

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA ZDOLNOŚĆ SZCZEPÓW Z RODZAJU *LACTOBACILLUS* DO OBNIŻANIA ZAWARTOŚCI OCHRATOKSYNY A W WARUNKACH MODELOWYCH

Agata U. Kapturowska, Krystyna J. Zielińska, Krystyna M. Stecka,
Marta P. Kupryś

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego,
Zakład Technologii Fermentacji,
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa,
agata.kapturowska@ibprs.pl

Streszczenie

Ochratoksyna A jest jednym z najbardziej popularnych toksycznych metabolitów pleśni zanieczyszczających żywność i pasze klimatu centralnej i wschodniej Europy. Obecne trendy i wymagania stawiane producentom żywności przez konsumentów sprawiają, że istnieje konieczność stałego podnoszenia jakości pasz i żywności, także w odniesieniu do mikotoksyn. Dużym zainteresowaniem badaczy cieszą się metody dekontaminacji skażonych produktów, w tym na szczególną uwagę zasługują metody biologiczne z wykorzystaniem szczepów bakterii fermentacji mlekowej o zdolności do obniżania skażenia mikologicznego i redukcji zawartości ochratoksyny A (OTA) w środowisku.

Celem pracy była ocena wpływu początkowej liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz czasu ich hodowli na stopień obniżania zawartości OTA w warunkach modelowych. Analiza statystyczna wyników wykazała brak istotnych różnic w poziomie eliminacji OTA z podłoża przez badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej przy początkowej liczbie bakterii 10^7 oraz 10^9 j.t.k./cm³. Istotnie niższy poziom eliminacji OTA uzyskano w doświadczeniach, w których początkowa liczba bakterii wynosiła 10^5 j.t.k./cm³. Proces eliminacji OTA przez badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej ze środowiska jest częściowo odwracalny, a zawartość mikotoksyny w podłożu może ponownie wzrastać od kilku do kilkunastu jednostek procentowych w 4 dobie hodowli bakterii.

Słowa kluczowe: ochratoksyna A, *Lactobacillus* spp., dekontaminacja

**FACTORS INFLUENCING THE ABILITY OF
THE SELECTED STRAINS OF *LACTOBACILLUS* GENERA
TO LOWER THE AMOUNT OF OCHRATOXIN A IN MODEL CONDITIONS**

Summary

Ochratoxin A is one of the most common toxic metabolites produced by moulds, which contaminates food and fodder in climate of central and eastern Europe. Current trends and the requirements imposed to the food producers cause a necessity to improve the quality of food and feed, what also refers to mycotoxins. Methods for food decontamination are a subject of interest for scientists, especially the biological methods for eliminating or reducing OTA content in the environment by the lactic acid bacteria strains.

The aim of the study was to evaluate an impact of the initial number of bacteria and time of cultivation on the amount of OTA reduced in growth medium by bacteria within the *Lactobacillus* genera. According to the statistical analysis it can be assumed that there was no significant difference between the ability of examined strains of lactic acid bacteria to reduce an ochratoxin A content in the growth medium at the initial number of cells equal to 10^7 and 10^9 CFU/cm³. Examined *Lactobacillus* strains eliminate significantly less of OTA molecules at the initial number of bacteria equal 10^5 CFU/cm³. The process of lowering the amount of ochratoxin A is partially reversible and the amount of OTA in the medium can increase in the fourth day of bacteria's growth.

Key words: ochratoxin A, *Lactobacillus* spp., decontamination

WSTĘP

Do grupy najczęściej izolowanych pleśni ze skażonej żywności i pasz w krajach klimatu umiarkowanego należą: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. i *Fusarium* sp., które w sprzyjających warunkach środowiska syntetyzują toksyczne metabolity drugorzędowe [Magnusson, Schnürer 2005]. Okoliczności skażenia pasz przez pleśnie mogą być rozmaite, ale ich obecność niesie ze sobą zagrożenie poważnymi konsekwencjami zdrowotnymi dla ludzi i zwierząt spowodowanymi syntezą mikotoksyn [Kluczek, Kojder 2000]. Ochratoksyna A (OTA), wytwarzana przez pleśnie z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium*, zaliczana jest do metabolitów o właściwościach nefrotoksycznych, teratogennych, immunotoksycznych i prawdopodobnie neurotoksycznych [O'Brien, Dietrich 2005]. W 1993 roku toksyna ta została uznana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) za kancerogen klasy 2B [Grajewski 2003].

