 až 2,0 % (w/v) pekárskych kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) v anaeróbných podmienkach pri 30 °C počas 14 dní. Obsah etanolu a cukru sa analyzoval denne z odobratých vzoriek. Výsledky štúdie ukázali, že počiatočná koncentrácia cukru (14 % TSS) a vyššia miera inokulácie kvasiniek inhibovali rast kvasinkovej bunky. Bolo vyvinuté víno z chlebovníka (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) s použitím kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*). Vyvinuté jackfruitové víno obsahovalo 18 % alkoholu s vysokým obsahom polyfenolov (7,5 % mg.l<sup>-1</sup>) a antioxidačnou aktivitou (36 %). Chlebové víno malo sladkú arómu a vynikajúce sensorické vlastnosti. Štúdia ukázala, že spracovanie vína je sľubnou metódou na zvýšenie hodnoty jackfruitu.

### 10.2.8 Ostatné ovocné vína

Vykonal sa fermentačné štúdie s cieľom zistiť vhodnosť mrkvy na prípravu vína s pôvodným kmeňom kvasiniek a *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides* č. 522. Vína vyrobené oboma kmeňmi sa porovnali z hľadiska ich chemických a senzorických vlastností. Výsledky ukázali, že mrkva môže slúžiť ako dobrý substrát na prípravu kvalitného vína. Plody karonda v rôznych štádiách dozrievania boli chemicky analyzované a použité na výrobu vína. Z prezretých plodov karonda sa získalo krásne, chutné čerešňovo-červené víno s 8,26 % alkoholu a výťažnosťou 438 ml.kg<sup>-1</sup> vína. Pripravené víno bolo hodnotené ako štandardné víno a dobre sa porovnávalo s hroznovým vínom. Z 1 kg plodov karonda sa získala maximálna výťažnosť 770 ml vína. Víno sa pripravilo z dvoch odrôd jahôd, a to Sujatha a Labella. Jahodové vína sa organolepticky hodnotili pred a po vyzretí (90 dní) a víno z odrody Sujatha je prijateľné. Uvádza sa, že sa pripravilo červené víno z tropického ovocia jamun bohatého na antokyány fermentáciou pomocou vínnych kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) a kvalitatívne vlastnosti sa porovnali s komerčnými hroznovými červenými vínami. Výsledok štúdie ukázal, že červené víno pripravené z ovocia jamun malo iskrivo červenú farbu, kyslú chuť, vysokú koncentráciu trieslovín (1,7±0,15 mg.100 ml.l<sup>-1</sup>) a nízku koncentráciu alkoholu (6 %). Skúmalo sa víno z hviezdicového egreša aplikáciou *Saccharomyces cerevisiae* počas dvoch týždňov. Výsledky ukázali, že kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) zohrávajú dôležitú úlohu pri spotrebe živín ako škrobu a cukru s uvoľňovaním etylalkoholu. Zistilo sa, že po dvojtýždňovom kvasení obsahuje egrešové víno 15,90 % etylalkoholu. Výskum uskutočnený v súvislosti s vývojom a fyzikálno-chemickým hodnotením vína vyrobeného z kešu jablkového prášku. Mušt sa pripravil zmiešaním 75 g prášku z kešu jablák s 1 litrom destilovanej vody a následne sa amelizoval na 20 °Bx. Na fermentáciu sa použilo inokulum pekárskych kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) v koncentrácii 1 g.l<sup>-1</sup>. Výsledok štúdie ukázal, že víno vyrobené z kešu jablkového prášku malo svetlohnedú farbu, mierne kyslastú chuť, nízky obsah trieslovín (0,60 mg 100 ml<sup>-1</sup>), vysoký obsah vitamínu C (14,2 mg 100 ml<sup>-1</sup>) a nízky obsah alkoholu (7,2 %). Uvádzala sa výroba a charakteristika vína zo zmesi piatich ovocných extraktov (rajčiak, mandľa, pomaranč, citrón a africké star apple) a tiež sa stanovila bezpečnosť vína na sedemdesiatich samcoch a samiciach potkanov albinotických wistar. Výsledky skúmania identifikovali glykozidy, redukujúce zlúčeniny, polyfenoly a triesloviny vo víne z viacerých druhov ovocia, ale nie v štandardných vínach. Výsledky štúdie na zvieratách ukázali, že vysoká dávka viacovocného vína spôsobila vyššiu aktivitu superoxididismutázy (SOD) v pečeni v porovnaní s kontrolou, čo znamená, že viacovocné víno neprodukovalo voľné radikály. Uviedla, že víno je bezpečné pre ľudskú spotrebu a malo lepšie zdravotné účinky ako komerčné červené víno. Skúmala sa fermentácia a charakterizácia vína zo sušeného *Ficus carica* L. pomocou *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3282. Výsledok štúdie ukázal, že víno malo 76,45 % radikálovej čistiacej aktivity (RSA), čo naznačuje, že víno malo významné množstvo antioxidantných vlastností a nízky obsah alkoholu (4,5 %). Študovalo sa fermentačné správanie kmeňov *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3095 a NCIM 3287) počas kvasenia muštu guajavy (*Psidium guajava* L.) a optimalizácia výroby guajavového vína. Štúdia optimalizovala parametre fermentácie *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3287, ako je teplota fermentácie (25 °C), pH (4), fosforečan diamónny (0,06 %), oxid siričitý (100 ‰) a 6 % inokulum na výrobu kvalitnejšieho



guavového vína s dobrým odtieňom a chuťou. Papájové víno sa vyrábalo z čirej, neklarifikovanej papájovej šťavy a papájovej dužiny oddelene. Na úpravu konečnej TSS na 24 °Bx sa použil trstinový cukor. Na fermentáciu sa použila čistá kultúra vínnych kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) s koncentráciou 5 ml.kg<sup>-1</sup> dužiny/šťavy. Výsledok štúdie ukázal, že víno pripravené z čirenej, alebo nečirenej papájovej šťavy bolo veľmi prijateľné z hľadiska farby, chuti vône a sladkosti so značným obsahom alkoholu (10 až 11 %). Uviedlo sa, že na výrobu vína sa použila šťava a dužina z ovocia Star. Šťava sa zhromažďovala vo fermentačných bankách a celkový obsah rozpustných látok (TSS) v šťave sa upravil na 24 °Bx pridaním cukru a jaggery. pH sa upravilo na 3,5 pridaním kyseliny citrónovej/hydroxidu draselného a ošetrilo sa 50 ‰ metabisulfitu draselného (KMS). Podobne sa pozorovala aj klesajúca tendencia živín a bioaktívnych zlúčenín v hviezdicovom víne s postupujúcou dobou skladovania. Počas starnutia bol pokles živín a bioaktívnych zlúčenín menší v hviezdicovom víne pripravenom s použitím jaggery v porovnaní s star apple vínom pripraveným s použitím cukru.

V súčasnosti sa vína môžu vyrábať z akéhokoľvek iného ovocia ako z hrozna a tento prehľad je súhrnom štúdií o príprave vína z ovocia. Hoci maloobchodný predaj vína dobieha indického spotrebiteľa, spotreba na obyvateľa sa musí ešte zvýšiť. Víno by sa mohlo pripravovať z nedostatočne využívaného tropického a subtropického ovocia, čo by pomohlo úsiliu o zvýšenie trvanlivosti znížením strát po zbere a pri výrobe a existujúcemu vinárskemu priemyslu. Indická vláda označila víno za rýchlo sa rozvíjajúci sektor a rozšírila podporu v podobe dotovania spracovateľských zariadení a zníženia DPH. Na základe analýzy spotreby alkoholu indickými spotrebiteľmi možno konštatovať, že spotrebiteľia tradične viac inklinovali k liehovinám a pivu, zatiaľ čo víno si postupne získava čoraz väčšiu obľubu. Túto tendenciu možno pripísať aj dostupnosti a cenovej prístupnosti a nedostatku vhodných maloobchodných kanálov. India zaznamenala obrovský nárast počtu vinárskych podnikov, ktoré podporujú výrobu a distribučný mechanizmus; v súčasnosti existuje jasná potreba maloobchodnej infraštruktúry pre víno svetovej triedy.

## 11 Fermentované nápoje na báze ovocia (FBFB)

Keďže sa očakáva, že do roku 2050 bude na planéte žiť približne 10 miliárd ľudí, tlak na poľnohospodársko-potravinársky systém, aby uživil svet a zároveň neprekročil limity planéty, nebol nikdy väčší. Rozvoj bohatstva v krajinách s nízkymi a strednými príjmami urýchlil zvýšenú spotrebu mäsa, ovocia a zeleniny v porovnaní s obilninami, čo si vyžiada príslušné zmeny vo výrobe a zvýši zaťaženie prírodných zdrojov. Podľa FAOSTAT-u predstavovala celosvetová produkcia ovocia v roku 2018 približne 870 miliónov metrických ton (mt). Medzi ovocie s najvýznamnejšou produkciou patria banány (116 mt), melóny (104 mt), jablká (86 mt) a hrozno (79 mt). Ázia bola regiónom s najväčšou celosvetovou produkciou ovocia, a to 490 mil. t. Druhým najväčším regiónom v celosvetovej produkcii ovocia bola Latinská Amerika so 133 mil. t, nasledovala Afrika (109 mil. t) a Európa (76 mil. t).

Ovocné fermentované nápoje (FBFB) sú už veľmi dlho pilierom ľudskej civilizácie vďaka svojim atraktívnym senzorickým, dietetickým a funkčným vlastnostiam. Ovocie má relatívne vysoký obsah cukru a obsahuje značné množstvo

bioaktívnych látok, ako sú vitamíny, antioxidanty a polyfenoly, čo z neho robí ideálny substrát pre fermentačné procesy. Najrozšírenejšie FBFB na svete sú víno a jablčné víno, ale tradičné nápoje, ako napríklad hardaliye, tepache a khadi, si tiež získavajú popularitu.

Hlavnými problémami v nápojovom priemysle sú chemické, mikrobiologické a fyzikálne riziká. Mnohé patogény sa vyskytujú v potravinovom reťazci na rôznych úrovniach, pretože sú veľmi prispôsobivé a môžu žiť, vyvíjať sa a vytvárať potenciálne nebezpečné látky v mikrobiologickom prostredí. Mikrobiálne populácie sú prirodzene prítomné v surovom ovocí, preto sa pravdepodobnosť vystavenia zvyšuje, ak sú suroviny nekvalitné. Poľnohospodárske postupy a klimatické podmienky sú základnými faktormi ovplyvňujúcimi bezpečnosť a kvalitu konečného výrobku. Zmena klímy má významný vplyv na chemické riziká spojené s konzumáciou FBFB. Keďže suroviny sú citlivé na akúkoľvek menšiu zmenu klimatických podmienok, zvýšená teplota má za následok skorší termín zberu a výskyt nešpecifických kontaminantov pre každý región.

Bezpečnosť potravín je pri spracovaní potravín mimoriadne dôležitá. Preto ak sa správne výrobné postupy nedodržiavajú, spracovanie surovín môže predstavovať hlavný zdroj kontaminácie. Sekundárne zdroje kontaminácie v potravinách FBFB sú prezentované po zabalení výrobku a súvisia s parametrami prepravy a skladovania.

Riziko kontaminácie možno kontrolovať bežnými metódami vrátane chemických inhibítorov, ako je napríklad oxid siričitý, ktorý v FBFB pôsobí ako mikrobiálny inhibítor a antioxidant. Mnohé štúdie dokumentujú neznášanlivosť, alebo vysokú citlivosť na prídavok siričitanov, čo môže viesť k rôznym negatívnym vedľajším účinkom vrátane alergických reakcií, ktoré zvyšujú riziko astmatických epizód, dýchacích ťažkostí, kožných vyrážok a žalúdočných bolestí. Používaniu vysokých dávok SO<sub>2</sub> sa treba vyhýbať zo zdravotných aj enologických dôvodov, pretože môže ovplyvniť organoleptické vlastnosti konečného výrobku, neutralizovať arómu a dokonca spôsobiť rozpoznateľné čuchové chyby. Zdá sa, že dávka voľného oxidu siričitého 25 – 35 mg.l<sup>-1</sup> je účinná pri eliminácii životaschopných buniek *Brettanomyces bruxellensis*. Zistil sa silný účinok viazaného SO<sub>2</sub> na rast baktérií, ktorý bol skôr bakteriostatický ako baktericídny. Vždy sa zistil vplyv viazaného SO<sub>2</sub> na rast baktérií, ktorý bol skôr bakteriostatický ako baktericídny. Rôzne kmene kvasiniek si však v dôsledku svojich genetických adaptačných stratégií vyvinuli toleranciu na siričitan. Dimetyldikarbonát (DMDC), chemický konzervačný prostriedok účinnejší proti kvasinkám ako proti baktériám, alebo hubám, zabraňuje rastu kvasiniek vo vínach a dezinfikuje mušty odstránením pôvodnej mikrobioty. V roztoku môže DMDC reagovať s dimetylkarbonátom, metyletylkarbonátom a metylkarbamátom, pričom vznikajú zlúčeniny toxické pre ľudské zdravie. Preto je stanovený maximálny limit pre DMDC v nápojoch 250 mg.l<sup>-1</sup>.

Filtrácia je fyzikálny proces na odstránenie mikroorganizmov a používa sa najmä pred plnením do fliaš. Alkoholické fermentované nápoje sa často filtrujú pomocou filtračných pomôcok vrátane diatomitickej zeminy, ktorá predstavuje riziko pre verejné zdravie z dôvodu prítomnosti vysokého množstva ťažkých kovov, ako sú arzén, olovo a kadmium. Pokiaľ ide o metódy tepelného spracovania, najčastejšie sa používa pasterizácia a sterilizácia. Medzi ich nevýhody patrí strata dôležitých bioaktívnych látok, ktoré ovplyvňujú vzhľad, chuť a výživovú hodnotu a vedú k zhoršeniu kvality nápojov.

Pod vznikajúcim a neustálym tlakom na životné prostredie je potravinársky priemysel povinný podporovať udržateľné technológie, ktoré zároveň spĺňajú požiadavky na účinnosť a výkonnosť. Umelá inteligencia (AI) a najmä strojové učenie (ML) sa môžu používať ako nástroje na predpovedanie a klasifikáciu vlastností, automaticky a bez ľudského zásahu, čo vedie k odhaleniu a náprave abnormálnych činností, alebo k zlepšeniu environmentálneho riadenia. Ukázalo sa, že technológia blockchain pomáha v životnom cykle potravín vrátane bezpečnosti, kvality a vysledovateľnosti. Podobné vlastnosti možno pripísať aj inteligentným senzorom, ktoré umožňujú monitorovanie a kontrolu výrobného procesu v reálnom čase. Okrem toho optické senzory založené na spektroskopii majú schopnosť monitorovať nielen kvalitu, ale aj pravosť potravín. Čoraz častejšie sa využíva cloudový systém, pretože umožňuje spracúvať obrovský súbor údajov v reálnom čase pri nízkych nákladoch (napr. zníženie emisií CO<sub>2</sub> v dodávateľskom reťazci hovädzieho mäsa). 3D tlač v poslednom desaťročí priťahuje veľkú pozornosť vďaka pokroku v oblasti pečiva, mäsa a balenia potravín. Osobné preferencie/potreby spotrebiteľov možno využiť ako požiadavky na vývoj potravinových výrobkov na mieru, napr. so špecifickou výživovou hodnotou, textúrou, alebo neprítomnosťou určitých bielkovín (pokiaľ ide o alergikov).

