

**OCENA WZROSTU SZCZEPÓW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ
W OBECNOŚCI OCHRATOKSYNY A**

Agata U. Fabiszewska, Krystyna J. Zielińska,

Krystyna M. Stecka, Marta P. Kupryś-Caruk

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Zakład Technologii Fermentacji

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

agata.fabiszewska@ibprs.pl

Streszczenie

Metodą impedymetryczną oceniono wzrost wybranych pięciu szczepów bakterii fermentacji mlekowej (*Lactobacillus buchnerii* KKP 907, *L. fermentum* N KKP 2020, *L. plantarum* C KKP 788 p, *L. plantarum* K KKP 593 p i *L. plantarum* S KKP 880) w podłożach bez dodatku i z dodatkiem ochratoksyny A w stężeniu 12,7 oraz 50,75 ppb. Obecność ochratoksyny A w podłożu powodowała znaczne obniżenie rozwoju badanych szczepów w stosunku do ich hodowli w środowisku nieskażonym tą toksyną. Udowodniono, że najbardziej intensywnym wzrostem oraz aktywnością metaboliczną, mierzoną zmianami impedancji podłoża hodowlanego, odznaczał się szczep *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 p, zaś najslabszym *Lactobacillus buchneri* KKP 907. Najmniej wrażliwy na obecność ochratoksyny A w podłożu hodowlanym w stężeniu do 50,75 ppb okazał się szczep *Lactobacillus buchneri* KKP 907.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus*, ochratoksyna A, metoda impedymetryczna

**EVALUATION OF SELECTED LACTIC ACID BACTERIA STRAINS GROWTH
IN THE PRESENCE OF OCHRATOXIN A**

Summary

There was evaluated the growth of five lactic acid bacteria strains (*Lactobacillus buchnerii* KKP 907, *L. fermentum* N KKP 2020, *L. plantarum* C KKP 788 p, *L. plantarum* K KKP 593 p and *L. plantarum* S KKP 880) using impedimetric method in media free from ochratoxin A and in media containing ochratoxin A in concentration 12,7 and 50.75 ppb. Presence of ochratoxin A in culture medium resulted in lowering growth of examined strains in comparison with the culture in uncontaminated with OTA medium. There was proved that *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 p characterized the most intensive growth and metabolic activity, while *Lactobacillus buchneri* KKP 907 characterized the less intensive growth.

Lactobacillus buchneri KKP 907 was the less sensitive to ochratoxin A presence in medium in concentration up to 50.75 ppb.

Key words: *Lactobacillus*, ochratoxin A, impedimetric method

WSTĘP

Spośród wielu drobnoustrojów wykazujących zdolność do degradacji mikotoksyn – drugorzędowych metabolitów grzybów strzępkowych – szczególne zainteresowanie budzą bakterie fermentacji mlekowej, między innymi ze względu na ich właściwości prozdrowotne dla zwierząt i ludzi [Lavermicocca i in. 2000] oraz bardzo długą tradycję stosowania przez ludzi w produkcji żywności fermentowanej. Doniesienia naukowe ostatnich lat wskazują na występowanie wśród typowych bakterii fermentacji mlekowej szczepów o zróżnicowanych zdolnościach biodegradacji poszczególnych mikotoksyn. Niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej hamują równocześnie wzrost pleśni oraz tworzenie przez nie mikotoksyn [Piotrowska i Żakowska 2000, 2005, Fuchs i in. 2008]. Badania dotyczące biodegradacji mikotoksyn na drodze mikrobiologicznej prowadzone są od co najmniej 30 lat, jednak metoda ta nie jest wykorzystywana powszechnie do detoksykacji pasz i produktów spożywczych [Hult i in. 1976, Schatzmayr i in. 2004].

Szczepy bakterii fermentacji mlekowej, wchodzące w skład preparatów opracowanych w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, odznaczają się szczególnymi zdolnościami zarówno do hamowania rozwoju pleśni, jak i do obniżania poziomu ochratoksyny A obecnej w środowisku [Suterska i in. 2009a, b]. W wyniku badań modelowych wybrano szczepy bakterii z gatunków: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus buchneri* zdolne do obniżania zawartości ochratoksyny A w środowisku do 50% jej początkowej ilości. Kulturę starterową składającą się z tych szczepów przeznaczono do badań produkcyjnych dotyczących poprawy jakości i czystości mikrobiologicznej kiszzonek z runi łąkowej, produkowanych w gospodarstwach ekologicznych. Na podstawie wyników tych doświadczeń stwierdzono obniżenie zawartości ochratoksyny A o 70% w procesie kiszenia runi łąkowej z dodatkiem badanych kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do jej początkowej zawartości w materiale roślinnym [Suterska i in. 2009a].