Obecne trendy i wymagania stawiane przez producentów żywności i konsumentów sprawiają, że istnieje konieczność stałego podnoszenia jakości pasz i żywności, także w odniesieniu do toksycznych metabolitów grzybów strzępkowych [Amigot i in. 2006], stąd uzasadnione jest poszukiwanie nowych metod mających na celu dekontaminację zanieczyszczonych produktów [Fuchs i in. 2008, Gwiazdowska i in. 2008]. Poza metodami fizycznymi i chemicznymi, w kręgu zainteresowania pojawiają się metody biologiczne [Kluczek, Kojder 2000]. W najnowszych metodach biologicznych wykorzystuje się naturalne zdolności mikroorganizmów, w tym bakterii fermentacji mlekowej, do dekontaminacji pasz i żywności [Baranowski i in. 2003].

Większość doniesień naukowych dotyczy zdolności do eliminacji aflatoksyn przez mikroorganizmy. Tylko nieliczne doniesienia naukowe traktują zagadnienia mikrobiologicznej degradacji ochratoksyny A. Wśród drobnoustrojów zdolnych do obniżania zawartości OTA są bakterie fermentacji mlekowej, szczególnie interesujące z punktu widzenia bezpieczeństwa ich stosowania. Większość z nich obniża zawartość ochratoksyny A o około kilkanaście procent [Piotrowska, Żakowska 2000, 2005]. Mikotoksyny, w tym ochratoksyna A, mogą ulegać eliminacji w procesie kizensia z udziałem tych mikroorganizmów [Kluczek, Kojder 2000]. Prowadzone są badania w kierunku określenia optymalnych warunków tego procesu. Uważa się, że na poziom eliminacji OTA przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej wpływają: czas hodowli, pH podłoża, zastosowany szczep, liczba bakterii, faza cyklu rozwojowego drobnoustrojów oraz stężenie samej mikotoksyny [Fuchs i in. 2008, Mateo i in. 2010].

Do badań nad efektywnością obniżania zawartości ochratoksyny A w środowisku wybrano 5 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wyróżniających się badaną cechą podczas wstępnej oceny przeprowadzonej w warunkach *in vitro* w buforze PBS [Kapturowska i in. 2010].

Celem niniejszej pracy była ocena zdolności wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, należących do Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, do obniżania zawartości ochratoksyny A w podłożu w zależności od początkowej liczby bakterii i czasu ich hodowli. Na podstawie wyników tych badań podjęto próbę określenia warunków hodowli umożliwiających maksymalne obniżenia zawartości ochratoksyny A w środowisku hodowlanym.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakterii fermentacji mlekowej

Badania prowadzono z udziałem 5 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* należących do Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, wykorzystywanych do produkcji biopreparatów do kiszenia pasz: *L. buchnerii* KKP 907, *L. plantarum* C KKP/788/p, *L. plantarum* K KKP/593/p, *L. fermentum* N KKP 2020, *L. plantarum* S KKP 880.

Układ doświadczeń i metodyka badań

Bakterie hodowano w płynnym podłożu TM Lactobacilli MRS Broth (Difco, USA) przez 24 h i dodawano 13 lub 50 µl wzorca ochratoksyny A zawieszony w acetonitrylu (Biopure, USA). Doświadczenie mające na celu określenie zdolności badanych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości OTA w podłożu w zależności od liczby bakterii przeprowadzono, stosując początkową liczbę bakterii w podłożu: 10^5 j.t.k./cm³, 10^7 j.t.k./cm³, 10^9 j.t.k./cm³ (j.t.k. – jednostka tworząca kolonię). Stężenie początkowe OTA w podłożu wynosiło 50 ppb (µg/kg). Badanie zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w podłożu w zależności od czasu hodowli przeprowadzono, stosując początkową liczbę bakterii 10^9 j.t.k./cm³, stężenie początkowe OTA wynosiło 13 ppb. Równocześnie przygotowano próbę kontrolną w odniesieniu do każdego wariantu doświadczenia.