Nové technológie sa zameriavajú na nové stratégie na udržanie, alebo zlepšenie kvality a reprodukovateľnosti FBFB prostredníctvom kontroly mikrobiálneho ekosystému. Na kontrolu fermentačnej fázy je nevyhnutné vybrať vhodný štartovací kmeň. Preto sa následné štúdie zameriavajú na vývoj mikrobiálnych štartérov, ich zlepšenie a efektívne využívanie baktérií mliečneho kvasenia (LAB). Široká škála kvasinkových/bakteriálnych kmeňov je schopná inhibovať pôsobenie biogénnych amínov a v niektorých enzýmoch kmeňov *Lactiplantibacillus plantarum* a *Pediococcus acidilactici* boli identifikované multikoperoxidázy. Pulzné elektrické pole (PEF) je netepelná metóda konzervácie potravín, ktorá dokáže inaktivovať enzýmy a mikroorganizmy počas krátkeho obdobia ošetrenia. Následne môže zvýšiť kvalitu nápojov zachovaním bioaktívnych látok a organoleptických vlastností. Táto technológia sa používa na rôzne matrice, ako sú nápoje z granátového jablka, analógy kombuchy, víno a jablčný mušt. Ultrazvuková úprava sa široko používa pri spracovaní organických potravín na podporu mikrobiálneho množenia s cieľom zlepšiť výkonnosť procesu, výťažnosť a kvalitu výrobku. Ultrazvukom asistovaná fermentácia a extrakcia sa využila v potravinárskych procesoch v mnohých štúdiách týkajúcich sa jablčného vína, nového nápoja z javorovca (*Porphyra dentata*), vína a piva. Vysoké homogenizačné tlaky (HPH) predstavujú fyzikálny proces, ktorý umožňuje zvýšiť veľkosť častíc polydisperzného kvapalného systému. Nedávno sa HPH uplatnila vo vinárskom priemysle, pričom priniesla sľubné výsledky pri minimalizácii využívania chemických látok a maximalizácii kvality výroby vína. Mrkvová šťava a lupinový nápoj vykazovali sľubné výsledky, pokiaľ ide o trvanlivosť a funkčné vlastnosti pri použití HPH. Hlavné prístupy zahŕňajú preventívne opatrenia v ovocných sadoch, ako sú správna poľnohospodárska prax (GAP), správna výrobná prax (SVP) a vykonávanie ďalších krokov pre každý proces, ako je chemické umývanie, vysokotlakové postreky a pasterizácia. Nové technológie na spracovanie ovocia môžu zahŕňať používanie pulzných elektrických polí (PEF), ultrafialového žiarenia (UV) a vysokého hydrostatického tlaku (HHP), alebo ultravysokého tlaku (UHP), ako aj prijatie systémov HACCP na podporu týchto postupov. Ich použitie by však malo zabrániť strate

osobitných aromatických tónov a sensorického profilu, čo by mohlo mať negatívny vplyv na vnímanie spotrebiteľov.

Kontaminácia mykotoxínmi v ovocných fermentovaných nápojoch je pre verejné zdravie stále aktuálna. Patulín (PAT), aflatoxíny (AF) a ochratoxín A (OTA) sú najrozšírenejšie mykotoxíny, ktoré kontaminujú suroviny a deriváty. Expozíciu mykotoxínom možno kontrolovať dvoma spôsobmi: dekontamináciou a preventívnymi opatreniami. Prístupy dekontaminácie používané na úplnú deaktiváciu, alebo odstránenie týchto vysoko toxických mykotoxínov zahŕňajú biologické, fyzikálne a chemické nástroje. Napriek tomu sú niektoré techniky menej účinné a občas zakázané z dôvodu obáv týkajúcich sa bezpečnosti, možnej straty výživového obsahu ošetrovaných výrobkov a nákladov na aplikáciu. Celkovo je dôležité zvážiť účinnosť, spracovateľnosť a náklady na metódy dekontaminácie, ako aj potenciálny vplyv na výrobok.

## 11.1 Mikrobiologické riziká zistené v kvasených nápojoch na báze ovocia

Vývoj mikroorganizmov v alkoholických a nealkoholických nápojoch závisí od mnohých dôležitých prvkov vrátane vonkajších a vnútorných faktorov. Medzi vnútorné faktory patrí prítomnosť antimikrobiálnych látok, výživových doplnkov, sýtenia a kyslosti. Mikrobiologickú kvalitu výrobku však ovplyvňujú aj podmienky skladovania, balenie, spôsob výroby, čistota výrobného zariadenia a suroviny.

Rôzne mikroorganizmy pôsobia v nápojoch ako kontaminanty, ale len málo z nich môže rásť v prostredí s nízkym obsahom kyslíka a kyslosti. Ide o mikroorganizmy, ktoré sa zvyčajne spájajú s kazením, metabolickým procesom, ktorý mení sensorické vlastnosti nápojov do takej miery, že sa stávajú nevhodnými, alebo nevyhovujúcimi na konzumáciu ľuďmi, vrátane širokého spektra baktérií, húb a kvasiniek.

Tradičné fermentované potraviny a nápoje často nespôsobujú ochorenia prenášané potravinami; to však môže mať rôzne dôvody vrátane nízkej miery osôb, ktoré vyhľadajú lekársku pomoc, alebo nedostatkov v systémoch dohľadu nad chorobami prenášanými potravinami. Baktérie sa však dokážu prispôbiť kyselinám a alkoholu prítomným v rôznych fermentovaných výrobkoch a väčšinu bezpečnostných problémov spôsobili patogénne baktérie, ako napríklad *Salmonella* spp., alebo *Escherichia coli* O157:H7. V jablčnom mušte boli hlásené prípady výskytu *E. coli* a v pomarančovom džúze *Salmonella typhimurium*.

Huby sú prirodzene sa vyskytujúce kontaminanty surového ovocia a spôsobujú vážne mikrobiologické znehodnotenie ovocných štiav. Mycélium, alebo spóry húb môžu infikovať konečný výrobok, vedľajší produkt, alebo suroviny. Medzi huby, ktoré môžu poškodiť ovocnú šťavu, patria druhy ako *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Byssochlamys*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Fonseceae*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Monilia*, *Mucor*, *Neosartorya*, *Penicillium*, *Rhizopus* a *Talaromyces*.

Kvasinky sa považujú za bežnú kontamináciu nápojov. Kvôli ich výnimočnej schopnosti odolávať karbonizácii nad 3,0 obj. a kyslým podmienkam sú kvasinky považované za dôležitú triedu organizmov, ktoré kazia nápoje. Ich požiadavky na pH

sa pohybujú v rozmedzí od 1,5 do 8,5, pričom 3,0 a 6,5 sú optimálne na rast. Jednou z hlavných príčin kontaminácie nealkoholických nápojov je všadeprítomnosť populácie kvasiniek zo surovín. Rozdiely v hustote a rozmanitosti kvasiniek sú spôsobené poľnohospodárskymi postupmi, používanými odrodami a prostredím. Kmene *Cryptococcus*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces* sú spojené s nadzemnými časťami rastlín a ovocia, zatiaľ čo v spoločenstve kvasiniek ovocia dominujú *Candida*, *Debaryomyces* a *Pichia*. Znehodnotenie výrobkov sa prejaví, keď počet kvasinkových buniek dosiahne  $5 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ , a je viditeľné, ak prekročí  $7 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ . Účinky kazenia zahŕňajú viditeľný rast na povrchu a kvasenie v ovocných šťavách, ktoré vytvárajú kvasinky ako *Zygosaccharomyces bailii* a *Pichia*. Kvasinky *Dekkera/Brettanomyces* sú častou príčinou kontaminácie vína, a to aj v drahých vínach. Tým, že kvasinky *Dekkera* a *Brettanomyces bruxellensis* produkujú 4-etylfenol a 4-etylguajakol, dodávajú vínu nepríjemnú príchuť, ktorá sa bežne označuje ako "Brett charakter" a definuje sa ako "koža", "konský pot", "stajňa" a "dym". Zákal, produkciu organických kyselín a zvláštne príchuť vo víne vytvára *Brettanomyces anomalus*.

Najčastejšie identifikovanou obavou týkajúcou sa silne a slabo kvasiacich druhov je kazenie sprevádzané nadbytkom plynu (oxidu uhličitého), a to u druhov ako *Z. bailii*, *S. cerevisiae* (var. *diastaticus* je obávaným kontaminantom pre fľaškové pivo ležiak, *D. bruxellensis*, *Saccharomycodes ludwigii*, alebo *C. parapsilosis* a *Candida pseudointermedia*, resp. Rod *Zygosaccharomyces* sa považuje za najčastejšie sa vyskytujúcu kvasinku, ktorá spôsobuje značné ekonomické straty v nápojovom priemysle.

## 11.2 Chemické riziká zistené v kvasených nápojoch na báze ovocia

### Mykotoxíny

Mykotoxíny sú sekundárne metabolity vláknitých húb, ako sú *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Alternaria*, a vyskytujú sa všade v potravinovom reťazci. Výskyt týchto zlúčenín v produktoch, ako je ovocie, obilniny, zelenina, nápoje a iné poľnohospodárske produkty, sa ukázal ako vážny problém pre ľudské zdravie vzhľadom na ich schopnosť vyvolávať závažné toxické účinky (karcinogénne, genotoxické, teratogénne, nefro- a hepatotoxické).

Približne 25 % poľnohospodárskych spoločenstiev na celom svete je kontaminovaných mykotoxínmi pochádzajúcimi zo saprofytických, alebo endofytických húb. V čase písania tejto publikácie bolo zaznamenaných viac ako 100 húb, ktoré produkujú niekoľko stoviek hubových metabolitov s toxickým potenciálom. Medzi mykotoxíny, ktoré sa často vyskytujú v potravinách a krmivách, patria AF, OTA, deoxynivalenol, zearalenón, fumonizíny a patulín, ktoré môžu produkovať rôzne druhy húb.

Rast húb a tvorba mykotoxínov je kumulatívny proces a môže sa objaviť na viacerých miestach potravinového reťazca, ktorý sa môže začať na poli a zintenzívniť počas ďalších fáz, ako je zber, sušenie a skladovanie. Hlavnými faktormi ovplyvňujúcimi tvorbu mykotoxínov sú teplota, aktivita vody ( $a_w$ ), relatívna vlhkosť (RH), pH, kmeň húb a substrát.

Vlhkosť a teplota spolu úzko súvisia a majú rozhodujúci vplyv na tvorbu húb a mykotoxínov. Optimálna teplota pre produkciu mykotoxínov hubami je 20 – 30 °C.

V oblastiach s tropickým a subtropickým podnebím sa častejšie vyskytujú aflatoxíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub>, zatiaľ čo v miernom podnebí sa najviac vyskytujú fuzariotoxíny, napr. trichotecény.

Skúmala sa súvislosť medzi teplotou a vodnou aktivitou ( $a_w$ ) *Fusarium verticillioides* a mykotoxínmi fumonizín (FB<sub>1</sub> a FB<sub>2</sub>). Štúdiou sa zistilo, že optimálny rozsah teplôt pre rast kmeňov *F. verticillioides* bol 20 – 25 °C a  $a_w$  0,995. Pre produkciu FB<sub>1</sub> a FB<sub>2</sub> však boli optimálne podmienky pre  $a_w$  0,98 – 0,995 a teplota 20 °C, resp. 20 – 30 °C. Z toho vyplýva, že faktory prostredia potrebné na produkciu mykotoxínov sa líšia od rastových faktorov. V inej štúdii sa uvádza, že kontaminácia AF bola výraznejšia pri 90 % relatívnej vlhkosti (3,9 µg.kg<sup>-1</sup> – 11 179,7 µg.kg<sup>-1</sup>) ako pri 60 % relatívnej vlhkosti (0,3 µg.kg<sup>-1</sup> – 2,4 µg.kg<sup>-1</sup>). Obsah vlhkosti bol však jediným faktorom, ktorý nevytváral zreteľný vplyv na obsah AF. Pokiaľ ide o teplotu, AF sa vyskytoval pri 20 °C a 30 °C, pričom sa ukázalo, že kontaminácia bola vyššia pri 30 °C.

Mikroorganizmy majú schopnosť prispôbiť sa zmenám prostredia a pH ovplyvňuje vývoj húb a ich mykotoxínov. Huby môžu vylučovať kyseliny, alebo zásady (butyrát, oxalát, malát, citrát, glukonát a sukcinát), aby zvýšili svoju virulenciu lokálnym znížením pH svojho hostiteľa. Napríklad *Sclerotinia sclerotiorum* a *Botrytis* spp. produkujú kyselinu glukónovú, kyselinu šťaveľovú, alebo citrónovú, ktorých úloha je stále sporná a pravdepodobne zahŕňa potlačenie obranyschopnosti rastlín, spustenie programovanej bunkovej smrti a dereguláciu funkcie ochranných buniek. Expresiu biosyntetických génov môže ovplyvňovať aj pH. Optimálne rozmedzie pre produkciu mykotoxínov z rodu *Alternaria* je 4,0 – 4,5, zatiaľ čo pH nad 5,5 tvorbu inhibuje.

Rast mycélia a tvorbu mykotoxínov ovplyvňuje osmotický tlak v substráte. Zistilo sa, že optimálna teplota pre rast *Fusarium proliferatum* je 28 °C a osmotický tlak -51,02 bar. Rast je obmedzený nízkym, alebo vysokým rozsahom osmotického tlaku. Na udržanie vývoja a zabezpečenie energie majú vláknité huby vrodenu schopnosť hydrolyzovať rôzne zdroje uhlíka. *Aspergillus niger* dokáže využívať cukry ako jediný zdroj uhlíka a energie na bunkový vývoj a metabolizmus. Je všeobecne známe, že *A. niger* rastie a rozširuje sa v reakcii na sacharidy, čo vo všeobecnosti zahŕňa rozmnožovanie celej kolónie, zvyšovanie biomasy a znižovanie obsahu sacharidov v prostredí. Z toho vyplýva, že prítomnosť húb nevyhnutne neznamená prípadnú kontamináciu mykotoxínmi, pretože parametre potrebné na ich tvorbu sú odlišné od tých, ktoré podporujú rozvoj húb. Vzhľadom na ich chemickú stabilitu a termostabilitu počas spracovania potravín nezaručuje odstránenie húb z potravín neprítomnosť mykotoxínov.

Environmentálne stresy, ako napríklad napadnutie hmyzom, sucho, mechanické poškodenie, nedostatok živín, nestále teploty, zrážky, alebo vlhkosť, môžu uľahčiť tvorbu mykotoxínov v rastúcich plodinách. Správne poľnohospodárske postupy znižujú stres rastlín, čím sa znižuje invázia húb a kontaminácia mykotoxínmi.

Neskôr sa v štúdiách uvádzala prítomnosť mykotoxínov v nápojoch, najmä v nápojoch na báze ovocia a zeleniny (napr. víno a ovocné šťavy), v pive ako nápoji na báze obilnín a v mlieku ako produkte živočíšneho pôvodu. V prípade FBFB je príčinou kontaminácie zlá kvalita surovín a ich výroby. Toxíny PAT, OTA a *Alternaria* sú najvýznamnejšie a najčastejšie sa vyskytujúce mykotoxíny v ovocí a jeho spracovaných produktoch.

FBFB, ako napríklad jablčné víno a víno, sa konzumujú vo veľkých množstvách na celom svete, preto ich kontaminácia predstavuje dôležitý problém bezpečnosti potravín.

OTA sa vo víne vyskytuje najmä v dôsledku kontaminácie hrozna *baktériami* *A. carbonarius* a *A. niger* ešte na plantáži, alebo vo fázach pred vinifikáciou. Pri hodnotení expozície v potrave Európska komisia informovala, že víno je druhou najdôležitejšou potravinou s najvyšším podielom na dennom príjme OTA obyvateľmi EÚ, čo vedie k maximálnemu prípustnému množstvu vo víne  $2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Hoci sa obsah OTA počas procesu výroby vína znižuje až o 80 %, môžu sa tvoriť modifikované mykotoxíny. V skutočnosti modifikované mykotoxíny zvyčajne zostávajú nezistiteľné pri bežných analýzach. Štúdie ukázali, že celkový obsah mykotoxínov vo víne je zvyčajne podhodnotený v dôsledku tvorby derivátov OTA.