Obecnie w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego prowadzone są prace nad skomponowaniem składu kultury starterowej przeznaczonej do kiszenia także innych, poza runią łąkową, surowców roślinnych. Ważne zagadnienie badawcze, które wiąże się z zastosowaniem preparatów bakteryjnych do zwalczania pleśni i ochratoksyny A

w paszach, to wrażliwość szczepów bakterii wchodzących w skład preparatów na początkową zawartość ochratoksyny A (OTA) w środowisku oraz określenie zmian jej zawartości w czasie działania preparatu bakteryjnego.

Piotrowska i Żakowska (2005) oceniały wzrost trzech szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*L. acidophilus* CH-5, *L. rhamnosus* GG i *L. plantarum*) metodą posiewów na podłożu MRS zawierającym 1000 ppb OTA w czasie 40 h inkubacji. Liczba j.t.k/cm³ badanych szczepów bakterii była od 2 do 3 razy większa na podłożu nieskażonym OTA w stosunku do podłoża zanieczyszczonego. Toksyczny efekt działania ochratoksyny A na wzrost oraz metabolizm komórek bakterii zaobserwowali badacze oceniający zdolność szczepów bakterii fermentacji mlekowej do eliminacji OTA w zakresie stężeń od 5 do 500 µg/cm³, choć w tych doświadczeniach na badaną cechę wpływała obecność toksyny dopiero w stężeniu 50 µg/cm³. W zakresie stężeń toksyny od 50 do 500 µg/cm³ obserwowano jednocześnie liniową zależność pomiędzy badaną cechą a stężeniem toksyny [Fuchs i in. 2008].

Celem niniejszej pracy była ocena metodą impedymetryczną wzrostu i wrażliwości na obecność ochratoksyny A pięciu szczepów bakterii fermentacji mlekowej, charakteryzujących się zdolnością do obniżania poziomu badanej mikotoksyny w środowisku hodowlanym [Kapturowska i in. 2010].

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Szczepy bakterii fermentacji mlekowej

Badania prowadzono z udziałem szczepów bakterii należących do Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS: *Lactobacillus buchneri* KKP 907 p, *L. fermentum* N KKP 2020 p, *L. plantarum* K KKP 593 p, *L. plantarum* C KKP 788 p, *L. plantarum* S KKP 880.

Podłoża hodowlane

W pracy wykorzystano następujące podłoża hodowlane:

- podłoże MRS firmy Difco o zawartości w g/1000 cm³: pepton (10), ekstrakt mięsny (10), ekstrakt drożdżowy (5), glukoza (20), Tween 80 (1), cytrynian amonu (2), octan sodu (5), siarczan (VI) magnezu (0,1), siarczan (VI) manganu (0,05), fosforan (V) potasu (2); końcowe pH 6,5,
- podłoże LM firmy Biomerieux (do badań impedancji) o zawartości w g/1000 cm³: glukoza (4), pepton (10), hydrolizat kazeiny (5), mleko w proszku (10), ekstrakt drożdży (7,5); końcowe pH 6,5.

Metoda impedymetryczna oceny wzrostu bakterii

Wzrost testowanych szczepów bakterii badano metodą impedymetryczną przy użyciu Mikrobiologicznego Systemu Monitorującego Bactometer firmy Biomerieux. System Bactometer umożliwia badanie wzrostu mikroorganizmów oraz ich aktywności metabolicznej bezpośrednio poprzez ocenę zmian elektrycznych właściwości podłoża hodowlanego spowodowanych wzrostem mikroorganizmów. Kompleksowe składniki podłoża (np. węglowodany i białka) elektrycznie obojętne lub słabo zjonizowane są przetwarzane w wyniku metabolizmu mikroorganizmów do mniejszych naładowanych cząstek, takich jak aminokwasy, mleczały, octany, kwaśne węglany. Efektem metabolizmu mikroorganizmów jest zwiększenie stężenia jonów i obniżenie impedancji (całkowity opór w środowisku przewodzącym prąd elektryczny), a podwyższenie konduktancji (siły jonowej środowiska) i pojemności (akumulacji ładunków elektrycznych wokół elektrod) [Hadley i Yajko 1985, Gracias i McKillip 2004]. Metoda impedymetryczna pozwala na detekcję mikroorganizmów bezpośrednio przez metabolity syntetyzowane zewnątrzkomórkowo lub pośrednio przez uwalniany dwutlenek węgla. Metoda impedymetrycznej oceny wzrostu bakterii fermentacji mlekowej została uznana za porównywalnie dokładną w odniesieniu do metody posiewów, a ponadto wskazuje się na jej zalety, takie jak szybkość pomiaru i automatyzacja układu doświadczalnego [Priego i in. 2011].