Oznaczenia zawartości ochratoksyny A w podłożu wykonywano w czasie hodowli bakterii w temperaturze 30°C co 24 h, 48 h, 72 h oraz 96 h. W wariantach doświadczenia, w którym czynnikiem wpływającym na badaną cechę była liczba bakterii, zawartość OTA oznaczono po 24 h inkubacji. Do oznaczania zawartości ochratoksyny A stosowano test immunoenzymatyczny ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) firmy RIDASCREEN® - Ochratoxin A 30/15. W tym celu biomasę bakteryjną odwirowano w wirówce szybkoobrotowej Jouan i oznaczono stężenie pozostałej OTA w supernatancie oraz analogicznie w próbce kontrolnej. Poziom eliminacji OTA przez poszczególne szczepy bakterii fermentacji mlekowej obliczano według wzoru:

$$\text{poziom eliminacji OTA} = \frac{\text{stężenie OTA w próbce kontrolnej} - \text{stężenie OTA w próbce badanej}}{\text{stężenie OTA w próbce kontrolnej}} \cdot 100 \% .$$

Analiza statystyczna

Wyniki przeprowadzonych badań analizowano metodami statystycznymi przy pomocy oprogramowania STATGRAPHICS Plus for Windows 4.1©Statistical Graphics Corp. W celu weryfikacji hipotezy statystycznej o równości średnich obiektowych przeprowadzono

jednoczynnikową analizę wariancji. Szczegółowego porównania średnich i wyodrębnienia grup jednorodnych dokonano, stosując test porównań wielokrotnych - test Tukey'a. W analizie statystycznej ustalono poziom istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

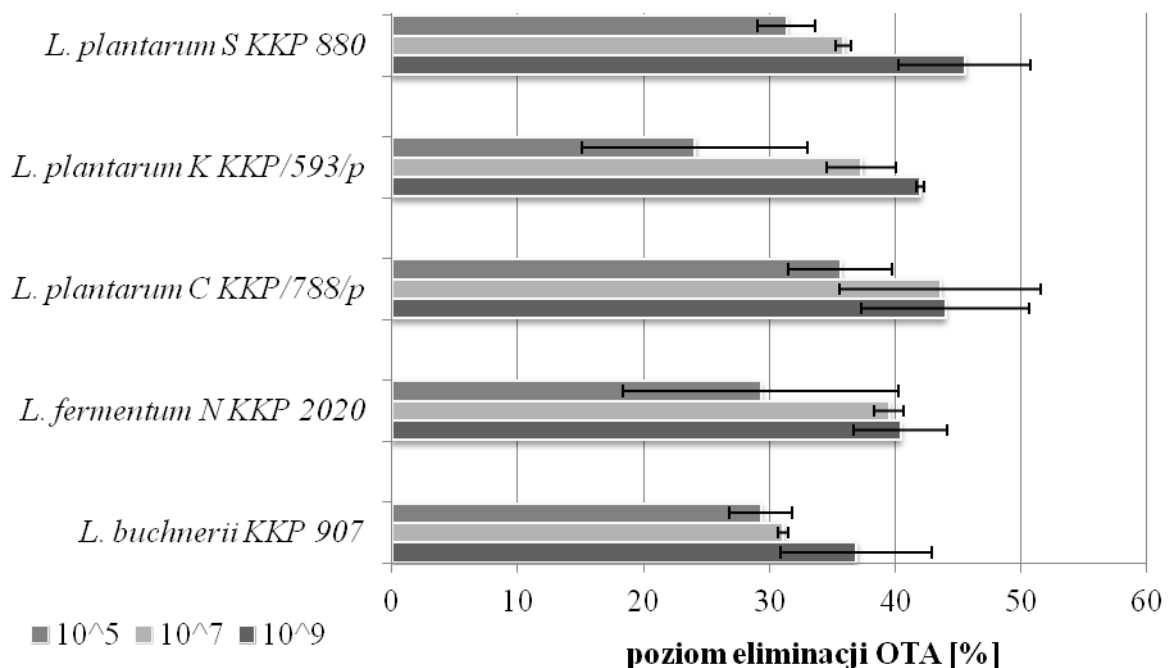
Badanie zdolności badanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w podłożu w zależności od początkowej liczby bakterii