Primárnym producentom PAT je huba *Penicillium expansum*, ktorá spôsobuje ochorenie modrou plesňou na jablkách. Napriek predpisom sa v štúdiách uvádzajú vysoké hodnoty PAT v komerčných nápojoch, ktoré niekedy prekračujú limitné hodnoty. Správna poľnohospodárska prax (GAP) a správna výrobná prax (SVP) sú najúčinnějšími prostriedkami na obmedzenie rastu húb a produkcie metabolitov. V jablčnom mušte sa PAT rozkladá pôsobením kvasiniek počas fermentácie. Uvádza sa, že po dvoch dňoch fermentácie sa obsah PAT v kontaminovanom mušte zníži šesťnásobne. Prítomnosť patulínu v jablčnom mušte je teda spôsobená predovšetkým pridaním jablčnej šťavy v špecifických priemyselných odvetviach, ako je sladký, alebo slabo fermentovaný jablčný mušt. Napriek tomu sa stále vyskytujú prípady, keď obsah PAT v komerčných jablčných cidroch prekročil limit  $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Druhy rodu *Alternaria* produkujú dibenzo-pyrónový mykotoxín označovaný ako alternariol. Chronická expozícia môže mať mutagénne, karcinogénne, xenoestrogénne a imunomodulačné účinky. Kontaminácia alternariolom (AOH) bola zaznamenaná vo viacerých produktoch, ako sú obilniny, gaštany, olejiny a ovocie. Ovocie s mäkkou šupkou, ako napríklad hrozno a rajčiaky, a výrobky z neho sú často náchylné na infekciu alternáriou, a preto sú často kontaminované AOH. Uvádza sa, že AOH bol najrozšírenejším mykotoxínom v 90 % vzoriek piva s priemernou hodnotou  $19,39 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Okrem toho 10 % vzoriek jablčného vína dosiahlo  $21,56 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a 93 % vzoriek červeného vína malo obsah  $7,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## Biogénne amíny

Biogénne amíny (BA) sú zlúčeniny obsahujúce dusík s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré vznikajú enzymatickými reakciami, ako je dekarboxylácia, transaminácia, reduktívna aminácia a degradácia príslušných prekursorových aminokyselín. Chemickú štruktúru možno klasifikovať ako alifatickú (kadaverín, putrescín, agmatín, ornitín, spermidín a spermín), aromatickú ( $\beta$ -fenyletylamín a tyramín), alebo heterocyklickú (tryptamín a histamín).

Výskyt BA v potravinách a nápojoch sa pripisuje dostupnosti bielkovín a/, alebo voľných aminokyselín, ktoré sú substrátom pre prírodné enzýmy surovín, alebo vznikajú mikrobiálnou dekarboxyláciou, alebo amináciou. Mikroorganizmy ako *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Leuconostoc* sú schopné produkovať špecifické mikrobiálne metabolity (napr. histamín, tyramín, putrescín, kadaverín

a  $\beta$ - fenyletylamín), ktoré bežne súvisia s hygienou a technológiou potravín, zatiaľ čo v prípade LAB prítomnosť BA naznačuje obranný mechanizmus počas fermentácie.

Pri ich vývoji zohráva úlohu niekoľko charakteristík, ktoré možno klasifikovať podľa surovín (napr. prítomnosť NaCl, pH, redoxný potenciál, alebo aktivita vody), mikroorganizmov (dekarboxylázová aktivita je spojená najmä s *Escherichia*, baktériami mliečneho kvasenia (LAB) *Streptococcus*) a podmienok spracovania a skladovania (napr. čerstvé, sušené, fermentované, v modifikovanej atmosfére).

Vysoký podiel BA v konečnom výrobku sa často spája nielen s vysokým počtom dekarboxylačných buniek. Optimálna teplota podporuje metabolizmus buniek a rozmnožovanie BA. Podľa Európskej asociácie pre bezpečnosť potravín produkujú mezofilné baktérie BA vo významnom množstve pri teplote 20 až 37 °C, zatiaľ čo pri teplote nižšej ako 5 °C, alebo vyššej ako 40 °C produkcia BA klesá. Štúdia ukázala, že *Klebsiella pneumoniae* v mäse je veľkým producentom kadaverínu pri teplotách nad 20 °C. Psychotolerantné baktérie majú vysoký podiel na akumulácii amínov pri teplotách pod 5 °C. Napríklad *Photobacterium psychrotolerans* a *Photobacterium phosphoreum* produkujú histamín v morských plodoch pri teplotách skladovania 0 – 5 °C.

pH je spojené s dvoma mechanizmami, ktoré pôsobia súčasne a ktorých výsledok závisí od ich rovnováhy. Prvý súvisí s kyslosťou potravín, ktorá pôsobí ako bariéra pre rast mikroorganizmov. Baktérie vykazujú dekarboxylázovú aktivitu ako súčasť svojho obranného mechanizmu proti nižšiemu pH.

Konečná koncentrácia BA v potravinách a nápojoch nie je charakterizovaná izolovaným účinkom jedného faktora, ale viacerými kombinovanými účinkami. V dôsledku toho sa tieto metabolity veľmi ťažko ničia ďalšími krokmi spracovania (napr. pasterizáciou, varením atď.). Vzhľadom na ich toxicitu možno BA považovať za marker kvality, pretože svedčia o čerstvosti výrobku a bezpečnosti potravín. Konkrétnejšie, zvýšené hladiny určitých amínov v potravinách možno pripísať použitiu surovín s nízkou kvalitou, kontaminácii, alebo nevhodným podmienkam počas skladovania, alebo spracovania.

Konzumácia veľkého množstva BA bola zapletená do viacerých prípadov otravy potravinami a súvisí so širokou škálou toxikologických a zdravotných rizík, ktoré zahŕňajú psychoaktívne, vazoaktívne a hypertenzné účinky.

V ovocných fermentovaných nápojoch (FBFB) súvisí tvorba BA s obsahom aminokyselín, odrodou a zrelosťou ovocia, ako aj s použitými technikami. Okrem toho sa môže vyskytovať prirodzene v surovine, alebo ako dôsledok rôznych fáz výroby a skladovania. Na obsah BA má však veľký vplyv niekoľko stresových faktorov, ako napríklad intenzívne dusíkaté hnojenie, napadnutie škodcami, napadnutie plesňami a iné parametre ovplyvnené podnebí, alebo typom a zložením pôdy.

Štúdie ukázali, že vína pochádzajúce z viniča ošetrovaného dusíkatými hnojivami môžu mať problémy s toxicitou v dôsledku obsahu BA. Napríklad sa preukázalo, že listová močovina výrazne zvyšuje koncentrácie histamínu a sperminu (v rozsahu 8 – 20 mg.l<sup>-1</sup>) vo víne, čo môže mať toxické účinky pre spotrebiteľov.

Počas procesu výroby vína sú hlavnými procesmi, ktoré podporujú tvorbu BA, primárna fermentácia kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* a jablčno-mliečna fermentácia LAB. V súčasnosti sú najreprezentatívnejšími BA nájdenými vo víne histamín, tyramín, putrescín, kadaverín a fenyletylamín. Napríklad putrescín sa hromadí v hrozne ako reakcia na nedostatok draslíka v pôde. Okrem toho sa



v červenom víne zaznamenali vyššie koncentrácie BA ako v bielom víne, čo sa pripisuje prevažujúcej jablčno-mliečnej fermentácii a dlhšej macerácii so šupkou hrozna, pri ktorej vzniká veľké množstvo polyfenolov a voľných aminokyselín.

Analýzovaný sa celý rad fermentovaných nápojov vyrobených z rôznych druhov ovocia, ako sú maliny, jahody, čierne ríbezle, slivky, bobule goji a hrozno. Najvyšší celkový obsah biogénnych amínov mali vína z červeného hrozna ( $28,11 - 67,48 \text{ mg.l}^{-1}$ ), nasledovali jahodové vína ( $14,60 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a malinové vína ( $8,75 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Celkový obsah v bielych hroznových vínach sa pohyboval od  $5,42$  do  $7,21 \text{ mg.l}^{-1}$ , zatiaľ čo ostatné ovocné vína vykazovali obsah nižší ako  $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Nariadenia platné v EÚ sa zatiaľ netýkajú nápojov, ale len histamínu v produktoch rybolovu. Podľa EFSA len niekoľko európskych krajín svojvoľne stanovilo zákonné limity pre histamín v nápojoch (víno a pivo):  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$  v Nemecku,  $6 \text{ mg.l}^{-1}$  v Belgicku,  $8 \text{ mg.l}^{-1}$  vo Francúzsku,  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  v Holandsku a  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  vo Švajčiarsku a Rakúsku.

## Pesticídy

Používanie pesticídov na poľnohospodárskej pôde súvisí s rastúcim dopytom po potravinách. Na zvýšenie produktivity plodín sa pesticídy vo veľkej miere používajú na kontrolu škodcov v ovocí a zelenine. Pesticíd je prírodná, alebo syntetická látka, alebo zmes látok, ktorá sa používa na prevenciu, ničenie, alebo šírenie chorôb. Vzhľadom na ich rôzne chemické a fyzikálne vlastnosti sa klasifikujú podľa ich hlavného použitia (napríklad insekticídy, herbicídy a fungicídy).

Používanie pesticídov na poľnohospodárskej pôde súvisí so zvyšujúcim sa dopytom po potravinách. Na zvýšenie produktivity plodín sa pesticídy bežne používajú na kontrolu škodcov v ovocí a zelenine.

Pesticídy možno tiež rozdeliť na organické a anorganické pesticídy. Organické pesticídy sa ďalej delia na dve skupiny: prírodné organické (prírodné zdroje, napríklad rastliny: rotenón, pyretrum) a syntetické organické, alebo moderné (umelo vyrobené chemickou syntézou: dichlórdifenyltrichlóretán, permetrín, malatión, lindán atď.) Spomedzi jednotlivých skupín sú najúčinnejšie a najčastejšie používané pesticídy organofosfáty a karbamáty. Je známe, že pôsobia na neurologický systém škodcov, spôsobujú paralýzu a prípadnú smrť organizmu. Okrem ich schopnosti zabíjať hmyz sa tiež uvádza, že u ľudí inaktivujú acetylcholinesterázu, čo spôsobuje hromadenie acetylcholínu, ktoré vedie ku kŕčom, záchvatom a dokonca k smrti.

Správanie sa pesticídov závisí od rôznych faktorov, ako sú teplota, svetlo, vlhkosť, baktérie a pH, čo spôsobuje ich rozklad rôznou rýchlosťou. Rezistencia voči pesticídom a zmena klímy sú dva najväčšie problémy, ktorým čelí dnešná spoločnosť. Odparovanie pesticídov je nežiaduci proces nielen z ekonomického hľadiska (nedosiahne sa účinok, a preto sa musí použiť viac pesticídov), ale aj z dôvodu znečistenia atmosféry a vystavenia ľudí a iných rastlín tomuto účinku.

Teplota ovplyvňuje odparovanie pesticídov zmenou tlaku pár a prchavosti. Účinnosť azoxystrobínu sa mení priestorovo a je výrazne ovplyvnená teplotou vzduchu. Organofosfáty, karbamáty, syntetické pyretroidy a sulfonylurey sa pri vyšších teplotách hydrolyzujú rýchlejšie. Napríklad chlorpyrifos sa rozkladal rýchlejšie pri  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  ako pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , čo malo za následok zníženú mortalitu a oxidačné poškodenie hmyzích škodcov.

Vplyv vlhkosti na vyprchávanie pesticídov možno definovať prostredníctvom mechanizmu sorpcie na minerálnych povrchoch za suchých podmienok. Sorpčný proces silne koreluje s aktivitou vody, vyjadrenou ako rovnovážna relatívna vlhkosť v pórovom priestore pôdy, a s dostupnou plochou povrchu hydratovaných minerálov. Vlhosť preto môže zvýšiť degradáciu prostredníctvom hydrolýzy citlivých pesticídov. Ukázalo sa, že triallát a trifluralín mali výrazne zvýšenú volatilizáciu pri 60 % relatívnej vlhkosti (7 % pre trifluralín a 6 % pre triallát) ako pri 90 % (47 % a 32 %).

Iónový charakter niektorých pesticídov, veľkosť a charakter náboja pôdneho prostredia a/, alebo organickej hmoty a cesta, ktorou korene rastlín absorbujú látku, sú ovplyvnené pH pôdy, čo tiež mení škodlivé účinky niektorých pesticídov na rastliny. Vzťah medzi pH a rýchlosťou rozkladu závisí od prevládajúceho spôsobu rozkladu každého pesticídu. Experimentálne štúdie ukázali, že imidakloprid a fipronil z ryžovej vody zvyšujú proces degradácie pri pH 10 po 44,7 dňa a 13,2 dňa.

Medzi najčastejšie pesticídy zistené vo víne patrili azoxystrobín, boskalid, cyprodinil, dimetomorf, fenhexamid, fludioxonil a metalaxyl. Počas výroby vína sa rezíduá pesticídov prenášajú zo šupky hrozna do muštu a ďalej do vína, čo môže predstavovať toxikologické riziko pre spotrebiteľa. Rezíduá môžu byť absorbované pevnými látkami, ktoré vznikajú počas fermentácie, alebo sa môžu stratiť počas rafinácie. Okrem toho môže mať červené víno zvýšené hladiny pesticídov v dôsledku dlhšej macerácie (ktorá zahŕňa šupku hrozna). V ekologických vínach sa zistili rezíduá niekoľkých pesticídov (dimetomorf, iprodión a pyrimetanil), ktoré sú pre tento konkrétny typ výroby zakázané. Vo víne sa najčastejšie zistili nekvantifikovateľné rezíduá materských pesticídov (pod hranicou kvantifikácie 0,01 mg.kg<sup>-1</sup>). Prítomnosť týchto metabolitov však predstavuje problém z hľadiska bezpečnosti a kvality potravín.

Okrem škodlivých účinkov na ľudské zdravie majú pesticídy veľký vplyv aj na chuť vína. Uviedlo sa, že rast *S. cerevisiae* bol významne inhibovaný týmito piatimi pesticídmi (hexakonazol, difenokonazol, flutriafol, tebukonazol a propikonazol) na maximálnej úrovni rezíduí. Počas výroby vína sa zistilo 86 zmenených metabolitov, čo viedlo k významnej zmene fermentačného profilu kvasiniek.

Fungicídy predstavujú v produkcii jablák veľký problém. Štúdie ukázali, že rezíduá fenbukonazolu, dokonca aj v nízkych koncentráciách (0,2 mg.l<sup>-1</sup>), sú pri výrobe jablčného vína znepokojujúce, a to z dôvodu ich vplyvu na rýchlosť fermentácie. Ukázalo sa však, že iné insekticídy, ako napríklad pyridabén, sa hromadia predovšetkým na jablčných šupkách, takže účinné riešenie, ktoré môže znížiť rezíduá až o 90 %, predstavuje lúpanie, vykôstkovanie a odšŕavovanie.

Bez ohľadu na ich výhody (napr. ľahká dostupnosť a nízka cena) majú nebezpečné účinky, od krátkodobých (napr. podráždenie kože a očí, bolesti hlavy, závraty a nevoľnosť) až po chronické (napr. rakovina, astma, leukémia a cukrovka). Existujú aj dôkazy o nepriaznivých účinkoch vystavenia pesticídom, ktoré vedú k vrodeným postihnutiam, nižšej pôrodnej hmotnosti, úmrtiu plodu atď. Riziko závisí od viacerých faktorov, ako je obdobie a úroveň expozície, typ pesticídu a environmentálne charakteristiky postihnutých oblastí. Neexistuje však skupina obyvateľstva, ktorá by nebola vystavená pôsobeniu pesticídov.

Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) odhaduje, že každý rok zomrie v dôsledku akútnej otravy z kontaktu s pesticídmi 0,4 až 1,9 % osôb, čo sa týka približne 1 000 000 osôb.

Bol zriadený spoločný výbor Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO) a Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO), ktorý koordinuje normy pre nápoje, ako aj normy pre potraviny, a ktorý vypracoval medzinárodný kódex správania pre zaobchádzanie s pesticídmi. V kódexe sa uvádzajú osvedčené postupy nakladania s pesticídmi počas celého ich životného cyklu, od výroby až po likvidáciu, pre vládne regulačné orgány, komerčný sektor, občiansku spoločnosť a ďalšie zainteresované strany. Obhajujú správne poľnohospodárske postupy zodpovedného používania pesticídov.

## Ťažké kovy

V poslednom čase sa značný záujem sústreďuje na skúmanie obsahu kovov v potravinách a nápojoch. Ťažké kovy sú prirodzene sa vyskytujúce prvky s vysokým atómovým číslom; väčšina ťažkých kovov sa vyskytuje v zemskej kôre, kde sú zapletené do rôznych prírodných a antropogénnych činností. Ťažké kovy sa nedajú ľahko rozložiť. Ťažké kovy sa klasifikujú ako esenciálne a neesenciálne. Niektoré kovy, ako napríklad Cu, Fe a Mn, sú nevyhnutné pre život človeka a sú to základné prírodné látky pre vývoj a dýchanie. Ak však ich koncentrácia prekročí tolerovanú hranicu pre organizmy, môžu byť esenciálne ťažké kovy pre živé bytosti nebezpečné.