Mikrobiologiczny system Monitorujący Bactometer jest systemem modułowym, złożonym z 1–4 jednostek procesowych BPU (Bactometer Processing Unit), przystosowanym do inkubacji próbek i automatycznych odczytów badanej wielkości w każdej próbce w odstępach 6-minutowych. Wykonanie pomiarów impedancji w czasie wzrostu mikroorganizmów w określonym podłożu pozwala na wykreślenie krzywych wzrostu [Bactometer. Instrukcja producenta].

Układ doświadczeń

Ponieważ badane szczepy wchodziły w skład preparatów antymikotoksynowych do kiszzenia runi łąkowej, ich wrażliwość na OTA została oceniona przy dwóch stężeniach 12 i 50 ppb na podstawie wyników badań dotyczących skażenia runi łąkowej ochratoksyną A [Stecka i in. 2008].

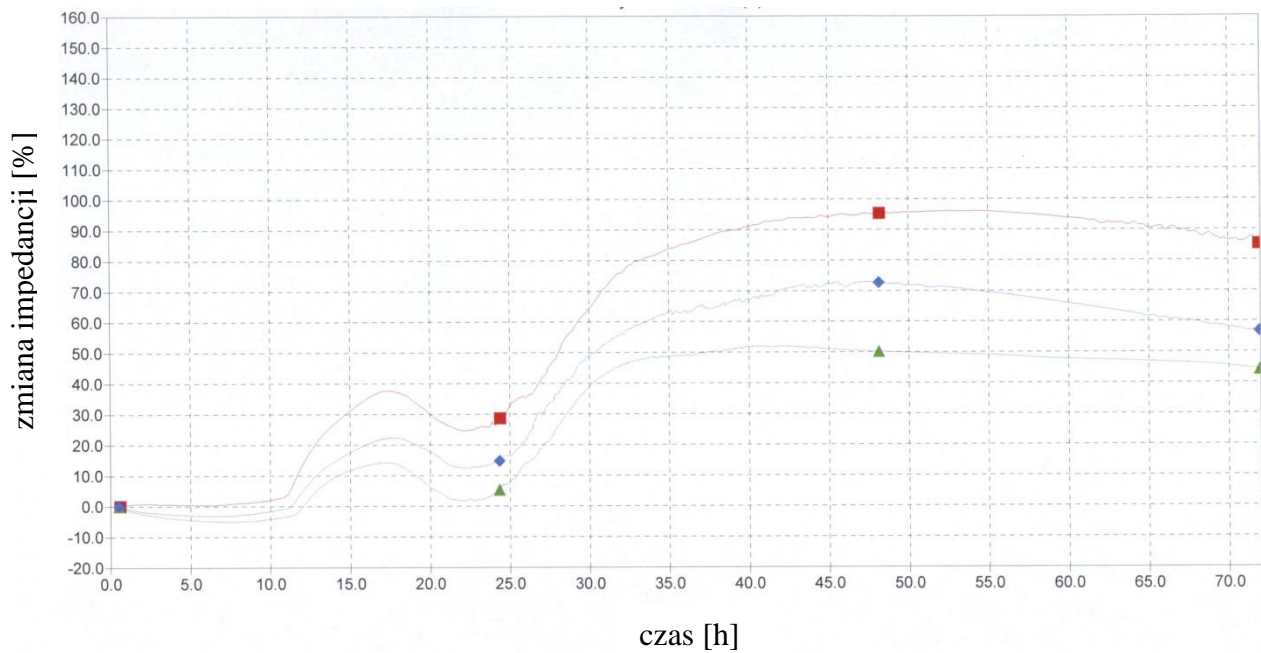
Przygotowano trzy podłoża hodowlane LM, do których wprowadzono wzorce ochratoksyny A w ilościach: 62,5 µl (stężenie OTA obliczone na 12,7 ppb) oraz 250 µl wzorca ochratoksyny A (stężenie OTA obliczone na 50,75 ppb), trzecie podłoże – bez dodatku ochratoksyny A stanowiło próbę kontrolną. Do poszczególnych komór hodowlanych aparatu

wlano po 1,8 cm³ każdego z przygotowanych podłoży, które zaszczipiono 0,2 cm³ zawiesiny danego szczepu bakterii o mianie 10⁵ j.t.k./cm³, pochodzącej z hodowli inokulacyjnej prowadzonej w podłożu MRS w temperaturze 30°C przez 24 h. Hodowlę w podłożu LM prowadzono w temperaturze 30°C przez 72 h, rejestrując zmiany impedancji podłoża za pomocą Mikrobiologicznego Systemu Monitorującego Bactometer.