W pierwszym etapie badań oceniano wpływ początkowej liczby bakterii w podłożu hodowlanym na stopień obniżenia zawartości ochratoksyny A przez badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Analiza statystyczna wyników wykazała brak istotnych różnic w poziomie eliminacji OTA przez szczepy z rodzaju *Lactobacillus* przy początkowej liczbie bakterii 10^7 oraz 10^9 j.t.k./cm³. Istotnie niższym poziomem eliminacji OTA cechowały się wszystkie szczepy z rodzaju *Lactobacillus* przy wariancie doświadczenia z początkową liczbą bakterii 10^5 j.t.k./cm³ w stosunku do dwóch pozostałych wariantów. Po hodowli szczepów bakterii fermentacji mlekowej w podłożu MRS wykazano, że ich zdolność do obniżania zawartości ochratoksyny A zależy od początkowej liczby bakterii. Należy zauważyć, że zależność ta jest słuszna w odniesieniu do modelu, w którym zastosowano początkową liczbę bakterii równą: 10^5 , 10^7 oraz 10^9 j.t.k./cm³, z czego dopiero różnica liczby komórek szczepów bakterii rzędu czterech cykli logarytmicznych decydująco wpłynęła na zdolność do eliminacji OTA z podłoża przez badane szczepy.

Po 24 h hodowli w temperaturze 30°C oznaczano liczbę j.t.k. bakterii wszystkich badanych szczepów w podłożu, która wynosiła od 1,0 do $8,0 \times 10^9$ j.t.k./cm³ we wszystkich wariantach doświadczeń. Fakt ten tłumaczy brak istotnych różnic pomiędzy zdolnością eliminacji OTA przez szczepy z rodzaju *Lactobacillus* przy początkowej liczbie bakterii 10^7 j.t.k./cm³ (średni poziom eliminacji OTA przez wszystkie badane szczepy 37,47 %) oraz 10^9 j.t.k./cm³ (średni poziom eliminacji OTA przez wszystkie badane szczepy 41,75 %). Z powodu intensywnego przyrostu komórek w warunkach doświadczenia zauważono istotnie różną, ale średnio zaledwie o kilkanaście procent niższą, zdolność eliminacji OTA przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej przy początkowej liczbie komórek 10^5 j.t.k./cm³ (średni poziom eliminacji OTA przez wszystkie badane szczepy 29,93 %).

Analiza statystyczna nie wykazała istnienia interakcji pomiędzy zastosowanymi szczepami bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, a początkową liczbą bakterii oraz wskazała na brak istotnych różnic w poziomie eliminacji OTA pomiędzy analizowanymi szczepami bakterii (rys. 1).

Wynik ten nie potwierdza wniosków uzyskanych podczas badania przeprowadzonego w buforze PBS (10 mM bufor fosforanowy, pH 7,4, zawierający 0,05 % Tween 20), zgodnie z którymi szczep *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p obniżał w większym stopniu zawartość OTA w środowisku w porównaniu do szczepów *Lactobacillus plantarum* C KKP/788/p, *Lactobacillus buchnerii* KKP 907 i *Lactobacillus plantarum* S KKP 880 [Kapturowska i in. 2010]. Zdolność do eliminacji OTA przez niektóre gatunki bakterii fermentacji mlekowej jest cechą szczepową, co udokumentowano w licznych badaniach [Kluczek, Kojder 2000, Grajewski 2003, Piotrowska, Żakowska 2000, 2005]. W warunkach doświadczenia badane szczepy z rodzaju *Lactobacillus* odznaczały się wysokim oraz porównywalnym poziomem omawianej cechy. Uzyskane rezultaty należy tłumaczyć odmiennymi warunkami prowadzonego doświadczenia, w którym zastosowano podłoże MRS, przeznaczone do hodowli szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, co umożliwiło wzrost i rozwój bakterii, czego nie zapewniono w buforze PBS. Stosowane w doświadczeniu szczepy bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywane są do produkcji kultur starterowych przeznaczonych do kiszenia pasz, a więc cechują się dynamicznym wzrostem.



Rysunek 1. Porównanie eliminacji ochratoksyny A przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej w zależności od początkowej liczby bakterii w podłożu (j.t.k./cm³), $NIR^T_{liczba\ bakterii} = 6,203$; $NIR^T_{szczep\ LAB} = 9,513$

Fig. 1. Elimination of ochratoxin A by selected strains of lactic acid bacteria after 96 h incubation, $NIR^T_{number\ of\ bacteria} = 6,203$; $NIR^T_{LAB\ strain} = 9,513$