Kontaminácia potravín a nápojov ťažkými kovmi je často dôsledkom kontaminácie životného prostredia a priemyselných zariadení, ako sú zariadenia používané na fermentáciu, úpravu, filtráciu, sytenie a balenie. Okrem toho sú dôležitými zdrojmi kovov, ktoré prenikajú do potravín a nápojov, voda, použité suroviny, skladovanie, alebo zrenie a použité zariadenia/náčinie. Zdroje kontaminácie nápojov ťažkými kovmi sa klasifikujú ako exogénne zdroje (ťažké kovy pochádzajúce z chemikálií pridávaných počas výroby a kontaminácia z priemyselných zariadení používaných na fermentáciu, úpravu, filtráciu, sytenie a balenie) a endogénne zdroje (prírodné zložky, ako je voda, kvasnice a suroviny, napríklad obilniny, používané vo výrobnom procese).

Nápoje zohrávajú kľúčovú úlohu pri udržiavaní života a v prípade kontaminácie môžu šíriť mnohé choroby. Pitie alkoholických aj nealkoholických nápojov je významným spôsobom, akým sa ťažké kovy môžu dostať do tela. Správa Ťažké kovy sa stanovili v egyptských nealkoholických nápojoch, pričom sa zistilo, že Pb, Cd a Cr boli nedetekovateľné, zatiaľ čo obsah Cu sa pohyboval medzi 0,17 a 0,56 mg.kg<sup>-1</sup>; obsah Fe bol 43,88 mg.kg<sup>-1</sup>; Ni bol 0,53 mg.kg<sup>-1</sup> a Mn bol 1,24 mg.kg<sup>-1</sup>. Napriek tomu výsledky naznačujú, že priemerné koncentrácie Cu, Cr, Pb, Mn a Cd vo všetkých vzorkách nealkoholických nápojov boli v rámci maximálnych prípustných limitov kovov v nápojoch, ktoré uvádza WHO a správy egyptského ministerstva zdravotníctva (EMH) pre pitnú vodu. Zdroj surovín, voda použitá na riedenie štiav, techniky použité pri pestovaní ovocia a kontaminácia spracovateľského zariadenia, ak sa používajú iné materiály ako nehrdzavejúca oceľ, sú faktory, ktoré môžu spôsobiť kontamináciu FBFB ťažkými kovmi.

V Nigérii sa uskutočnil prieskum profilov kovov v niektorých tradičných alkoholických nápojoch (palmové víno, palmové víno z rafie, burukutu, pito, ogogoro). Z výsledkov vyplýva, že priemerné koncentrácie kovov sa výrazne líšili v závislosti od analyzovaného kovu a boli pod zákonom stanovenými limitmi pre kovy v alkoholických nápojoch: Cd (0,02-0,05 mg.l<sup>-1</sup>); Pb (0,01-0,19 mg.l<sup>-1</sup>); Ni (nd-0,11 mg.l<sup>-1</sup>); Cr (nd-0,15 mg.l<sup>-1</sup>); Cu (0,09-0,60 mg.l<sup>-1</sup>); Co (0,01-0,08 mg.l<sup>-1</sup>); Fe (0,30-10,3 mg.l<sup>-1</sup>);

Mn ( $0,02-3,97 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a Zn ( $0,12-3,84 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Skúmala sa prítomnosť ťažkých a stopových kovov v dvoch nealkoholických nápojoch (asaana a nmedaa) a dvoch alkoholických nápojoch (burukutu a pito) vyrábaných v Ghane. Vo všetkých štyroch nápojoch sa zistili významné množstvá Ni, Zn a Pb; ako najpravdepodobnejšie zdroje týchto kovov boli identifikované panvice a náradie, ako aj vodovodné potrubie používané na výrobu týchto nápojov.

Podľa analýz ťažkých kovov sa ako najrozšírenejšie znečisťujúce látky ukázali Cu a Zn prostredníctvom technologickej vody, výrobných zariadení a baliacich zariadení.

Denný príjem ťažkých kovov v potrave určujú zákonné orgány, ktoré ho aj pravidelne aktualizujú. Napríklad kadmium ( $0,36 \mu\text{g.kg}^{-1}$  telesnej hmotnosti) je veľmi prítomným kontaminantom ťažkých kovov v ovocí a zelenine, a to z dôvodu jeho ľahkého prenosu z pôdy do rastlín, a je prítomné aj v obalových materiáloch a keramických predmetoch prichádzajúcich do kontaktu s potravinami. Napriek tomu, že každá potrava, alebo nápoj skonzumovaný samostatne nie je znepokojujúci, veľké množstvo kontaminovaných nápojov a dlhodobé vystavenie konzumácii ťažkých kovov môže spôsobiť fyzické, svalové a neurologické degeneratívne ochorenia. Preto je veľmi dôležité dodržiavať systém bezpečnosti potravín pri výrobe nealkoholických a alkoholických nápojov, aby sa zabránilo zvýšeným hladinám toxických kovov pravidelnou kontrolou vody a surovín, ako aj postupov spracovania.

### 11.3 Zistené mikroplasty v kvasených nápojoch na báze ovocia

Mikroplasty sa stali aktuálnym problémom znečistenia životného prostredia s mnohými dôsledkami pre zdravie zvierat a ľudí. Mikroplasty (MP) sa zvyčajne definujú ako častice s veľkosťou od  $1 \mu\text{m}$  do  $5 \text{ mm}$ , ktoré obsahujú rôzne chemické zložky pochádzajúce z viacerých zdrojov.

Vzhľadom na svoju silnú hydrofóbnosť, veľkosť častíc, vysoký špecifický povrch, stabilné chemické vlastnosti a schopnosť prenášať ďalšie znečisťujúce látky zo životného prostredia (napríklad ťažké kovy a antibiotiká) majú mikroplasty schopnosť akumulovať sa, migrovať a šíriť sa v životnom prostredí.

Nedávne štúdie zistili prítomnosť mikroplastových vlákien a častíc v niektorých skupinách potravín vrátane medu, nealkoholických nápojov, studeného čaju, energetických nápojov, piva a morských plodov.

Potravinárske výrobky sú náchylné na kontamináciu mikroplastmi tromi hlavnými cestami. Vzhľadom na svoju malú veľkosť sú mikroplasty ľahko prehĺtnuté morskými a suchozemskými živočíchmi (ako sú ryby, mušle, kraby a hydina) a absorbované rastlinami, pričom sa nakoniec dostanú do ľudského tela prostredníctvom potravinového reťazca. Okrem toho je plast materiál, ktorý sa často používa na balenie potravín.

Potraviny a nápoje sú hlavnými potenciálnymi zdrojmi vystavenia MP kontaminácii v potrave. Kontaminácia pitnej vody mikroplastami vedie ku kontaminácii nápojov.

MP (vlákna  $2-79 \text{ MPs.l}^{-1}$ ) boli objavené v každej z 24 analyzovaných značiek piva. Okrem toho sa MPs našli vo všetkých slepých vzorkách (dvakrát destilovaná voda). Skúmal sa výskyt mikroplastov v 13 mexických pivách a 19 vzorkách

nealkoholických nápojov. MPs sa našli vo všetkých vzorkách; vo vzorkách piva boli hodnoty 0-28 MP $\cdot$ l<sup>-1</sup> a v prípade nealkoholických nápojov boli hodnoty 0-7 MP $\cdot$ l<sup>-1</sup>. V porovnaní s mexickými pivami bol v nemeckých pivách zaznamenaný najvyšší počet kontaminovaných vzoriek. Počet zistených MPs sa však môže líšiť v dôsledku rôznych použitých detekčných techník.

V ich výskume sa dokázalo, že deti a dospelí mužského pohlavia konzumovali z potravín a nápojov približne 113 častíc, 142 častíc, 106 častíc a 126 častíc denne.

Posúdenie kontaminácie mikroplastmi a ich distribúcie v potravinách a nápojoch je užitočné na určenie toho, ako mikroplasty ovplyvňujú rôzne potravinové výrobky, aké plastové materiály ovplyvňujú kontamináciu a ako realizovať eliminačné opatrenia.

## 11.4 Techniky použité na obmedzenie tvorby a odstraňovanie kontaminantov

### 11.4.1 Enzymatické metódy

Biologické metódy dekontaminácie pomocou mikroorganizmov (baktérií a húb), alebo ich enzýmov sa vyvinuli po roku 1960. V poslednom desaťročí sa štúdie zamerali na použitie baktérií na dekontamináciu mykotoxínov a na navrhované mechanizmy dekontaminácie. Celkovo sa skúmalo 33 druhov, od *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Lysinibacter*, *Lysinibacillus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* a *Streptomyces*, ako aj baktérie mliečneho kvasenia. V priebehu rokov sa v literatúre uvádzali rôzne mikrobiálne enzýmy z kvasiniek, baktérií a húb schopné detoxikovať mykotoxíny a transformovať AF z vína a hroznovej šťavy na menej toxické, alebo netoxické metabolity, ako napríklad *Oenococcus oeni*, *S. cerevisiae*, *Candida famata* a *A. niger*.

V literatúre sa uvádzajú dve základné metódy mikrobiálnej dekontaminácie: adsorpcia na chemické látky nachádzajúce sa v bunkových stenách (peptidoglykán, glukomanán a -D-glukán) a biotransformácia na menej toxické, alebo netoxické zlúčeniny prostredníctvom produkcie vhodných enzýmov. Aplikácia enzýmov je jedným z najväčších vplyvov biotechnológie na segment potravín a predstavuje úspešný nástroj pri riešení problémov spracovania s cieľom zlepšiť kvalitu a bezpečnosť ovocných fermentovaných nápojov pomocou nákladovo efektívnej metódy.

Všeobecne sa enzymatické techniky spracovania používajú na zlepšenie vápenatosti a skladovateľnosti s nižšou viskozitou a zákalom výrobkov. Kvalita hroznového vína a iných ovocných fermentovaných nápojov je úzko spojená s použitím enzýmov v technologickom procese. Skúmal sa vplyv bravčovej pankreatickej lipázy (PPL) imobilizovanej v uhličitanom vápenatom na degradáciu PAT v jablkovej šťave. Miera degradácie PAT bola viac ako 70 % a optimálne podmienky degradácie PAT boli 0,03 g $\cdot$ ml<sup>-1</sup> imobilizovanej PPL pre 1 mg $\cdot$ l<sup>-1</sup> patulínu, 40 °C a 18 hodín.

Niektoré mikroorganizmy majú schopnosť adsorpciou do svojich bunkových stien extrahovať mykotoxíny z potravinovej matrice. Približne 20 – 90 % mykotoxínov mohli adsorbovať grampozitívne baktérie a kvasinky v rôznych tekutých potravinových systémoch. Vzhľadom na ich priaznivé účinky na ľudské zdravie a životné prostredie sa v potravinárskom sektore uprednostňujú biologické materiály, ako sú mikrobiálne bunkové steny, peptidoglykány, chitosan, chitín a enzýmy. Medzi ich nevýhody však

patrí nižší stupeň účinnosti a vyššie náklady v porovnaní s chemickými a fyzikálnymi metódami.

Bolo vykonané, *Lactiplantibacillus plantarum* bol zapuzdrený v polymérnej matrici zloženej z polyvinylalkoholu a alginátu. Výsledky ukázali, že koncentrácia 0,5 g.ml<sup>-1</sup> vytvorených komplexov odstránila viac ako 50 % OTA z kontaminovaných červených vín. Ukázalo sa, že kvasinkové bunky majú veľký potenciál na použitie ako spoľahlivá a bezpečná technika na extrakciu OTA z tekutých matric. Zistilo sa, že po dvoch dňoch inkubácie *Rhodospiridium paludigenum* pri 28 °C sa hladina PAT v bujóne s výživnými kvasinkami s obsahom 10 mg.l<sup>-1</sup> znížila o 100 %. Tieto výsledky ukazujú spôsob použitia *Rhodospiridium paludigenum* a jeho purifikovaného enzýmu na detoxikáciu patulínu v produktoch získaných z ovocia. Keď sa do hroznových štiav pridali autoklávované bunky *Candida intermedia*, buď voľne plávajúce, alebo viazané v magnetických alginátových guľôčkach, koncentrácia OTA sa výrazne znížila o takmer 80 % z pôvodnej úrovne.

#### 11.4.2 Chemické metódy

Chemické postupy zahŕňajú metódy, ako je ošetrovanie chlórnanom, amoniak, ošetrovanie ozónom, ošetrovanie alkalickým peroxidom vodíka, chemické adsorbenty a potravinové prísady na detoxikáciu mykotoxínov v alkoholických nápojoch. Ošetrovanie chemickými látkami môže účinne zničiť štruktúru mykotoxínov použitím silných oxidantov, kyselín, zásad a iných chemických látok. Spomedzi nich má ozón schopnosť oxidovať dvojitzú väzbu štruktúry mykotoxínov a tvorí produkty s nižšou toxicitou, a preto sa uplatňuje na rozklad PAT, OTA a trichotecénu s cieľom zvýšiť bezpečnosť nápojov. Ozón je výhodnejší ako iné chemické oxidačné činidlá vzhľadom na to, že je dostupný v plynnej aj vodnej forme na aplikáciu; existuje množstvo prekursorov ozónu; nezanecháva žiadne stopy (rezíduá); nie je s ním spojená nebezpečná likvidácia; a je možná výroba ozónu na mieste. Bolo zistené, že 10 minút pôsobenia plynov obsahujúcich 7 a 12 mg.l<sup>-1</sup> kyslíka znížilo koncentráciu PAT v jablkovej šťave o 64,77 a 81,66 %. Okrem toho sa na rozklad mykotoxínov úspešne použila kyselina askorbová (vitamín C), oxid siričitý, tiamín (vitamín B<sub>1</sub>), vitamín B<sub>6</sub> a pantotenát vápenatý. Výrobcovia džúsov však tieto látky obmedzujú kvôli vplyvu na výživné zložky džúsu. Mykotoxíny sa absorbujú pomocou chemických adsorbentov, ako sú magnetické guľôčky so sulfhydrylovým zakončením, magnetické uhlíkové nanorúrky (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNT) a propyltiolom funkcionalizovaný oxid kremičitý SBA-15. Ako adsorbenty sa využíva íl, cholestyramín, esterifikovaný glukomanán, aktívne uhlie a iné modifikované polyméry, ktoré môžu absorbovať mykotoxín v kvapalnom prostredí zo 17 % a 100 %. V súčasnosti neexistuje žiadna chemická technika na degradáciu OTA vo vínach. V nedávnej štúdii bola prezentovaná účinnosť už zdokumentovaných látok na zušľachtovanie vína vrátane bentonitu, chitosanu, kazeinátu draselného, aktívneho uhlia a eliminácia aflatoxínov B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub> z bielych aj červených vín. Pri hladine 120 g.hl<sup>-1</sup> bol bentonit najúčinnější zjemňujúcou látkou, ktorá eliminovala takmer všetky aflatoxíny z bielych aj červených vín. Prítomnosť biogénnych amínov (BA), ako sú histamín, putrescín a kadaverín, je vo fermentovaných výrobkoch veľmi častá v dôsledku metabolizmu mikroorganizmov. Hodnotilo sa odstraňovanie biogénnych amínov z vín pomocou rôznych funkcionalizovaných kremičitých materiálov (kationovýmenné materiály). Tento mezopórový materiál oxidu kremičitého

bifunkcionalizovaný kyselinami fosfonovými a sulfónovými umožnil odstránenie histamínu, putrescínu, kadaverínu, spermínu a spermidínu z vín; bolo však potrebné upraviť dávku v súlade s požiadavkami na odstránenie a počiatočnými hladinami vo vínach. Skúmali sa paramagnetické nanočastice oxidu železitého, ktoré boli syntetizované a pokryté obalmi z oxidu kremičitého, vyrobené na dva účely: Obalenie SiO<sub>2</sub> zvyšuje stabilitu nanočastíc a zároveň posilňuje interakciu medzi biogénnymi amínmi a paramagnetickými nanočasticami. Biogénne amíny boli z vína účinne odstránené pomocou slabých magnetických polí. Jednou z najdostupnejších detoxikačných techník je použitie chemických adsorbentov. Napriek tomu existuje mnoho obáv o bezpečnosť ich používania, pokiaľ ide o nepriaznivé účinky na zdravie, v dôsledku možnosti uvoľňovania nebezpečných látok z chemických adsorbentov do nápojov. Okrem toho môžu chemické adsorbenty nepriaznivo ovplyvniť sensorický profil a kvalitatívne parametre. V odlišnej štúdii sa merala hladina PAT v jablkovej šťave ošetrenej kyselinou citrónovou, hydrogenuhličitanom sodným, octom, zmesou hydrogenuhličitanu sodného a octu, práškom do pečiva a ultrafialovým (UV) žiarením. Spomedzi týchto potravinárskych prísad mali najväčší vplyv na zníženie PAT hydrogenuhličitan sodný (z 94,11 na 7,55 µg.l<sup>-1</sup>) a UV žiarenie (30 min). Skúmali sa chelatačné schopnosti kyseliny citrónovej a jej schopnosť upravovať pH, ktoré umožňujú najúčinnjšie odstraňovanie ťažkých kovov vrátane kadmia, niklu a olova z výrobkov z ovocných štiav. Ďalšou výhodou navrhovaného postupu je, že komplex vytvorený citrátom má jasnú kryštalickú štruktúru a dá sa jednoducho odstrániť pomocou odstredivky, alebo filtra.