WYNIKI I DYSKUSJA

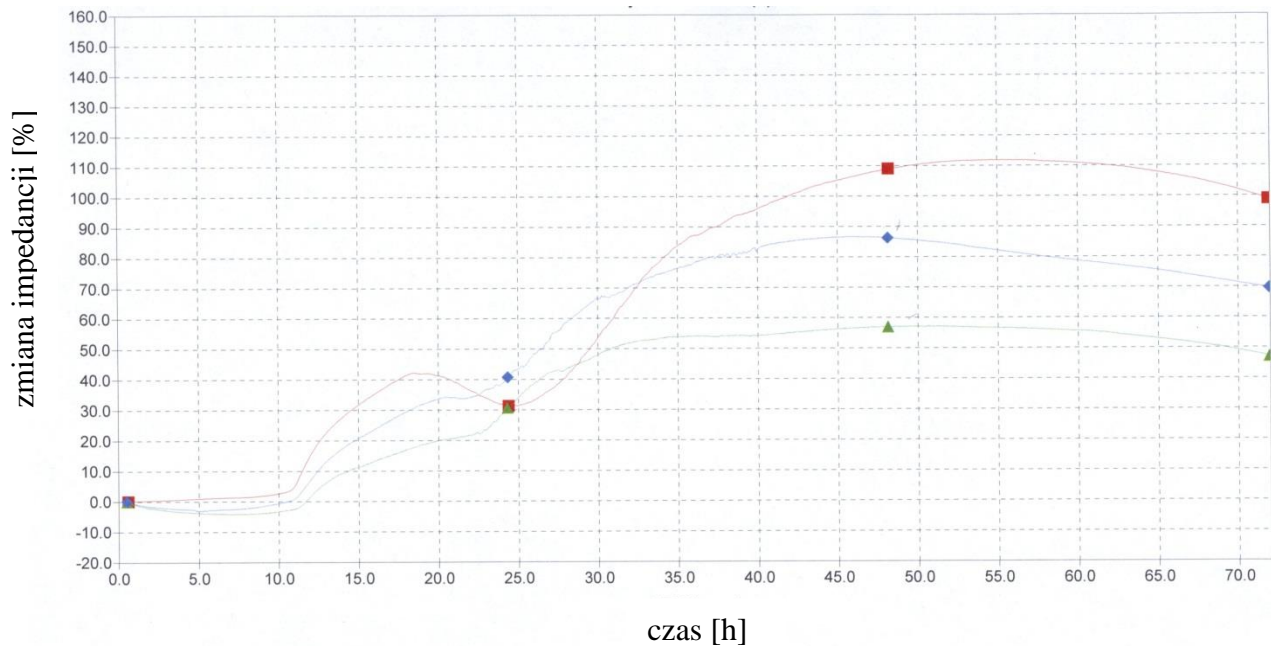
Pomiar zmian przewodności elektrycznej (impedancji) podłoża pozwolił na uzyskanie krzywych wzrostu badanych szczepów bakterii wyrażonych procentem zmian impedancji podłoża LM zawierającego 12,7 i 50,75 ppb ochratoksyny A oraz podłoża kontrolnego, które nie zawierało dodatku OTA. Krzywe wzrostu wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej prezentują rysunki 1, 2, 3, 4, 5.

W czasie hodowli szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 907 faza logarytmicznego wzrostu zakończyła się w 48 h hodowli, osiągając w przypadku próby kontrolnej 95%, w podłożu z dodatkiem niższego stężenia OTA 72%, a w podłożu z dodatkiem wyższego stężenia OTA 50% zmian impedancji (rysunek 1).



Rysunek 1. Krzywe wzrostu szczepu *Lactobacillus buchneri* KKP 907 przy różnych stężeniach ochratoksyny A (kolorem czerwonym oznaczono krzywą wzrostu dla próby kontrolnej, niebieskim podłoże zawierające 12,7 ppb OTA, zaś zielonym podłoże zawierające 50,75 ppb OTA)