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia są częściowo zgodne z danymi uzyskanymi przez innych badaczy. W doświadczeniu ze szczepem *Lactobacillus acidophilus* VM20, wyizolowanym z fermentowanego produktu Lactosan, autorzy stwierdzili także zależność pomiędzy liczbą bakterii fermentacji mlekowej a stopniem eliminacji OTA. W modelu doświadczalnym zastosowano liczbę bakterii: $1,0 \times 10^9$; $5,0 \times 10^8$; $1,0 \times 10^8$; $5,0 \times 10^7$; $1,0 \times 10^7$ j.t.k/cm³. Istotną różnicę zaobserwowano w wariancie doświadczenia z liczbą bakterii wynoszącą powyżej $1,0 \times 10^8$. Autorzy uzyskali ok. 80 % redukcji stężenia OTA po 4 h inkubacji w temperaturze 37°C przy liczbie bakterii $1,0 \times 10^9$ j.t.k/cm³, zaś przy liczbie $1,0 \times 10^7$ j.t.k/cm³ zaledwie niecałe 10 % [Fuchs i in. 2008]. Podobne wyniki zanotowano w badaniach innej mikotoksyny - aflatoksyny B₁, gdzie zastosowano liczbę bakterii rzędu $1,0 \times 10^8$, uzyskując 40 – 60 % redukcji zawartości toksyny w stosunku do wartości początkowej [Pierides i in. 2000]. Należy zauważyć, że w przytaczanych powyżej doświadczeniach zastosowane stężenie OTA wynosiło od 5 do 500 µg/cm³, a zatem było wyższe w stosunku do stężenia mikotoksyny w modelu doświadczalnym, które wynosiło od 13 do 50 µg/dm³.

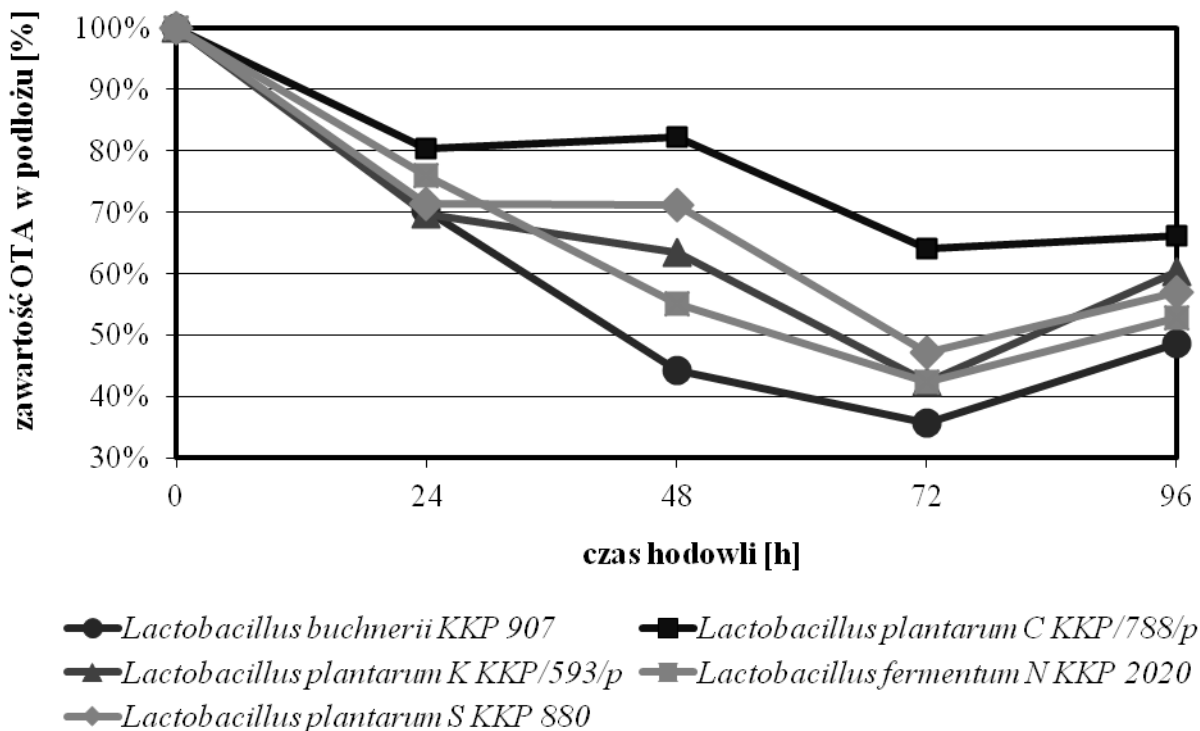
Badane szczepy zostały wyizolowane z ekosystemu roślinnego Polski. Szczep wykorzystany do badań pochodził z przewodu pokarmowego zwierząt, co mogło mieć także istotny wpływ na uzyskane wyniki [Pierides i in. 2000]. Skrining 29 szczepów bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzony przez Piotrowską i Żakowską potwierdził, że najintensywniej OTA z podłoża eliminują szczepy jelitowe (*Lactobacillus acidophilus* CH-5 – 70,5 % i *Lactobacillus rhamnosus* GG – 87,5 % po 120 h). Słabsze zdolności obniżania OTA w środowisku (ok. 50 % obniżenie zawartości) zaobserwowano w hodowli szczepów wyizolowanych z materiału roślinnego (*L. plantarum*, *L. sanfranciscensis* i *L. brevis*) [Piotrowska, Żakowska 2005].