Chemické metódy sú jednoduché na použitie a relatívne dostupné, ale ich hlavnou nevýhodou je toxicita ich zvyškov a vedľajších produktov.

### 11.4.3 Fyzikálne metódy

Fyzikálne metódy detoxikácie navrhujú na zníženie koncentrácie mykotoxínov v nápojoch použiť fyzikálnu adsorpciu, filtráciu cez mikropórové membrány, mikrovlnné žiarenie, UV žiarenie, gama žiarenie, tepelné spracovanie, technológiu pulzného svetla (PL) a vysokotlakové spracovanie (HPP). Mykotoxíny sú veľmi odolné voči degradácii tepelným spracovaním, ako je pasterizácia a destilácia. Filtrácia vína pomocou 0,45 mm membrány znížila obsah OTA až o 80 %. Bola zaznamenaná schopnosť proteínov odstrániť OTA v pomere 80 – 94 % z čínskeho červeného vína po ošetrení vajíčkcom v množstve 0,20 mg.ml<sup>-1</sup> a odstreďovaní počas 48 h. Na odstránenie mykotoxínov z ovocných nápojov sú najbežnejšími adsorpčnými materiálmi, ktoré sú schopné účinne obalovať a imobilizovať mykotoxín, aktívne uhlie, mikroporézna živica a diatomit. V uskutočnenej štúdii sa pri mikrovlnnom ošetrení PAT v marhuľovej šťave počas 15 min dosiahol 95 % pokles, pričom nedošlo k významným zmenám sensorického profilu. V súčasnosti sa technológia ožarovania kvôli obavám spotrebiteľov v potravinárskom sektore často nepoužíva. UV žiarenie však preukázalo dobrú účinnosť pri degradácii PAT v jablčnej šťave a jablčnom mušte. S cieľom čo najmenej zmeniť kvalitu ovocných štiav sa dospelo k záveru, že degradáciu mykotoxínov v ovocných šťavách by mohlo uľahčiť ožarovanie dávkami do 10 kGy. Parametre ako teplota/čas ovplyvňujú degradáciu mykotoxínov. Tepelné ošetrenie sa môže kombinovať s HPP na urýchlenie degradácie mykotoxínov vo výrobkoch. HPP je nová technológia netepelného spracovania potravín, pri ktorej sa krátkodobo

používa tlak 100 MPa až > 1 000 MPa a ktorá má oproti tradičným technikám tepelného spracovania niekoľko výhod vrátane zachovania čerstvosti, chuti, štruktúry, vzhľadu a farby a zníženia straty výživovej hodnoty výrobkov. V súčasnosti sa HPP bežne využíva ako netepelná potravinárska technika na pasterizáciu ovocných štiav a nápojov. Bolo preukázané zníženie PAT pri ošetroení HPP 600 MPa až o 31 % v zmesiach ovocných štiav. Okrem toho sa uvádza, že ošetroenie jablčnej šťavy HPP znižuje koncentráciu PAT až o 51 %. Novou technikou netepelného spracovania potravín je pulzné svetlo (PL), ktoré využíva krátke, vysoko intenzívne svetelné impulzy na odstránenie mykotoxínov z výrobku. V porovnaní s konvenčnými nástrojmi PL minimalizuje škodlivé účinky a zachováva nutričné a sensorické vlastnosti. V rôznych štúdiách jablková šťava a jablkové pyrė ošetroené dávkami PL 2,4 a 35,8 J.cm<sup>-2</sup> zabezpečili zvýšenie PAT o 22 % a 51 %. Fyzikálne metódy sa môžu uplatňovať v nápojovom priemysle, ale s určitými obmedzeniami, pokiaľ ide o ožarovanie, ktoré má negatívny vplyv na výživovú hodnotu, antioxidačné a sensorické vlastnosti výrobku. HHP a LP možno považovať za nástroje riadenia rizík na zvýšenie hladiny mykotoxínov v nápojoch.

#### **11.4.4 Postupy biologickej dekontaminácie**

Dekontaminácia pomocou mikroorganizmov má mnoho výhod, ako je účinnosť proti rôznym mykotoxínom, je šetrná k životnému prostrediu, neobsahuje chemikálie, adsorbuje mŕtvu biomasu a je možné ju použiť počas fermentačnej fázy, ale stále existujú určité obmedzenia. Patrí k nim obmedzená implementácia a nízky potenciál ako metódy detoxikácie pri aplikácii na potraviny. V štúdiách sa skúmala biologická detoxikácia mykotoxínov; chýba však výskum týkajúci sa jej potenciálu v oblasti potravín a nápojov. Bolo predstavené inovatívne zariadenie, ktoré by sa mohlo použiť na odstránenie mykotoxínov z nápojov. Zariadenie má probiotické biofilmy LAB pripevnené k špeciálnej kazete; v dôsledku toho, že tekutiny prúdia cez tieto adsorbenty, dochádza k detoxikácii tekutiny. Použitie baktérií mliečneho kvasenia a určitých druhov kvasiniek, ktoré môžu odstraňovať mykotoxíny z potravín, ako je pivo, víno a ovocné nápoje, je pre spotrebiteľov prijateľné. Mikrobiálne kontrolné techniky môžu zhoršiť kvalitu výrobku tým, že absorbujú živiny a uvoľňujú metabolity do potravinového reťazca, napriek tomu, že biologická kontrola je šetrná k životnému prostrediu a má zdravotné vlastnosti. Redukcia mykotoxínov je však v porovnaní s inými metódami účinná a rýchlejšia.

Biokontrola fermentovaných potravín a nápojov vyvolala značný záujem ako sľubná nízkonákladová, prirodzená a bezpečná možnosť zabezpečenia kvality a bezpečnosti, ktorá spĺňa súčasné požiadavky spotrebiteľov na jasné označovanie a minimálne spracované potraviny. Znamená to použitie mikrobiálnych kultúr a/, alebo ich enzýmov, alebo antimikrobiálnych metabolitov na zabránenie, alebo obmedzenie rastu húb, alebo na účely detoxikácie mykotoxínov prostredníctvom väzby na bunkové steny, alebo rozkladu na menej toxické, alebo netoxické zlúčeniny. Medzi výhodami tohto prístupu sa vyzdvihuje široké spektrum potravinárskych aplikácií vďaka existujúcej širokej škále baktérií a kvasiniek s biokonzervačnými vlastnosťami. Napriek tomu, že sa preukázalo, že niektoré mikroorganizmy znižujú biologickú dostupnosť mykotoxínov, stále ich nedokážu úplne absorbovať/zlikvidovať. Použitie mikrobiálnych



konzorcií teda predstavuje potenciálnu metódu účinnej spoludegradácie viacerých mykotoxínov.

Je potrebný ďalší výskum na objasnenie špecifických mechanizmov viazania/degradácie mykotoxínov vrátane toxikologických štúdií metabolitov a na stanovenie optimálnych podmienok na použitie týchto procesov vo veľkom priemyselnom prostredí. Prioritou by mal byť aj vývoj rekombinantných degradačných enzýmov schopných degradovať multi-toxíny. Zároveň sa musí preskúmať vhodnosť použitia kombinovaných kmeňov pre rôzne potravinárske aplikácie a zmesi mykotoxínov so zameraním na zlepšenie účinnosti detoxikácie. Okrem toho sa musí posúdiť fyzikálno-chemický, sensorický a nutričný profil fermentovaných nápojov po detoxikácii mykotoxínov.

Trh s ovocnými fermentovanými nápojmi zahŕňa inovatívne a tradičné nápoje, ktoré si získali uznanie spotrebiteľov vďaka svojim jedinečným a prekvapujúcim sensorickým vlastnostiam a pozitívnemu vplyvu na ľudské zdravie. Na druhej strane, zníženie vedľajších produktov a odpadu z ovocia možno dosiahnuť vývojom nových fermentovaných nápojov. Bez ohľadu na stav surovín (t. j. celé ovocie, časť ovocia, vedľajší produkt, odpad) vstupujúcich do výrobného procesu môže byť konečný výrobok vystavený biologickým, fyzikálnym, alebo chemickým rizikám. Príčiny rizika môžu mať viacero a rôznych zdrojov; maximálne úrovne sa môžu líšiť a sú regulované rôznymi právnymi predpismi, ale zníženie, alebo, ak je to možné, odstránenie akéhokoľvek rizika je v centre pozornosti každého národného a medzinárodného orgánu a výrobcu potravín. Informovanie a uvedomenie si akéhokoľvek potenciálneho rizika, ktoré môže kontaminovať fermentované nápoje na báze ovocia, je teda prvým krokom pri vypracúvaní akéhokoľvek postupu určeného na zvýšenie bezpečnosti potravín.

Je mimoriadne dôležité, aby výrobcovia poznali techniky používané na obmedzenie tvorby kontaminantov a ich odstránenie. Jedným z najvýznamnejších vplyvov biotechnológií na potravinársky priemysel je používanie enzýmov, ktoré sú úspešnou technikou na riešenie problémov pri spracovaní a prakticky zvyšujú kvalitu a bezpečnosť ovocných fermentovaných nápojov. Často využívané dekontaminačné techniky využívajú mikroorganizmy schopné adsorbovať vo svojich bunkových stenách mykotoxíny z potravinovej matrice a urobiť ich menej toxickými, alebo netoxickými. Detoxikácia alkoholických nápojov od mykotoxínov sa môže vykonávať pomocou chemických úprav, ktoré zahŕňajú ošetrovanie chlórnanom, amoniak, ošetrovanie ozónom, ošetrovanie alkalickým peroxidom vodíka, chemické adsorbenty a potravinové prísady.

Zdôrazňujeme význam informovania výrobcov o potenciálnych rizikách, ktoré môžu ohroziť bezpečnosť fermentovaných nápojov na báze ovocia, a ich informovanosť o technikách na ich zníženie, alebo odstránenie.

## **12 Biotechnologický potenciál kávovej dužiny a kávových šupiek pre bioprocessy**

V posledných rokoch sa zvyšuje trend efektívneho využívania a pridávania hodnoty agropriemyselných zvyškov, ako sú kávové výlisky a šupky, výlisky z manioku, výlisky z cukrovej trstiny, výlisky z cukrovej repy, jablkové výlisky atď. Bolo vyvinutých

niekoľko procesov, ktoré ich využívajú ako suroviny na výrobu objemových chemikálií a jemných produktov s pridanou hodnotou, ako sú etanol, jednobunkové bielkoviny (SCP), huby, enzýmy, organické kyseliny, aminokyseliny, biologicky aktívne sekundárne metabolity atď. Použitie agropriemyselných zvyškov v bioprocsoch na jednej strane poskytuje alternatívny substrát a na druhej strane pomáha riešiť problém znečistenia, ktorý inak môže spôsobiť ich likvidácia. S príchodom biotechnologických inovácií, najmä v oblasti enzýmovej a fermentačnej technológie, sa otvorili mnohé nové možnosti ich využitia. V tomto príspevku chceme diskutovať o biotechnologickom potenciáli vedľajších produktov kávového priemyslu – kávovej dužiny a šupiek na pridávanie hodnoty.

## 12.1 Káva

Káva (*Coffea* spp.) je jednou z najdôležitejších poľnohospodárskych komodít na svete. *Coffea arabica* a *Coffea robusta* sú dve hlavné odrody tohto rodu, ktoré sa pestujú na celom svete na komerčné účely. Káva sa tradične pestuje pod korunami vysokých lesných stromov, alebo v medziplodinách ovocných stromov, ako sú banány, citrusy, alebo strukoviny, ktoré produkujú iné cenné potraviny, drevo, palivové drevo a krmoviny. Tento tieňový baldachýn zároveň udržateľne podporuje samotné kávovníky. Od 70. rokov 20. storočia sa však kávovníková plantáž dramaticky zmenila, pokiaľ ide o štruktúru pestovania a postupy, najmä s cieľom uspokojiť vysoký dopyt po káve a bojovať proti hubám na listoch. S vývojom hybridných odrôd kávy sa "káva v tieni" zmenila na "kávu na slnku". V súčasnosti sa vo viac ako 50 krajinách vyprodukuje približne milión ton kávy ročne. V rôznych fázach od zberu až po spracovanie a spotrebu vzniká ročne viacero zvyškov, a to kávová dužina, alebo šupka, listy a mletá káva v množstve viac ako dva milióny ton. Brazília je najväčším producentom kávy na svete. V roku 1998 sa vyprodukovalo približne 30 miliónov vriec zelenej kávy.

### 12.1.1 Priemyselné spracovanie kávových čerešní

Priemyselné spracovanie kávových čerešní sa vykonáva s cieľom izolovať kávový prášok odstránením škrupiny a slizovej časti z čerešní. Existujú dve metódy: suché a mokré spracovanie. V závislosti od spôsobu spracovania kávových čerešní, t. j. mokrého, alebo suchého procesu, sa získané pevné zvyšky (vedľajšie produkty) označujú ako dužina, resp. šupka. V Brazílii sa kávové čerešne vo všeobecnosti spracúvajú suchou metódou, pričom vzniká kávová šupka, ktorá je bohatá na organické látky a živiny. Obsahuje aj zlúčeniny, ako sú kofeín, triesloviny a polyfenoly. Zloženie kávovej šupky sa líši od kávovej drene. Kávové listy, ktoré sa väčšinou zbierajú počas zberu, sa vo všeobecnosti nepovažujú za zvyšky, ale ich objem počas zberu a po ňom spôsobuje ťažkosti pri manipulácii s plodinou. Uľahčuje tiež epidémiu patogénov a škodcov. Mletá káva, zvyšok získaný počas spracovania surového kávového prášku na prípravu instantnej kávy, je ďalším zvyškom získaným z kávového priemyslu. Aj ten obsahuje kofeín, triesloviny a polyfenoly, hoci v menšom množstve. Vzhľadom na prítomnosť týchto zlúčenín (kofeín, triesloviny a polyfenoly) vykazujú tieto organické tuhé zvyšky toxický charakter, a preto sa nevyužívajú prospešne. To viedlo aj k problému znečistenia životného prostredia.

## Zloženie károvej dužiny a šupiek

Zloženie károvej dužiny sa líši od zloženia kárových šupiek, hoci charakter zlúčenín prítomných v oboch je do značnej miery podobný. Môžu existovať rozdiely v percentuálnom zložení zložiek v závislosti od spôsobu a účinnosti spracovania, odrody plodiny, podmienok pestovania, ako je typ pôdy atď.

Kofeín je aktívna zlúčenina, jeden z najsilnejších a najnávykovejších prírodných stimulantov. Je hlavnou látkou spôsobujúcou mierny stimulačný účinok kávy. Je prítomný aj v károvej dreni a šupkách v koncentrácii približne 1,3 % v sušine. Triesloviny sa všeobecne považujú za antinutričný faktor a bránia tomu, aby sa kárová dužina používala vo väčšom množstve ako 10 % v krmive pre zvieratá. Diskutovalo sa o antinutričných účinkoch trieslovín v krmivách pre zvieratá. Informácie o trieslovinách v károvej dužine sú niekedy rozporuplné a údaje, ktoré sú k dispozícii, sa niekedy ťažko interpretujú, pretože sa použili nešpecifické analytické metódy. V závislosti od typu odrody sa môže líšiť aj obsah trieslovín. Napríklad kárová dužina z odrody so žltými plodmi bola výrazne bohatšia na kondenzované triesloviny (proantokyanidíny) ako dužina z príbuznej odrody s červenými plodmi.