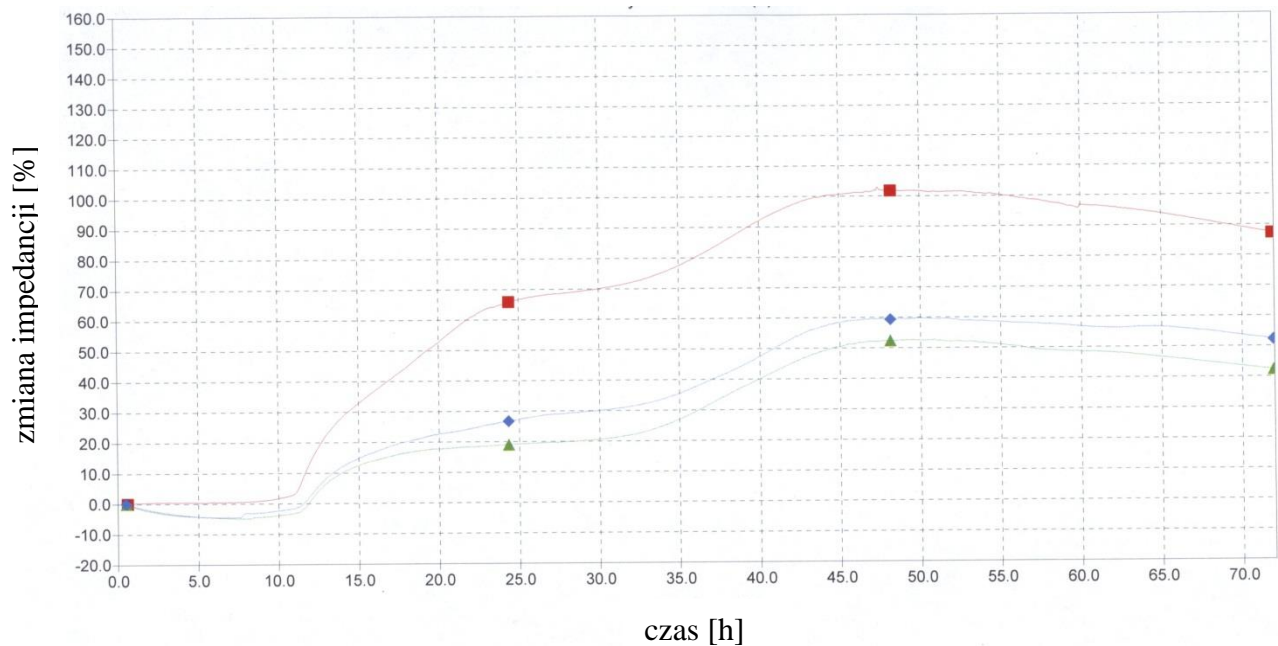
Growth curves of Lactobacillus buchneri KKP 907 growth, depending on content of ochratoxin A (red color stands for control growth curve, blue color stands for medium with 12.7 ppb OTA and green color for medium with 50.75 ppb OTA)



Rysunek 2. Krzywe wzrostu szczepu *Lactobacillus fermentum* N KKP 2020 p przy różnych stężeniach ochratoksyny A (kolorem czerwonym oznaczono krzywą wzrostu dla próby kontrolnej, niebieskim podłoże zawierające 12,7 ppb OTA, zaś zielonym podłoże zawierające 50,75 ppb OTA)

Growth curves of Lactobacillus fermentum N KKP 2020 p growth, depending on content of ochratoxin A (red color stands for control growth curve, blue color stands for medium with 12.7 ppb OTA and green color for medium with 50.75 ppb OTA)

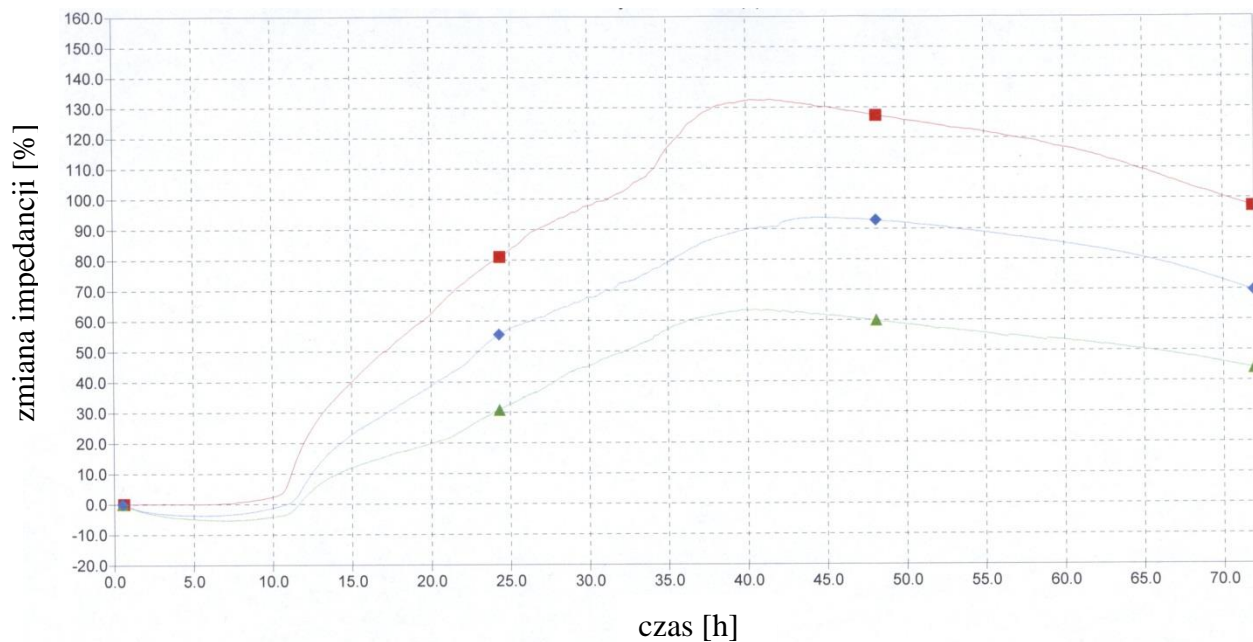
Bakterie szczepu *Lactobacillus fermentum* N KKP 2020 osiągnęły stacjonarną fazę wzrostu w 48 h hodowli, uzyskując odpowiednio 110% i 87% zmian impedancji w próbie kontrolnej oraz w próbie z niższym stężeniem OTA. W przypadku hodowli tego szczepu w podłożu z dodatkiem ochratoksyny A w stężeniu 50,75 ppb bakterie osiągnęły stacjonarną fazę wzrostu w 35 h hodowli, uzyskując 57% zmian impedancji w 48 h hodowli (rysunek 2).