Badanie zdolności szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w podłożu w zależności od czasu hodowli

Badania zdolności szczepów bakterii fermentacji mlekowej do obniżania zawartości ochratoksyny A w zależności od czasu hodowli przeprowadzono w czasie 96 h, dokonując pomiaru stężenia toksyny w płynie pohodowlanym co 24 h (rys. 2).

Stężenie OTA w podłożu zmniejszyło się po pierwszych 72 h hodowli i wynosiło od 35,78 % początkowej zawartości toksyny w przypadku szczepu *Lactobacillus buchnerii* KKP 907 do 64,14 % przy wykorzystaniu szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP/788/p. Po tym

czasie zaobserwowano ponowny wzrost zawartości ochratoksyny A w podłożu, który po kolejnych 24 h inkubacji wzrósł od 2 % przy zastosowaniu szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP/788/p do 17,89 % w przypadku szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p w porównaniu z zawartością OTA po 72 h.



Rysunek 2. Zmiany zawartości ochratoksyny A w podłożu w czasie 96 h inkubacji wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przy początkowym stężeniu OTA w podłożu 13,08 ppb (100 %)

Changes in ochratoxin A content in the medium during 96 h of selected lactic acid bacteria incubation at the initial dose of OTA in the growth medium 13,08 ppb (100%)

Wzrost zawartości ochratoksyny A w podłożu w 4 dobie hodowli od kilku do kilkunastu jednostek procentowych może być spowodowany wyczerpaniem się składników pokarmowych w podłożu oraz obumieraniem komórek bakterii.

Proces dekontaminacji podłoża niezależnie od wykorzystywanego szczepu zachodził najintensywniej w 1 dobie hodowli (od 19,65 % w przypadku *Lactobacillus plantarum* C KKP/788/p do 30,35 % przy zastosowaniu *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p).

Po upływie 72 h odnotowano wzrost zawartości OTA w płynie hodowlanym przy zastosowaniu wszystkich badanych szczepów bakterii

Jedną z dwóch rozważanych hipotez dotyczących mechanizmu eliminacji OTA przez bakterie fermentacji mlekowej jest adsorpcja do ściany komórkowej [Piotrowska, Żakowska 2000, 2005]. Coraz częściej uważa się, że obniżenie stężenia OTA w środowisku związane jest z fizycznym wiązaniem mikotoksyny z elementami ściany komórkowej, stąd badania modelowe zmierzają do określenia stabilności kompleksów OTA z komórkami szczepów bakterii fermentacji mlekowej [Dalie i in. 2010].