Boli prezentované údaje o obsahu kondenzovaných trieslovín, (alebo proantokyanidínov) v károvej dužine. Títo autori izolovali z károvej dužiny niekoľko proantokyanidínov. Proantokyanidíny sú polymérne polyfenoly, ktoré inhibujú klíčenie uredospór *Hemileia vastatrix in vitro*. Na rozdiel od viacerých správ je zaujímavé, že v károvej dužine získanej z piatich vzoriek kárových zŕn sa nenašli žiadne hydrolyzovateľné taníny. Medzi rôznymi autormi opisujúcimi obsah pektínov v kárových čerešniach sú tiež rozpory. Hlavnou zložkou bola kyselina chlorogénová (kyselina 5-kafeoylchinová) (42,2 %). Ďalšími zlúčeninami boli epikatechín (21,6 %, kyselina izochlorogénová I, II a III, 5,7, 19,3, resp. 4,4 %), katechín (2,2 %), rutín (2,1 %), kyselina protokatechová (1,6 %) a kyselina ferulová (1,0 %). Medzi kultivarmi károvníkov odolných a náchylných na károvú hrdzu listovú neboli zistené žiadne kvalitatívne ani kvantitatívne rozdiely. Autor upozornil, že tieto hodnoty by sa nemali považovať za absolútne hodnoty, pretože obsah zlúčenín v károvej dužine sa môže čas od času meniť. Zároveň dodal, že je zbytočné pokúšať sa o kvantitatívne porovnanie károvej miazgy z rôznych odrôd.

### 12.1.2 Prírodná mikrobiota izolovaná z károvej dužiny/šupky

Hoci sa na károvej dužine a šupkách kultivovalo niekoľko baktérií, kvasiniek a húb na rôzne účely, preferované a najčastejšie používané sú vláknité huby, najmä bazídiomycéty. Hodnotila sa prirodzená mikrobiota prítomná v károvej dužine a šupkách, ktorá odhalila prítomnosť širokej škály mikroorganizmov vrátane baktérií, kvasiniek a húb. V kárových šupkách bola populácia húb o niečo vyššia ako populácia baktérií a kvasiniek, ale v károvej dužine vykazovali všetky tri druhy takmer podobné rozloženie. Bolo izolovaných a vyšetrených 248 kultúr húb z károvníkov a pôdnych vzoriek z oblastí károvníkových plantáží. Použila sa technika trojstupňového výberu. Po druhom kroku bolo vybraných celkovo 13 izolátov (sedem *Aspergillus* a šesť *Penicillium* spp.), ktoré boli podrobené tretiemu kroku. Na základe produkcie enzýmov v SSF sa tri kmene *Aspergillus niger* a jeden kmeň *Penicillium* spp. ukázali ako najvhodnejšie na kultiváciu na károvej dreni.

### 12.1.3 Bioprocessy využívajúce kávovú dužinu a šupky

#### Systém kultivácie

Procesy kultivácie mikroorganizmov na kávovej dužine a šupkách možno vo všeobecnosti rozdeliť do dvoch skupín: procesy založené na fermentácii v kvapalnom prostredí (SmF) a procesy založené na fermentácii v pevnom stave (SSF). SSF sa vo všeobecnosti uprednostňuje pred SmF so zámerom znížiť náklady na bioprocess.

#### Optimalizácia bioprocessov pomocou experimentov s faktorovým dizajnom

Jedným z prístupov k optimalizácii parametrov bioprocessu s použitím kávových šupiek a dužiny bolo použitie faktorového dizajnu a experimentov s povrchovou odozvou. V rámci týchto experimentov sa vo všeobecnosti optimalizovali fyzikálne, chemické a biochemické faktory, ako sú pH a vlhkosť substrátu, teplota a doba inkubácie, veľkosť inokula, prídanie ďalšieho uhlíka, dusíka, alebo iných živín atď. Pomocou niekoľkých experimentov s faktorovým dizajnom sa tak mohli vybrať najvýznamnejšie faktory na optimalizáciu v danom rozsahu. Získané údaje sa podrobili analýze rozptylu (ANOVA). V prvom kroku sa vykoná analýza vplyvu parametrov procesu na produkciu experimentálnych zlúčenín. Vyberie sa hodnota každej premennej na troch úrovniach (dve úrovne a jeden stredný bod, -1, 0 a +1). Experimentálna matica môže pozostávať z viacerých parametrov, ako sú pH, počiatočný obsah vody, teplota inkubácie, koncentrácia cukrov a veľkosť inokula, a vykoná sa niekoľko sérií. Údaje možno vyjadriť v Paretovom grafe pre každý účinok, ktorý bol opísaný ako užitočný nástroj na určenie toho, ktoré odhadované účinky sú najdôležitejšie. Vykreslenie grafov povrchu pri rôznych úrovniach zvoleného parametra ukazuje zvýšenie, alebo zníženie odozvy pri zmene parametra. Z grafu možno vybrať štatisticky významné parametre. Potom sa na určenie odozvy vykreslia povrchové grafy pri rôznych úrovniach.

S cieľom otestovať vplyv parametrov procesu na kultúru na produkciu prchavých zlúčenín sa vykonali dva štatistické experimentálne návrhy na optimalizáciu produkcie aromatických zlúčenín mikroorganizmom *Kluyveromyces marxianus* pri fermentácii v pevnom stave s použitím faktorového dizajnu a povrchovej odozvy. Skúmanými parametrami boli pH substrátu, prídavok glukózy, teplota kultivácie, počiatočná vlhkosť substrátu a veľkosť inokula. Pomocou 25-faktorového dizajnu sa zistilo, že prídavok glukózy a počiatočné pH substrátu sú štatisticky významné pre palmové otruby. Hoci tento experimentálny plán nepreukázal prídavok glukózy ako významný faktor pri maniokových výliskoch, 22-faktorový plán odhalil, že prídavok glukózy bol významný pri vyšších koncentráciách. Podobný dizajn použili aj pri svojich štúdiách biologickej detoxikácie kávových šupiek pomocou vláknitých húb pri fermentácii v pevnom stave. Prvý krok SSF s použitím *Aspergillus* spp. na detoxikáciu kávových šupiek spočíval vo využití 23-0 faktorového plánu s tromi skúmanými faktormi: pH a vlhkosť substrátu a teplota fermentácie. Výsledky boli podrobené analýze ANOVA a po vylúčení nevýznamných vplyvov údaje získané pri detoxikácii kávových šupiek ukázali, že významnými faktormi na úrovni spoľahlivosti 5 % boli pH substrátu a teplota fermentácie. V druhom kroku optimalizácie sa použili len dva faktory, a to pH substrátu (3,0 – 5,0) a teplota fermentácie (26 – 30 °C). Výsledky boli podrobené analýze ANOVA. Zmena pH viedla k zvýšeniu miery degradácie na úrovni 5 %.

#### 12.1.4 Produkty a aplikácie

Tradične sa kávová dužina a šupky využívali len v obmedzenej miere ako hnojivá, krmivo pre hospodárske zvieratá, kompost atď. Tieto aplikácie využívali len zlomok dostupného množstva a neboli technicky veľmi účinné. Nedávne pokusy sa zamerali na jej použitie ako substrátu v bioprosociach a vermikompostovaní. Uskutočnili sa aj pokusy o jeho detoxikáciu na zlepšenie jeho použitia ako krmiva a na jeho využitie ako účinného substrátu na výrobu viacerých produktov s pridanou hodnotou, ako sú enzýmy, organické kyseliny, chuťové a aromatické zlúčeniny, huby atď. Keďže tieto subprodukty obsahujú veľké množstvo fermentovateľných cukrov, predstavujú vhodný substrát na kultiváciu húb a kvasiniek.

#### Produkcia enzýmov

Jedným z prvých prístupov k využitiu kávovej dužiny a šupiek bola výroba enzýmov, ako sú pektináza, tanáza, kofeináza atď. Na výrobu pektinázy sa uskutočnila SSF s použitím kávovej dužiny. Jeden z kmeňov, *A. niger* V22B35, produkoval štyrikrát viac enzýmu ako referenčný kmeň *A. niger* CH4. Bola tiež zaznamenaná produkcia pektinázy v SSF a SmF (z kávovej dužiny) s použitím hyperproduktujúcich mutantov *A. niger*. Zistilo sa, že úroveň aktivity vody zohráva dôležitú úlohu pri účinnosti kultúry. Špeciálne selektívne médiá pomohli získať kmene prispôsobené na SSF, alebo SmF kávovej dužiny.

Skúmal sa metabolizmus bielkovín, sacharidov a lipidov počas anaeróbnej fermentácie kávovej drene. Vo fermentore sa produkovali celulózy, proteáza, b-amyláza,  $\beta$ -glukozidáza a lipáza a aktivita enzýmov bola vyššia v kávovej dužine v porovnaní s fermentorom kravského hnoja.

#### Produkcia húb

Vďaka ich dobrým organoleptickým vlastnostiam, chuti a vôni a dobrým nutričným a terapeutickým hodnotám sa pestovanie húb na celom svete výrazne rozšírilo. Dobrý potenciál v tomto smere ponúkajú viaceré agropriemyselné zvyšky. Hoci prvé pokusy o pestovanie húb na zvyškoch kávového priemyslu sa uskutočnili už pred viac ako 10 - 15 rokmi, doteraz sa toho veľa neurobilo a k dispozícii je len málo publikovaných informácií. Nedávno sa uskutočnila systematická štúdia o pestovaní *Lentinus edodes*, *Pleurotus* spp. a *Volvariella* spp. s použitím rôznych zvyškov, ako sú kávové šupky, listy a mletá káva, jednotlivo, alebo v zmesi. Štúdie o kultivácii *L. edodes* ukázali, že po 20 dňoch rastu na neošetrenej kávovej šupke mycélium regredovalo a vlhkosť sa zvyšovala. Nedošlo k vytvoreniu plodnice. Ošetrenie kávových šupiek horúcou vodou (varenou vo vode a filtrovanou) sa ukázalo ako užitočné pre ich využitie ako substrátu hubovou kultúrou. To viedlo k dobrému rastu mycélia a získali sa dobré plodnice. Biologická účinnosť dosiahla 85,8 %. Keď sa použil kmeň *Pleurotus* spp., prvá fruktifikácia nastala po 20 dňoch od inokulácie. Biologická účinnosť dosiahla 96,6 %. Dospelo sa k záveru, že kávové šupky by sa mohli použiť na kultiváciu týchto húb. Rast týchto druhov húb viedol k zvýšeniu obsahu bielkovín a zníženiu obsahu vláknien v kávových šupkách. Biotechnologický pokrok by mohol viesť k účinnému a ekonomickému spôsobu využitia tohto inak nevyužívaného zvyšku a zlepšiť ekonomiku kávového priemyslu.

## Kyselina citrónová a kyselina gibberelová

Kávové šupky sa použili na výrobu kyseliny citrónovej pri fermentácii v pevnom stave s použitím kmeňov *Aspergillus* spp. Ukázalo sa, že kávové šupky viedli k vyššej produkcii kyseliny citrónovej ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  substrátu) ako pšeničné otruby, ryžové otruby a odolejované ryžové otruby. Výťažky na základe množstva spotrebovaného škrobu/cukru boli takmer podobné v prípade lisovaného bahna z cukrovej trstiny a kávových šupiek. Použili sa kávové šupky s prímiesou hydrolyzáta z výliskov manioku. Produkcia kyseliny citrónovej dosiahla  $12,72 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  sušiny. Zistilo sa, že pridávanie minerálnych iónov, ako sú zinok, meď, železo a horčík, je užitočné pre rast a aktivitu húb pri produkcii kyseliny citrónovej. Tieto štúdie ukázali možnosť použitia kávových šupiek ako substrátu v SSF.

V nedávnej práci bola zaznamenaná produkcia gibberelínov (rastlinných hormónov) v SmF a SSF s využitím kávových šupiek ako zdroja uhlíka. Na porovnanie sa použilo päť kmeňov *Gibberella fujikuroi* a jeden jej nedokonalý kmeň *Fusarium moniliforme*. Výsledky ukázali produkciu kyseliny gibberelovej (GA3) vo všetkých fermentovaných vzorkách. SSF sa ukázala byť lepšia ako SmF.

## Aromatické zlúčeniny

Novým prístupom k zvyšovaniu hodnoty kávových šupiek bolo ich použitie ako substrátu na výrobu aromatických zlúčenín pre potravinársky priemysel pomocou kvasiniek a húb. V celosvetovom meradle došlo k pozoruhodnému posunu vo výbere spotrebiteľov pre prirodzene vyrábané potravinové a aromatické zlúčeniny (v porovnaní so syntetickými) na ľudské použitie. Výroba aromatických zlúčenín fermentačným spôsobom má teda sľubnú budúcnosť. V SSF sa na syntézu aromatických zlúčenín použili kvasinky *Pachysolen tannophilus*. Výsledky použitia kávových šupiek a extraktu z kávových šupiek ukázali prevahu kávových šupiek upravených parou. Kultúra kvasiniek vytvorila silnú alkoholovú arómu s ovocnou príchuťou. Okrem etanolu, ktorý bol hlavnou produkovanou zlúčeninou, kultúra produkovala aj acetaldehyd, etylacetát, izobutanol, izobutylacetát a etyl-3-hexanoát a izoamylacetát, čím vznikla silná ananásová aróma. Po pridaní leucínu do média sa zistila silná banánová vôňa so zvýšeným množstvom izoamylalkoholu a izoamylacetátu.

## Produkcia bioplynu

Uskutočnili sa pokusy o využitie zvyškov kávovníkového priemyslu, najmä kávovej dužiny a šupiek, na výrobu bioplynu v anaeróbnej digescii. Podľa odhadov by sa z jednej tony kávovej dužiny mohlo anaeróbnou digesciou vyrobiť približne  $131 \text{ m}^3$  bioplynu, čo by palivovou hodnotou zodpovedalo 100 litrom benzínu. Skúmala sa anaeróbná digescia tuhého kávového odpadu v jednofázovom, alebo dvojfázovom systéme. Zistilo sa, že spracovanie v dvojfázovej metánovej fermentácii by mohlo byť užitočné pri použití samotného kávového odpadu ako substrátu. Cieľom bolo vyvinúť bioplynovú technológiu na spracovanie odpadov z kávového priemyslu a vyhodnotenie fermentovaného materiálu ako rastového média pre záhradníctvo.

V Tanzánii sa uskutočnila prípadová štúdia s cieľom preskúmať možnosť využitia agropriemyselných zvyškov, ako sú tuhé odpady z kávového priemyslu (buničina), sisalová buničina, cukrový filter, kukuričné otruby atď. na výrobu bioplynu a elektrickej energie a riešenie energetických potrieb krajiny. Tuhé zvyšky kávy Robusta a Arabica

vyprodukovali približne 650 a 730 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub> na tonu prchavých pevných látok, čo bolo najviac v porovnaní s ostatnými agropriemyselnými zvyškami (230, 400 a 450 m<sup>3</sup> v prípade cukrového filtra, sisalu a kukuričných otrúb).

## **Produkcia krmív**

### **Pre hovädzí dobytok**

Jedným zo súčasných spôsobov využitia kávovej dužiny je jej použitie ako krmiva pre zvieratá. Kávová dužina s priemerným obsahom približne 50 %, 10 %, 2,5 % a 18 % sacharidov, bielkovín, tukov a vlákniny sa javí ako užitočný doplnok krmiva pre zvieratá. Na jej zhodnotenie z hľadiska výživy zvierat sa uskutočnilo niekoľko štúdií. Nízky príjem krmiva, stráviteľnosť bielkovín a zadržiavanie dusíka sú hlavnými faktormi, ktoré obmedzujú používanie kávovej drviny ako krmiva pre zvieratá. Zdá sa, že tieto účinky sú spôsobené prítomnosťou kofeínu, trieslovín a iných polyfenolov v kávovej dužine. Kávovú dužinu by bolo najlepšie považovať za možnú krmnú zložku, ak by sa antifyziologické (antinutričné) faktory mohli odstrániť, alebo neutralizovať, alebo aspoň degradovať na minimálnu úroveň. V nedávnom prehľade sa diskutovalo o použití niekoľkých netradičných krmív vrátane kávovej dužiny. Obhajovalo sa, že tieto látky robia krmnú dávku nepríjemnou a pre zvieratá neprijateľnou. Okrem toho narúšajú biologickú dostupnosť a využitie živín. Spomedzi rôznych spôsobov ich detoxikácie by mohla byť atraktívnym spôsobom fermentácia. Hodnotila sa výživná hodnota silážovanej kávovej dužiny doplnenej stonkami cukrovej trstiny, vrcholmi cukrovej trstiny, trávou (*Mennisetum purpureum*), alebo sesbaniou. Na základe kvality a chutnosti bola lepšia pasterizovaná silážovaná káva.