Rysunek 3. Krzywe wzrostu szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 p przy różnych stężeniach ochratoksyny A (kolorem czerwonym oznaczono krzywą wzrostu dla próby kontrolnej, niebieskim podłoże zawierające 12,7 ppb OTA, zaś zielonym podłoże zawierające 50,75 ppb OTA)

Growth curves of Lactobacillus plantarum C KKP 788 p growth, depending on content of ochratoxin A (red color stands for control growth curve, blue color stands for medium with 12.7 ppb OTA and green color for medium with 50.75 ppb OTA)

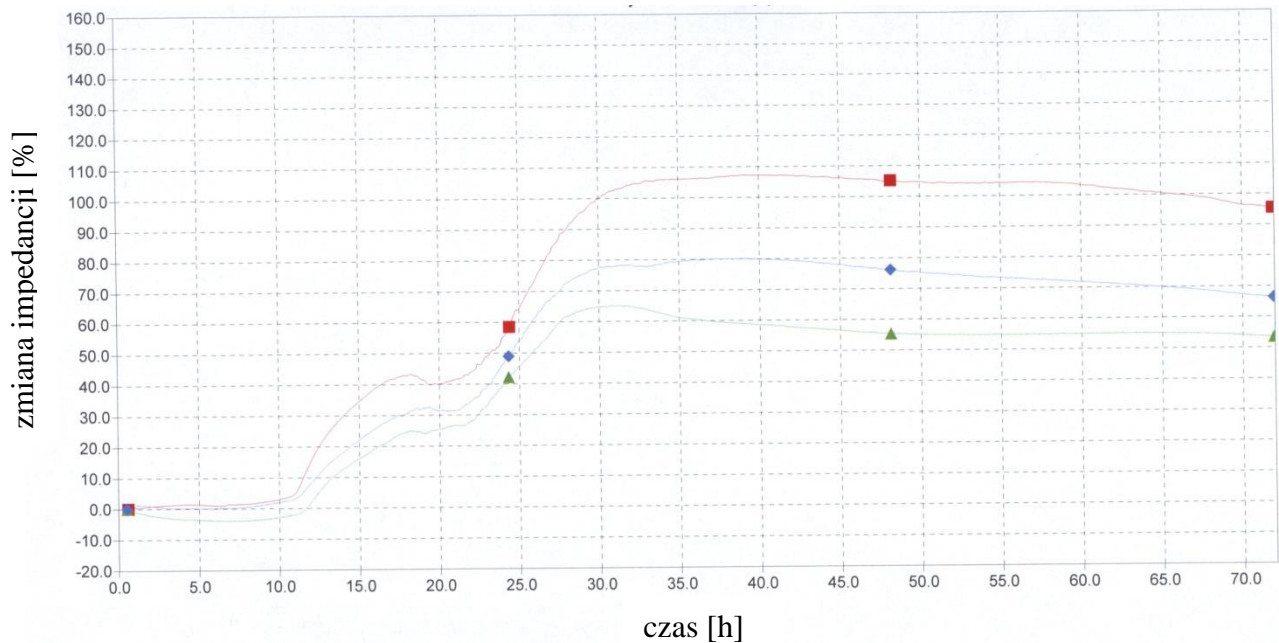
Negatywny wpływ obecności toksyny w stężeniu do 50,75 ppb na wzrost bakterii zaobserwowano w hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* C KKP 788 p. Po 48 h hodowli uzyskano 100% zmian impedancji w próbie kontrolnej, zaś w próbach właściwych 60% zmian w próbie o niższym stężeniu OTA i zaledwie 50% zmian impedancji dla hodowli w podłożu o wyższym stężeniu toksyny (rysunek 3).