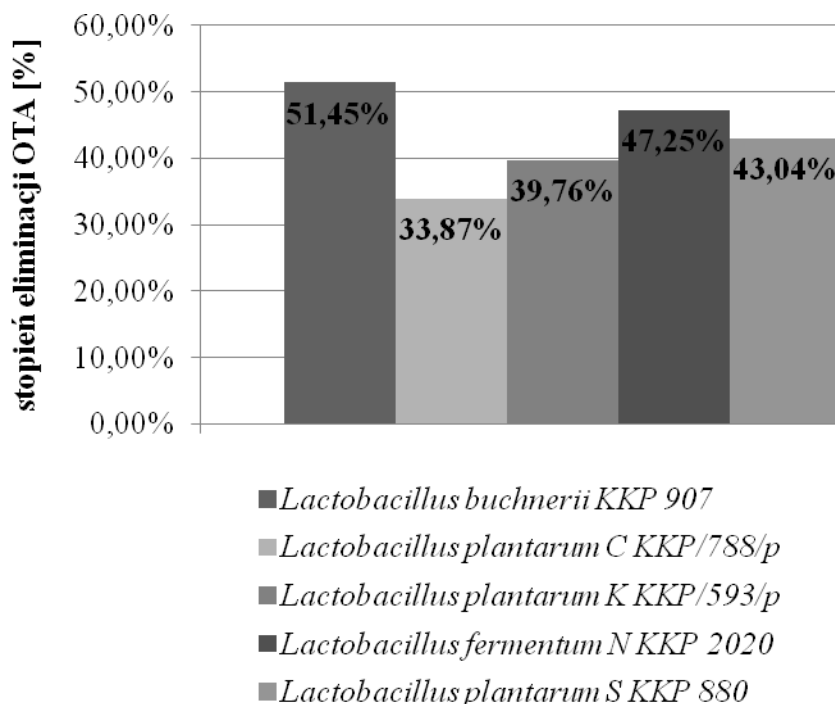
Piotrowska i Żakowska w swoich badaniach nad liofilizowaną kulturą starterową stosowaną w przemyśle piekarskim ustaliły, że badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wykazują największą aktywność procesu eliminacji OTA między 16 a 20 h inkubacji w czasie fermentacji mąki pszennej. W hodowlach szczepów *Lactobacillus acidophilus* CH-5 i *Lactobacillus rhamnosus* GG maksimum eliminacji OTA osiągnięto w 15 h wzrostu. Po tym czasie część mikotoksyny była z powrotem uwalniana do środowiska, a wiązanie OTA przez badane szczepy okazało się nietrwałe. Zawartość toksyny wzrosła odpowiednio o 17% i 9 % w stosunku do jej stężenia w pożywce w momencie najintensywniejszego związania OTA przez komórki analizowanych szczepów [Piotrowska, Żakowska 2000, 2005].

Dotychczas nie została wyjaśniona przyczyna tego zjawiska, która może mieć związek ze zmianami poziomu różnych metabolitów w pożywce w czasie hodowli. Wiadomym jest bowiem, że nie tylko OTA może być adsorbowana na powierzchni komórki, ale także inne składniki, które współzawodniczą z cząsteczkami mikotoksyny. Ponadto w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zaobserwowano ujemną korelację pomiędzy zawartością cukrów w pożywce a poziomem OTA w medium hodowlanym, co ma związek z poziomem mannofosforanów w ścianie komórkowej tych mikroorganizmów. Być może zmniejszenie zawartości cukru w podłożu hodowlanym bakterii fermentacji mlekowej, spowodowane wyczerpywaniem substratów przez komórki, jest także istotnym czynnikiem wyjaśniającym proces częściowo odwracalnego procesu obniżania zawartości OTA w warunkach modelowych przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej [Meca i in. 2010].

Istnieje niewiele doniesień na temat eliminacji OTA w warunkach *in vitro* w czasie dłuższym niż dwie doby. Grajewski ocenił biodegradację OTA przez szczep *L. bulgaricus* 259/2 w czasie 120 h. Autor stwierdził, że pomiędzy 12 a 24 h jego inkubacji występuje całkowity zanik toksyny w medium hodowlanym. W 36 h hodowli toksyna pojawiła się w pożywce ponownie, a podczas całego przebiegu doświadczenia eliminacji uległo 89% mikotoksyny. Grajewski sugeruje, że nawet martwe komórki szczepu bakteryjnego były

w stanie efektywnie wiązać OTA i eliminować ją ze środowiska [Grajewski 2003]. Inni badacze wskazują na istnienie niewielkich różnic w eliminacji mikotoksyny pomiędzy komórkami żywymi i martwymi szczepów z gatunku *Oenococcus oeni*, ale różnice te nie okazały się istotne statystycznie. Przepuszczalnie żywotność komórek nie ma wpływu na omawianą cechę. Udział w kowalencyjnym wiązaniu OTA do ściany komórkowej przypisuje się mannoproteinom, podobnie jak w komórkach drożdży [Mateo i in. 2010].

Najwyższym poziomem eliminacji OTA cechował się szczep *Lactobacillus buchnerii* KKP 907 (51,45 % po 96 h) oraz *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p (47,25 % po 96 h) (rys. 3). Porównując wyniki badań przeprowadzonych w buforze PBS [Kapturowska i in. 2010] można zauważyć, że trzy szczepy z rodzaju *Lactobacillus* były w stanie obniżyć nawet dwukrotnie wyższy procent mikotoksyny po 96 h hodowli aniżeli w buforze po 24 h inkubacji w identycznych warunkach temperatury (*Lactobacillus buchnerii* KKP 907, *Lactobacillus fermentum* N KKP 2020, *Lactobacillus plantarum* S KKP 880). Jedynie szczep *Lactobacillus plantarum* K KKP/593/p cechował się niższym poziomem eliminacji OTA w stosunku do doświadczenia w buforze PBS. Istotnym czynnikiem były tutaj z pewnością, obok czasu hodowli, skład podłoża hodowlanego i możliwość wzrostu komórek oraz niższe początkowe stężenie mikotoksyny. Po 72 h hodowli w płynie pohodowlanym czterech szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (z wyjątkiem szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP/788/p) zawartość OTA obniżyła się o co najmniej 50 jednostek procentowych w stosunku do jej stężenia początkowego.