### **Krmivo na iné účely**

Uskutočnili sa aj štúdie na využitie kávovej dužiny ako krmnej zložky pre ryby atď. Pokusy vykonané s cieľom určiť účinnosť kávovej dužiny ako zložky krmiva používaného pri chove kapra obyčajného (*Cyprinus carpio* L.) a sumca veľkého (*Clarias mossambicus* Peters) viedli k zníženiu miery rastu. Autori tvrdili, že tieto výsledky by sa mohli použiť na prognózu štruktúry nákladov rybej farmy. Existuje niekoľko ďalších správ opisujúcich použitie kávovej drene v krmive.

### **Kompostovanie/vermikompostovanie**

Jedným z ďalších tradičných spôsobov využitia kávovej dužiny je jej použitie ako kompostu. Vo všeobecnosti sa využíva systém otvorených hromád, čo nie je účinná metóda, pretože vedie k získaniu produktu s nedostatočnými žiaducimi vlastnosťami. Hlavnou príčinou je to, že makro- a mikrofauny, ako sú *Acarida*, *Coleoptera*, *Collembola*, *Diptera*, *Eisenia*, *Oligochaeta*, *Perionyx*, *Thysanoptera* atď., rastú vo všeobecnosti vo vrchných vrstvách hromád bez hlbšieho prieniku. Ako atraktívna alternatíva sa navrhlo vermikompostovanie, ktoré využíva výhody biologických a fyziologických schopností rastúcej makrofauny v pevných zvyškoch. V kávovej dužine sa nachádza niekoľko druhov dážďoviek, ako napríklad *Amyntas gracilis*, *Dichogaster* spp., *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, *Perionyx excavatus* atď. Tieto by sa mohli výhodne využiť na vermikompostovanie. Na vermikompostovanie sa použila dážďovka *E. fetida* a ukázalo sa, že tento proces je veľmi účinný. Prehltnutie miazgy dážďovkou viedlo k zvýšeniu obsahu prístupného P, Ca a Ng, ale k zníženiu obsahu K. V nedávnom prehľade sa skúmali rôzne príklady vermikompostovania

kávovej dužiny. Dospeli k záveru, že vermikompostovanie kávovej dužiny je technicko-ekonomicky uskutočniteľné a užitočné pri spracovaní tohto obrovského a významného tuhého odpadu z kávového priemyslu.

### **Biologická detoxikácia kávovej dužiny a šupiek**

Vzhľadom na prítomnosť antifyzilogických a antinutričných faktorov sa kávová dužina a šupky nepovažujú za vhodný substrát pre biokonverzné procesy. V dôsledku toho zostáva väčšina dužiny a šupiek nevyužitá, alebo nedostatočne využitá. Ak by sa tieto toxické zložky dali odstrániť, alebo aspoň rozložiť na primerane nízku úroveň, otvorili by sa nové možnosti ich využitia ako substrátu pre bioprocesy. V tejto súvislosti sa viacerí autori zaoberali detoxikáciou kávovej dužiny a šupiek rôznymi spôsobmi. Patria sem fyzikálne, chemické a mikrobiálne metódy. Niektoré z fyzikálnych a chemických metód, hoci boli úspešné, boli nákladné a nezabezpečili ekonomickú realizovateľnosť. To viedlo k zameraniu sa na vývoj biologických metód. Na biologickú detoxikáciu kávových šupiek sa často používa SSF s použitím hubových kmeňov. Selektívnym skrútingom na agarovom médiu kávových šupiek sa porovnali tri kmene *Rhizopus* spp., ktoré vykazovali dobrý rast (radiálny rast a produkcia biomasy), s dvoma kmeňmi patriacimi medzi bazídiomycéty, konkrétne *Phanerochaete chrysosporium*, na degradáciu kofeínu a trieslovín v kávových šupkách. Obe kultúry, t. j. *Rhizopus* spp. aj *P. chrysosporium*, dobre rástli na kávových šupkách. *Rhizopus* spp. sa však ukázal byť lepší ako *P. chrysosporium*, pretože viedol k vyššej degradácii kofeínu a tanínu za relatívne kratšiu dobu. Za optimalizovaných podmienok pH substrátu, počiatkovej vlhkosti, veľkosti inokula, teploty a prevzdušňovania *Rhizopus* spp. rozložil 87 % a 65 % kofeínu a trieslovín v porovnaní so 70 % a 60 % v prípade *P. chrysosporium*. Skúmala sa degradácia kofeínu v kávových šupkách pomocou kmeňa *P. ostreatus* LPB 09. Mediá doplnené kofeínom preukázali toleranciu tohto kmeňa voči kofeínu. Rýchlosť rastu mycélia a biomasy bola 16 a 14,5 % a 65,6 a 7,6 % nižšia pri koncentrácii kofeínu 100 a 1000 g.l<sup>-1</sup>. Pri koncentrácii 2 500 g.l<sup>-1</sup> nebol zaznamenaný žiadny rast húb. Analýza mycélia odhalila prítomnosť kofeínu v ňom, čo ukázalo, že *P. ostreatus* v skutočnosti kofeín nedegradoval, ale ho akumuloval (0,575 % kofeínu v suchom mycéliu). V SSF sa koncentrácia kofeínu v rezíduu po fruktifikácii znížila o 85,4 %, avšak telo plodu obsahovalo 0,157 % kofeínu. Tvrdilo sa, že *P. ostreatus* LPB 09 by sa mohol použiť na bioremediáciu rezíduí obsahujúcich kofeín.

Niektoré bakteriálne a hubové kmene, ako napríklad *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Penicillium rouquifortii*, *Penicillium curtosum* a *Pleurotus* spp., majú schopnosť rozkladať kofeín. V nálevoch praženej kávy sa dosiahla úplná degradácia kofeínu hubovým kmeňom *P. curtosum*. Skúmala sa degradácia kofeínu hubou *Penicillium verrucosum* pri fermentácii kávovej dužiny v pevnom stave s externým prídavkom dusíka a bez neho. Výsledky ukázali, že napriek obmedzenému rastu kultúry bez externého dusíka bola degradácia kofeínu takmer úplná. Prídavok dusíkatých zlúčenín skôr inhiboval degradáciu kofeínu. Dosiahla sa značná degradácia kofeínu pomocou niekoľkých kmeňov vláknitých húb. Skúmala sa aj degradácia kofeínu a polyfenolov v kávovej dreni prostredníctvom siláže. Za rôznych podmienok spracovania sa dosiahlo zníženie obsahu kofeínu o 13 – 63 %, celkových polyfenolov o 28 – 70 % a kondenzovaných trieslovín o 51 – 81 %. Dospelo sa



k záveru, že siláž predstavuje ideálnu metódu na zníženie obsahu antifyzilogických zlúčenín v kávovej dužine.

### **Hydrolyza kávových šupiek**

Jedným z ďalších prístupov k využívaniu kávových šupiek bola ich hydrolyzácia a použitie hydrolyzáta na rôzne účely. Hydrolyza sa môže vykonávať pomocou zriedených kyselín, alebo ošetrením parou. Na hydrolyzáciu kávových šupiek sa použila zriedená kyselina sírová. Získali sa xylóza, arabinóza, fruktóza, glukóza, sacharóza a maltóza. Najvyššia koncentrácia bola arabinózy, po ktorej nasledovala glukóza. Celková účinnosť hydrolyzy bola 64 % pre celkové a 67 % pre redukujúce cukry. Porovnávala sa hydrolyza kávových šupiek s minerálnymi kyselinami a bez nich. Vo vode rozpustnú frakciu tvorili najmä cukry z hemicelulózy. Najlepšie výsledky (48,18 g.l<sup>-1</sup> redukujúcich cukrov) sa dosiahli, keď hydrolyza prebiehala pri teplote 121 °C počas 15 min bez pridania akejkoľvek kyseliny. Hydrolyzáta sa použil na výrobu kyseliny mliečnej.

Kávová vláknina a šupky ponúkajú potenciálne možnosti využitia ako substrát pre bioprosesy. Nedávne štúdie ukázali ich využiteľnosť na výrobu množstva produktov, ako sú enzýmy, aromatické zlúčeniny, huby atď. V týchto oblastiach je však potrebné ešte veľa urobiť. Optimalizácia bioprosesov pomocou faktorového dizajnu a experimentov s povrchovou odozvou by mohla byť užitočná pri výbere výrobných parametrov. Tradičné použitie kávovej drviny a kávových šupiek ako krmiva pre hospodárske zvieratá a kompostu by sa tiež mohlo zlepšiť použitím účinných biotechnologických metód. Vermikompostovanie ponúka atraktívnu alternatívu. Biologická detoxikácia kávovej drviny a šupiek je sľubná, pretože odstránenie (degradácia) antifyzilogických a antinutričných faktorov, ako sú kofeín a triesloviny, by otvorilo nové možnosti využitia týchto subproduktov. Hydrolyzáta z kávových šupiek tiež ponúka dobré možnosti využitia ako substrát pre bioprosesy. Bolo by však potrebné preskúmať ekonomickú uskutočniteľnosť takýchto procesov. Použitie kávovej drviny a šupiek v bioprosesoch môže na jednej strane poskytnúť alternatívne substráty a na druhej strane pomôcť pri riešení problémov so znečistením, ktoré inak spôsobuje ich likvidácia.

## **13 Fermentácia kakaa a kávy**

Po zbere sa zelená káva a kakaové bôby pripravujú v pomerne zložitých procesných krokoch, ktoré sa vykonávajú výlučne v pestovateľských krajinách. Z technického hľadiska je základným problémom, ktorý je potrebné vyriešiť, čo najúčinnnejšie odstránenie rôznych krycích vrstiev z plodov, aby sa z nich dostali kakaové a kávové semená. To sa dá dosiahnuť prirodzenou fermentáciou, pri ktorej sa kakaová a kávová dužina hydrolyzuje rastom mikroorganizmov; to napomáha procesu sušenia tým, že umožňuje odvodnenie dužiny. Okrem toho fermentácia vyvoláva v zrnách celý rad chemických zmien, ktoré sú predchodcami prchavých zlúčenín vznikajúcich počas praženia. Hoci pri príprave každého výrobku prebieha primárny proces fermentácie, fermentácia kakaa je absolútne nevyhnutná pre rozvoj chuti, zatiaľ čo pri káve je proces fermentácie menej dôležitý pre chuť a dôležitejší pre odstránenie dužiny. Z tohto dôvodu sa fermentácia kakaa častejšie dokumentuje v súvislosti

s procesom výroby kávy. Kakaová fermentácia pozostáva z jasne definovaných mikrobiálnych sukcesíí, v ktorých spočiatku dominujú kvasinky a následne ich prekonávajú baktérie mliečneho kvasenia (LAB); tieto druhy potom po 48 hodinách fermentácie ubúdajú a sú nahradené baktériami octového kvasenia (AAB). V prípade spracovania kávy sa síce dynamike mikrobiálneho rastu počas prirodzenej fermentácie venuje rozsiahla pozornosť, správy sú však prevažne opisné a neposkytujú príliš veľa informácií o mechanizmoch interakcie. Vo všeobecnosti sa fermentácia kávy uskutočňuje prostredníctvom komplexného mikrobiologického procesu, ktorý zahŕňa pôsobenie mikroorganizmov, ako sú kvasinky, baktérie a vláknité huby.

Napriek viac ako 100 rokom výskumu mikrobiálnej ekológie fermentácie kakaa a kávy nie je vzťah mikrobiálneho rastu k procesu a kvalite kávových zŕn úplne pochopený. Tento nedostatok informácií je hlavnou prekážkou pokroku a kontroly prirodzených fermentácií, alebo fermentácií vykonávaných pomocou štartovacích kultúr. Cieľom tohto prehľadu je opísať niektoré významné vedecké pokroky dosiahnuté v oblasti fermentácie kakaa a kávy za posledných 10 rokov. Okrem toho sa bude diskutovať o súvislosti medzi zložením a funkčnosťou štartéra, ako aj o hlavných charakteristikách skríningu.

### **Prehľad fermentácie kakaa a kávy**

Z biologického hľadiska je fermentácia kakaa a kávy kombináciou mikrobiálnych reakcií, ktoré prebiehajú v dužine, a biochemických reakcií, ktoré následne iniciujú v samotných zrnách. Prvé relevantné komplexné interakcie medzi mikroorganizmami prebiehajú na povrchu kakaových a kávových plodov, ktoré sú primárnym zdrojom mikrobiálnej kontaminácie v procese fermentácie. Ďalšími potenciálnymi zdrojmi mikrobiálnej kontaminácie sú: rastlinné materiály a vegetácia, voda použitá na rozvlákňovanie (v prípade spracovania kávy) a zaschnutý sliz, ktorý zostal na stenách boxov z predchádzajúcich fermentácií (v prípade fermentácie kakaa).

Na tému mikrobiálnej ekológie fermentácie kakaa a kávy bolo nedávno napísaných niekoľko recenzií, na ktoré čitateľa odkazujeme, ak chce získať ďalšie informácie o tejto téme.

## **13.1 Proces fermentácie kakaa**

Spôsob spracovania kakaových bôbov sa vo všeobecnosti vzťahuje na krajinu produkcie a môže sa vykonávať v hromadách (napr. Ghana a Pobrežie Slonoviny), v debnách (napr. Brazília a Malajzia), v košoch (napr. Nigéria a Ghana), na podnosoch (napr. Ghana), vo vreciach (napr. Ekvádor) a pri plošinovej fermentácii (napr. Ekvádor). Proces fermentácie zahŕňa pôsobenie komplexných mikrobiálnych interakcií, ktoré vedú najmä kvasinky, LAB a AAB. Tieto interakcie sú riešené fyzikálnymi a chemickými zmenami, ktorým kvasinkové a bakteriálne bunky čelia v priebehu procesu fermentácie. Zmeny pH, teploty, obsahu cukru a produktov fermentácie vyvíjajú selekčný tlak na už existujúce prirodzené biotypy, pričom uprednostňujú tie kmene, ktoré sú na toto prostredie lepšie prispôbené. Počiatočná kyslosť buničiny (pH 3,0 – 4,0) spolu s nízkym obsahom kyslíka (anaeróbna fáza fermentácie) podporuje počiatočnú kolonizáciu kvasinkami, ktoré využívajú sacharidy buničiny na výrobu etanolu. Po poklese populácie kvasiniek nasleduje fáza, počas ktorej vo fermentácii

dominujú baktérie, najmä LAB a AAB. Semi-anaeróbne podmienky v súčasnosti podporujú rozvoj LAB, ktoré dosahujú vrchol približne 36 – 48 hodín po začiatku fermentácie. Potom je metabolizmus AAB stimulovaný prevzdušňovaním spôsobeným otáčaním hmoty a využíva etanol produkovaný kvasinkami na svoj rast a metabolizmus kyseliny octovej. Táto intenzívna mikrobiálna aktivita vytvára metabolity a podmienky, ktoré usmrcujú zrná, čím spúšťajú celý rad biochemických reakcií v zrnách. Napriek širokej mikrobiálnej rozmanitosti prítomnej počas fermentácie kakaa mnohé štúdie preukázali, že v nej dominujú obmedzené druhy kvasiniek a baktérií, a to *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Limosilactobacillus fermentum* a *Acetobacter pasteurianus*.

### 13.2 Proces fermentácie kávy

Kávové plody sa môžu spracovať tromi rôznymi spôsobmi, ktoré sa označujú ako suché, mokré a polosuché. Mokré spracovanie sa používa najmä pri káve Arabica: zrelé plody sa zbavia dužiny a potom sa podrobia 24 – 48 hodinovej fermentácii pod vodou a sušia sa, kým sa nedosiahne konečný obsah vody 10 – 12 %. Pri suchom spracovaní sa naopak celé plody kávy sušia (na slnku) na plošinách a/, alebo na podlahe bez predchádzajúceho odstránenia dužiny. Polosuché spracovanie je kombináciou oboch metód, pri ktorej sa kávové plody zbavujú dužiny, ale proces fermentácie prebieha priamo na slnku na plošine.