Rysunek 4. Krzywe wzrostu szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 p przy różnych stężeniach ochratoksyny A (kolorem czerwonym oznaczono krzywą wzrostu dla próby kontrolnej, niebieskim podłoże zawierające 12,7 ppb OTA, zaś zielonym podłoże zawierające 50,75 ppb OTA)

Growth curves of Lactobacillus plantarum K KKP 593 p growth, depending on content of ochratoxin A (red color stands for control growth curve, blue color stands for medium with 12.7 ppb OTA and green color for medium with 50.75 ppb OTA)

Krzywe wzrostu szczepu *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 p wskazują, że bakterie weszły w fazę stacjonarnego wzrostu między 40 h a 48 h hodowli, osiągając w 48 h hodowli 130% zmian impedancji w próbie kontrolnej, 94% w podłożu z dodatkiem 12,70 ppb OTA oraz 62% w podłożu z dodatkiem 50,75 ppb OTA (rysunek 4).



Rysunek 5. Krzywe wzrostu szczepu *Lactobacillus plantarum* S KKP 880 przy różnych stężeniach ochratoksyny A (kolorem czerwonym oznaczono krzywą wzrostu dla próby kontrolnej, niebieskim podłoże zawierające 12,7 ppb OTA, zaś zielonym podłoże zawierające 50,75 ppb OTA)

Growth curves of Lactobacillus plantarum S KKP 880 growth, depending on content of ochratoxin A (red color stands for control growth curve, blue color stands for medium with 12.7 ppb OTA and green color for medium with 50.75 ppb OTA)

Szczep *Lactobacillus plantarum* S KKP 880 prezentował podobny wzrost, choć w 48 h hodowli po zakończeniu fazy logarytmicznego wzrostu cechował się niższym poziomem zmian impedancji. W podłożu bez dodatku toksyny badany szczep LAB uzyskał 105%, przy niższym stężeniu OTA 78%, a przy wyższym poziomie OTA 55% zmian impedancji (rysunek 5).

Analizując wykresy prezentujące wzrost badanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, można stwierdzić, że do 10 h nie obserwowano zmian przewodności podłoża w hodowli w żadnym z wariantów doświadczenia, co oznacza, że czas adaptacji do warunków środowiska był zbliżony w odniesieniu do wszystkich pięciu szczepów badanych bakterii i wynosił średnio 10 h niezależnie od składu zastosowanego podłoża.

Badane szczepy bakterii wykazywały zróżnicowaną żywotność, o czym świadczą zmiany impedancji w podłożach kontrolnych po 48 h. Największą aktywnością metaboliczną i co za tym idzie – najbardziej intensywnym wzrostem odznaczał się szczep *Lactobacillus*

plantarum K KKP 593 p (130% zmian impedancji po 48 h w podłożu kontrolnym), zaś najslabszym *Lactobacillus buchneri* KKP 907 (95% zmian impedancji po 48 h). Jednocześnie w warunkach doświadczenia badane szczepy różniły się wzrostem w podłożu z ochratoksyną A, co świadczy o ich odmiennej reakcji na jej toksyczne oddziaływanie na metabolizm komórki w czasie fazy wzrostu logarytmicznego.

W celu porównania hamującego wpływu ochratoksyny A na wzrost szczepów bakterii fermentacji mlekowej obliczono różnice wielkości zmian impedancji pomiędzy podłożem kontrolnym a podłożami właściwymi (zawierającymi ochratoksynę A) w systemie Bactometer w odniesieniu do poszczególnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, co zaprezentowano w tabeli 1.

Tabela. 1. Różnica zmian impedancji pomiędzy podłożem kontrolnym a podłożem zawierającym ochratoksynę A po 48 h hodowli szczepów bakterii fermentacji mlekowej

The difference of impedance between control medium and medium containing ochratoxin A after 48 h of lactic acid bacteria strains culture

Szczep bakterii	% zmiana impedancji dla podłoża kontrolnego	Różnica między zmianą impedancji w podłożu kontrolnym a podłożem zawierającym OTA [%]	
		Stężenie OTA w podłożu	
		12,7 ppb	50,75 ppb
<i>Lactobacillus buchneri</i> KKP 907 p	95	23	45
<i>Lactobacillus fermentum</i> N KKP 2020 p	110	23	53
<i>Lactobacillus plantarum</i> C KKP 788 p	100	40	50
<i>Lactobacillus plantarum</i> K KKP 593 p	130	36	68
<i>Lactobacillus plantarum</i> S KKP 880	105	27	50