Rysunek 3. Porównanie stopnia eliminacji ochratoksyny A przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej po 96 h inkubacji przy początkowym stężeniu OTA w podłożu 13,08 ppb.

Elimination of ochratoxin A by selected strains of lactic acid bacteria after 96 h incubation at the initial dose of OTA in the growth medium 13,08 ppb.

Mateo i in. (2010) wnioskują, że redukcja poziomu OTA jest istotnie wyższa w podłożu płynnym zawierającym mniejszą zawartość miktotoksyny. Na podstawie uzyskanych wyników własnych można stwierdzić, że badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej są w stanie eliminować więcej ochratoksyny A w warunkach umożliwiających im wzrost. Obecnie prowadzone są badania zmierzające do poznania mechanizmu eliminacji ochratoksyny A przez szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz określenia stabilności potencjalnego wiązania OTA przez komórki bakterii fermentacji mlekowej.

WNIOSKI

1. Badane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykazują predyspozycje do eliminacji ochratoksyny A w warunkach umożliwiających ich wzrost.
2. Stopień obniżania zawartości ochratoksyny A przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej zależy od czasu hodowli oraz początkowej liczby bakterii; istnieją istotne

różnice w poziomie eliminacji ochratoksyny A przy początkowej liczbie bakterii 10^5 j.t.k./cm³ i 10^9 j.t.k./cm³.

3. Proces eliminacji ochratoksyny A przez badane szczepy z rodzaju *Lactobacillus* ze środowiska modelowego jest częściowo odwracalny.

PIŚMIENNICTWO

1. Amigot S. L., Fulgueira C. L., Bottai H., Basilico J. C. (2006). New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biol. Technol.*, 41, 215-224
2. Baranowski A., Richter W. I. F., Grzybowski G. (2003). Wybrane mikotoksyny występujące w paszach gospodarskich. *Prace i mat. zootechniczne. Monografie i rozprawy. Jastrzębiec*
3. Dalie D. K. D., Deschamps A. M., Richard – Forget F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Contr.*, 21, 370-380
4. Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1398-1407
5. Grajewski J. (2003). Możliwości inaktywacji ochratoksyny A w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* u kurcząt. Bydgoszcz: Wyd. Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego
6. Gwiazdowska D., Czaczyk K., Gwiazdowski R. (2008). Usuwanie wybranych mikotoksyn z podłoża przez bakterie fermentacji propionowej i mlekowej. IX Konferencja Naukowa: Mikotoksyny w żywności i paszach. 25-27 czerwca 2008. Bydgoszcz, 65
7. Kapturowska A., Stecka K., Zielińska K., Kupryś M. (2010). Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w warunkach modelowych. Monografia: Wielokierunkowość badan w rolnictwie i leśnictwie, Kraków: UR, t. 1, 107-112
8. Kluczek J. P., Kojder A. (2000). Mikotoksyny w zarysie. Bydgoszcz: Wyd. Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy
9. Magnusson J., Schnürer J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, 70-78

10. Mateo E. M., Medina A., Mateo F., Valle-Algarra F. M., Pardo I., Jimenez M. (2010). Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Contr.*, 21, 23-28
11. Meca G., Blaiotta G., Ritieni A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine. *Moscato, Food Contr.*, 21, 579-583
12. O'Brien E., Dietrich D. (2005). Quantification and identification of fungal propagules in well-managed baled grass silage and in normal on-farm produced bales. *Crit. Rev. Toxicol.*, 35, 33-53
13. Pierides M., El-Nezami H., Peltonen K., Salminen S., Ahokas J. (2000). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *J. Food Protect.*, 63, 645-650
14. Piotrowska M., Żakowska Z. (2000). The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Progr. Biotechnol., Food Biotechnol.*, 17: 307-310
15. Piotrowska M., Żakowska Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, 54, 279-286