Počet štúdií venovaných mikrobiologickým aspektom kávy je v porovnaní s fermentáciou kakaa pomerne obmedzený. Môže to byť spôsobené tým, že na rozdiel od mnohých iných výrobkov sa fermentácia kávových zŕn obmedzuje takmer len na rozklad slizu. Z tohto dôvodu sú mikrobiálne interakcie a biochemické zmeny medzi dužinou a zrnami pozorované pri fermentácii kakaa pri fermentácii kávy málo známe. Niektoré štúdie uvádzajú viac ako 50 druhov baktérií a kvasiniek, ktoré boli identifikované počas procesu fermentácie kávy. Druhová rozmanitosť väčšinou súvisí s použitou metódou spracovania. Populácie kvasiniek a celkových baktérií sú rozmanitejšie a sú prítomné vo väčšom počte pri suchom spracovaní ako pri mokrom, alebo polosuchom spracovaní, pravdepodobne v dôsledku dlhšieho obdobia vystavenia, počas ktorého sú plody vystavené miestnej kontaminácii počas fermentácie, pričom nie sú asepticky kontrolované. Na druhej strane, pri mokrom spracovaní sa LAB izolujú vo vysokom počte v dôsledku prítomných anaeróbnych podmienok, alebo podmienok s nízkym obsahom kyslíka, ktoré podporujú ich rozvoj. Pri suchom spracovaní sú bežnými druhmi *Bacillus subtilis*, druhy čeľade *Enterobacteriaceae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii* a *Aspergillus niger*. Pri mokrom a polosuchom spracovaní sa bežne izolujú *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, *Hanseniaspora uvarum* a *Pichia fermentans*. Bežné druhy vo všetkých typoch spracovania teda patria do čeľade *Enterobacteriaceae* a rodu *Pichia*.

#### Najnovšie pokroky v mikrobiálnej ekológii fermentácie kávy a kakaa

V posledných rokoch sa vďaka rozvoju moderných techník molekulárnej biológie, ktoré umožňujú získať prístup k mikrobiálnej diverzite v environmentálnych vzorkách, rozšírili poznatky o mikrobiálnej ekológii a metabolizme pri fermentácii

kakaa. Viaceré dogmy, ktoré sa v minulosti považovali za nespochybniteľné, sa v súčasnosti spochybňujú. Napríklad prítomnosť Enterobacteriaceae počas fermentačného procesu sa spájala s hrubo neprijateľnými pachmi a príchutami. Rekonštrukciou mikrobiálnych metapascí na základe metagenomických údajov sa zistilo, že Enterobacteriaceae sú schopné prijímať a metabolizovať sacharidy prítomné v hmote kakaových bôbov, čo naznačuje, že môžu mať dôležitejšiu úlohu v celkových metabolických procesoch fermentácie kakaových bôbov, než sa doteraz predpokladalo, ako je asimilácia citrátu a pektinolyza.

Okrem toho by mohlo byť dôležité nedávne zistenie, že niektoré druhy zistené sekvenovaním neboli izolované na podložke, pretože tieto druhy môžu zohrávať dôležitú úlohu v procese fermentácie kakaa. Vo fermentácii kakaa boli zistené dve nové skupiny AAB patriace do rodov *Asaia* a *Gluconacetobacter*. Je zaujímavé, že na rozdiel od kmeňov rodu *Acetobacter*, ktoré sa bežne vyskytujú vo fermentáciách kakaa, sa druhy *Asaia* a *Gluconacetobacter* vyznačujú malou, alebo žiadnou schopnosťou oxidácie etanolu na kyselinu octovú. Prítomnosť nefermentovanej glukózy je teda nevyhnutná pre neskorší rast druhov *Gluconacetobacter* a *Asaia*, čo môže odrážať suboptimálne podmienky fermentácie dužinato-bobovej hmoty.

Bohužiaľ, tieto molekulárne nástroje sa pri fermentácii kávy použili len v niekoľkých štúdiách. Preto je málo známe o vplyve dynamiky mikroorganizmov a ich metabolizmu na kvalitu nápoja. Aplikácia novších, molekulárnych nástrojov otvorí nové obzory v našich súčasných poznatkoch o mikrobiálnych interakciách a metabolizme fermentácie kávy.

### **Štartovacie kultúry na spracovanie kakaa a kávy**

Niektoré nedávne štúdie o mikrobiálnej ekológii kvasiniek a baktérií pri fermentácii kakaa a kávy, z ktorých boli vybrané štartovacie kultúry. Hoci sa vo všeobecnosti pozoruje široká mikrobiálna diverzita, zvyčajne sa vyberá len niekoľko druhov. Väčšina týchto pôvodných mikroorganizmov teda pravdepodobne nie je potrebná na získanie konečného výrobku s vysokou kvalitou. Pri procese fermentácie kakaa sa zvyčajne testujú zmiešané štartovacie kultúry pozostávajúce z kvasiniek, LAB a AAB, aby sa simuloval postupný vývoj týchto mikrobiálnych skupín počas spontánneho procesu. Na zvýšenie konzistencie fermentácie kakaovej hmoty a zlepšenie kvality čokolády sa navrhla kombinovaná inokulácia *Saccharomyces cerevisiae*, *L. fermentum*, alebo *L. plantarum* a *Acetobacter pasteurianus*. Okrem toho boli vyvinuté aj štartovacie kultúry pozostávajúce z iných, nekonvenčných druhov kvasiniek vrátane *Kluyveromyces marxianus* (zlepšená pektinolytická aktivita), *Pichia kluyveri* (aromatické kvasinky) a *Candida* spp. Nie je však jasné, či navrhované štartovacie kultúry skutočne priniesli zlepšenie fermentácie. Štúdia napríklad spochybnila predchádzajúce práce, v ktorých sa spomína význam LAB pre fermentáciu kakaa. V tejto štúdii sa uskutočnila fermentácia kakaových bôbov v podmienkach, v ktorých bol rast LAB obmedzený použitím bakteriálnych inhibítorov nizínu a lyozýmu. Bôby fermentované v prítomnosti, alebo neprítomnosti LAB boli plne fermentované, mali podobnú hmotnosť škrupiny a poskytovali prijateľné čokolády bez rozdielov v sensorickom hodnotení. Dospelo sa k záveru, že LAB nemusia byť potrebné na úspešnú fermentáciu kakaa. V iných štúdiách sa však uvádza, že vzhľadom na obmedzenú druhovú rozmanitosť LAB a AAB počas väčšej časti procesu fermentácie kakaových bôbov by na zabezpečenie rozvoja rastu baktérií počas

procesu fermentácie stačil starostlivý výber a spracovanie kakaových strukov. Na druhej strane, pridanie vybraného kmeňa kvasiniek do štartovacej kultúry je absolútnou požiadavkou na prekonanie kvalitatívnej variability konečného produktu, keďže počas procesu fermentácie sa pozoruje veľká rozmanitosť.

Pri procese fermentácie kávy sa nedávno skúmalo použitie aromatických kvasiniek na podporu rozvoja chuti v kávových nápojoch počas suchého, polosuchého a mokrého spracovania. Ukázalo sa, že metabolická aktivita štartovacích kultúr kvasiniek (napr. *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia fermentans*) pri oboch spôsoboch spracovania ovplyvňuje konečnú prchavú frakciu pražených zŕn a sensorickú kvalitu z nich vyrobených nápojov. Tieto nedávne štúdie teda odhalili, že kvasinky majú komplementárnu úlohu, keď súvisia s kvalitou kávy prostredníctvom syntézy prchavých zložiek špecifických pre kvasinky. Nie je však jasné, ako by takéto prchavé látky mohli ovplyvniť chuť nápojov, pretože po prvé, musia difundovať do zŕn a po druhé, očakáva sa, že sa väčšinou stratia odparovaním, alebo sa inak premenia počas praženia. Je potrebný ďalší výskum, ktorý by podrobne opísal kinetiku počas procesu fermentácie kávy.

### **Kritériá výberu kakaových a kávových štartérov**

Po prvé, je nevyhnutné vedieť, ktoré druhy sú prítomné a dominantné, aby bolo možné vybrať (prospešné) kvasinkové, a/, alebo bakteriálne štartovacie kmene, ktoré sú schopné prekonať spontánny proces. Schopnosť štartovacej kultúry dominovať nad autochtónnou mikrobiotou je teda jedným z hlavných kritérií jej použitia na zlepšenie kvality kávy a kakaa. Ďalej by sa mala venovať pozornosť výberu kmeňov s pektinolytickou aktivitou, aby sa urýchlil rozklad slizu kávových a kakaových bôbov na zloženie štartovacej kultúry. Mikrobiálne odstránenie slizu môže uľahčiť sušenie zŕn a produkuje metabolity, ktoré sa šíria do vnútra zŕn a reagujú s látkami zodpovednými za chuť konečného výrobku. Napokon, na účely prevencie produkcie ochratoxínu A (OTA) v káve a kávových zrnách sa navrhuje používať kvasinky a/, alebo baktérie mliečneho kvasenia pri biologickej kontrole plesní produkujúcich OTA počas fermentácie. Mikrobiálna premena zložiek buničiny na chuťovo aktívne zložky sa v posledných rokoch ukázala ako dôležitý ďalší mechanizmus, ktorým štartovacie kultúry významne ovplyvňujú chuť kakaových a kávových výrobkov. Tieto profily sa medzi jednotlivými druhmi a kmeňmi kvasiniek výrazne líšia, preto je potrebný rozsiahly skrining kmeňov, aby sa vybrali tie s pozitívnymi vlastnosťami (napr. zvýšená tvorba aromatických zlúčenín) a odmietli tie s výrazným negatívnym vplyvom (napr. nadprodukcia kyseliny octovej, maslovej a propionovej). Na tomto základe je preto vnútrodruhovú diferenciáciu veľkej zberovej kultúry potrebným predbežným krokom na výber kmeňov s potenciálom zvýšiť produkciu chuťových a aromatických zlúčenín a dodať konečným produktom špecifické vlastnosti, ktoré spotrebiteľ oceňuje. Na uskutočnenie selekcie štartérov kakaa a kávy bude preto potrebná spoľahlivá metóda s dobrou rozlišovacou schopnosťou, presnosťou a reprodukovateľnosťou, ako sú metódy založené na genetickej charakterizácii kmeňov (napr. PFGE, mtDNA-RFLP, PCR v reálnom čase a RAPD-PCR).

Ako už bolo uvedené, je potrebný ďalší výskum v mnohých aspektoch vedy a technológie, aby fermentácia kakaa a kávy dosiahla podobnú úroveň ako iné fermentované potraviny a nápoje. Podľa nášho názoru sú pozitívne účinky používania štartovacích kultúr pri fermentácii kakaa a kávy, ako je štandardizácia kvality a zníženie

ekonomických strát pre výrobcu, v súčasnosti dobre preukázané v literatúre. Okrem toho sa jasne preukázalo, že pri zavádzaní štartovacích kultúr sa ovplyvňuje profil aromatických zlúčenín kakaových aj kávových zŕn. Napriek tomuto úsiliu sa vyvinuté štartovacie kultúry zatiaľ nepoužívajú v poľných podmienkach<sup>8</sup>. Stále chýba dôkladné pochopenie interakcií na ekologickej úrovni medzi zavedenými kmeňmi a pôvodnými mikrobiálnymi spoločenstvami, pretože "sterilný" proces nie je možné dosiahnuť v oboch týchto fermentačných procesoch. Sme presvedčení, že výskum v oblasti mikrobiómu kakaa a kávy by mal obrovské dôsledky pre monitorovanie fermentačného procesu. Na hľadanie odpovedí na tieto a ďalšie otázky je potrebný multidisciplinárny prístup založený napríklad na najnovších technológiách sekvenovania DNA a RNA novej generácie, proteomike, metabolomických prístupoch a technológii fermentácie. Zavedenie kakaových a kávových štartérov môže byť pomerne pracný proces, ale po úspešnom zavedení môže zmeniť nekonzistentný proces na ekonomicky hodnotnú ponuku.

## Zoznam použitej literatúry

- Aminuzzaman, F.M. et al. 2022. *Mushroom Diseases and Their Management: A Review. Recent Advances in Mushroom Cultivation Technology and Its Application*. (Online). New Delhi: Bright Sky Publications. 186 s. ISBN 978-93-92804-20-5. Dostupné na: <https://doi.org/10.22271/bs.book.48> [cit. 2023-09-27].
- AVÍRVAREI A.C. et al. 2023. Fruit-Based Fermented Beverages: Contamination Sources and Emerging Technologies Applied to Assure Their Safety. In *Foods*. (Online), vol. 12, no. 4, pp. 838. Dostupné na: [10.3390/foods12040838](https://doi.org/10.3390/foods12040838) [cit. 2023-09-27].
- BASKAR, M., HEMALATHA, G., MUNEESHWARI, P. 2020. Fermentation of wine from tropical and subtropical fruits: A review. In *International Journal of Chemical Studies*. (Online), vol. 8, no. 5, pp. 118-126. Dostupné na: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i5b.10287> [cit. 2023-09-27].
- BOTELHO, G. R., MENDONÇA-HAGLER, L. C. 2006. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops: an overview. In *Brazilian Journal of Microbiology*. (Online), vol. 37, no. 4, pp. 401-416. Dostupné na: <https://doi.org/10.1590/s1517-8382200600040000> [cit. 2023-09-27].
- DEAN, R., VAN KAN, J. et al. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. In *Molecular Plant Pathology*. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.2011.00783.x> [cit. 2023-09-27].
- DOAN, C. H., DAVIDSON, P. M. 2000. Microbiology of Potatoes and Potato Products: A Review. In *Journal of Food Protection*. (Online), vol. 63, no. 5, pp. 668–683. Dostupné na: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.5.668> [cit. 2023-09-27].
- EL-SAADONY, M. T. et al. 2022. Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. In *Frontiers in Plant Science*, (Online), vol. 13. Dostupné na: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880> [cit. 2023-09-27].
- FLIBERT, G., et al. 2016. African cassava Traditional Fermented Food: The Microorganism's Contribution to their Nutritional and Safety Values-A Review. In *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol. 5, no. 10, ppp.

664–687. Dostupné na: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.074> [cit. 2023-09-27].

MANSFIELD, J. et al. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. In *Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, no. 6, pp. 614–629. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x> [cit. 2023-09-27].

NAYAK, S. K. et al. 2022. Advances in Agricultural and Industrial Microbiology. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/978-981-16-8918-5> [cit. 2023-09-27].

NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. vol. 34, no.4, pp. 371–401. Dostupné na: [doi:10.1080/10408399409527668](https://doi.org/10.1080/10408399409527668) [cit. 2023-09-27].

PANDEY, A. et al. 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. In *Biochemical Engineering Journal*. vol. 6, no. 2, pp. 153–162. Dostupné na: [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(00\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(00)00084-x) [cit. 2023-09-27].

PEREIRA, G. V. et al. 2016. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. In *Current Opinion in Food Science*. vol. 7, pp. 50–57. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.001> [cit. 2023-09-27].

RAY, R. C. et al. 2012. Bio (Bacterial) Control of Pre- and Postharvest Diseases of Root and Tuber Crops. In *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. pp. 321–348. Dostupné na: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_12) [cit. 2023-09-27].

SHARMA, R. R. et al. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. In *Biological Control*. vol. 50, no. 3, pp. 205–221. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001> [cit. 2023-09-27].

SCHOLTHOF, K. et al. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. In *Molecular Plant Pathology*. vol. 12, no. 9, pp. 938–954. Dostupné na: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x> [cit. 2023-09-27].

SIDDIQUI, Z. A. 2006. PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Online). Dordrecht: Springer. 631 s. ISBN-10 1-4020-4152-7 (e-book). Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7> [cit. 2023-09-27].

**Názov:** Mikrobiálne biotechnológie v záhradníctve  
**Autorky:** Miroslava Kačániová, Natália Čmiková  
**Vydavateľ:** Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
**Vydanie:** prvé  
**Rok vydania:** 2023  
**Počet strán:** 215  
**Forma vydania:** online  
**AH – VH:** 18,76 – 19,05

Rukopis neprešiel redakčnou úpravou vo Vydavateľstve SPU v Nitre.

**ISBN 978-80-552-2667-5**





**SPU**  
Slovenská  
poľnohospodárska  
univerzita v Nitre

ISBN 978-80-552-2667-5



9 788055 226675

Ďalšie publikácie nájdete na eshope – [www.vydavatelstvo.uniag.sk](http://www.vydavatelstvo.uniag.sk)