Bezwzględne różnice zmian impedancji pomiędzy podłożem kontrolnym (bez OTA) a podłożem skażonym ochratoksyną A w stężeniu 12,7 ppb wskazały, że najbardziej wrażliwy na obecność OTA w podłożu okazał się szczep *L. plantarum* C KKP 788 p. Z kolei najwyższym zahamowaniem aktywności metabolicznej, wyrażonej zmianami impedancji

podłoża, kiedy w podłożu znajdowała się OTA w stężeniu 50,75 ppb, charakteryzował się szczep *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 p (68% różnicy pomiędzy impedancją podłoża kontrolnego i zawierającego OTA). Najmniej wrażliwy na obecność OTA w stężeniu do 50,75 ppb okazał się szczep *Lactobacillus buchneri* KKP 907 p (45% różnicy pomiędzy impedancją podłoża kontrolnego i zawierającego OTA w stężeniu odpowiednio 50,75 ppb).

WNIOSKI

1. Obecność w podłożu ochratoksyny A w stężeniu do 50,75 ppb powoduje obniżenie intensywności wzrostu badanych szczepów, mierzonej zmianami impedancji podłoża hodowlanego, w stosunku do ich hodowli w środowisku nieskażonym tą toksyną.
2. Najbardziej intensywnym wzrostem oraz aktywnością metaboliczną mierzoną zmianami impedancji podłoża hodowlanego w warunkach *in vitro* odznaczał się szczep *Lactobacillus plantarum* K KKP 593 p, zaś najslabszym *Lactobacillus buchneri* KKP 907.
3. Najmniej wrażliwy na obecność w podłożu hodowlanym ochratoksyny A w stężeniu do 50,75 ppb okazał się szczep *Lactobacillus buchneri* KKP 907 p.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bactometer. Automated impedance technology for rapid detection and enumeration. Mat.* Firmy Biomerieux, instrukcja producenta
2. Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Kn^asmüller S. (2008). *Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria.* Food Chem. Toxicol., 46, 1398-1407
3. Gracias K.S., McKillip J.L. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can. J. Microbiol.*, 50, 883-890
4. Hadley W.K., Yajko D.M. (1985). Detection for microorganisms and their metabolism by measurement of electrical impedance. Instrumental method for rapid microbiological analysis, ed. Nelson W.H., Wyd. VCH Publishers, 193-209
5. Hult K., Teiling A., Gatenbeck S. (1976). Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 443-444
6. Kapturowska A., Stecka K., Zielińska K., Kupryś M. (2010). Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w warunkach modelowych. W: Wielokierunkowość badań w rolnictwie i leśnictwie. Praca zbiorowa pod redakcją B. Wiśniowieckiej-Kielan. Kraków: Wydaw. UR, t. 1, 107-112

7. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4084–4090
8. Piotrowska M., Żakowska Z. (2000). The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Prog. Biotechnol., Food Biotechnol.*, 17, 307-310
9. Piotrowska M., Żakowska Z. (2005). Elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, 54, 279-286
10. Priego R., Medina L.M., Jordano R. (2011). Bactometer system versus traditional methods for monitoring bacteria populations in salchichon during its ripening process. *J. Food Prot.*, 74 (1), 145-148
11. Schatzmayr G., Heidler D., Fuchs E., Binder E.M. (2004). Microorganism for biological detoxification of mycotoxins, namely ochratoxins and/or zearalenons, as well as method and use thereof. United States Patent Application Publication No. US 2004/0208956A1
12. Stecka K.M., Zielińska K.J., Grzybowski R.A., Suterska A.M., Kupryś M., Miecznikowski A.H. (2008). Badanie wpływu stosowania ekologicznej metody kiszenia runi łąkowej na obniżenie zawartości aflatoksyn. Streszczenie wyników badań z zakresu rolnictwa ekologicznego zrealizowanych w 2008 roku. Warszawa, Agencja Wyd.-Poligraficzna „Gimpo”, 87-94
13. Suterska A.M., Zielińska K.J., Grzybowski R.A., Stecka K.M., Miecznikowski A.H., Kupryś M.P. (2009a). Wpływ wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* na ograniczenie skażenia pleśniami i ochratoksyną A kiszzonek z runi łąkowej. *J. Research Agr. Eng.*, 54 (4), 125-129
14. Suterska A.M., Zielińska K.J., Stecka K.M., Grzybowski R.A., Miecznikowski A.H. (2009b). Wykorzystanie unikalnych cech szczepów bakterii fermentacji mlekowej do poprawy jakości i bezpieczeństwa pasz. W: I Kongres Nauk Rolniczych, 14-15 maja 2009 r., Puławy, Materiały konferencyjne, 253-254