

WŁYW BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ NA OBNIŻENIE SKAŻENIA AFLATOKSYNĄ B₁ KISZONEJ RUNI ŁĄKOWEJ

Marta Kupryś-Caruk, Krystyna Zielińska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Zakład Technologii Fermentacji
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Streszczenie

Celem pracy była ocena zdolności różnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonej rośliny, do obniżania poziomu aflatoksyny B₁ w warunkach modelowych oraz produkcyjnych.

Badane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* w warunkach *in vitro* wykazały zdolność do obniżania zawartości aflatoksyny B₁ w pożywce MRS. Poziom eliminacji AFLB₁ wynosił 36–61%, przy czym efekt ten był zależny od szczepu i częściowo odwracalny. Najwyższy poziom eliminacji toksyny zaobserwowano w przypadku hodowli szczepów w temperaturze 20°C.

Kiszenie runi łąkowej z dodatkiem trzech wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przyczyniło się do istotnego obniżenia zawartości aflatoksyny B₁ w stosunku do jej zawartości w kiszonkach wykonanych bez dodatku LAB. Zawartość toksyny w kiszonkach z dodatkiem bakterii była trzykrotnie niższa niż w kiszonkach kontrolnych. Kiszonki wykonane z dodatkiem bakterii charakteryzowały się również niższą liczebnością grzybów pleśniowych niż kiszonki kontrolne. Dodatek bakterii nie miał natomiast istotnego wpływu na pozostałe parametry kiszonek, takie jak pH i zawartość kwasów organicznych.

Słowa kluczowe: aflatoksyna B₁, kiszonka, bakterie fermentacji mlekowej

THE EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON REDUCING AFLATOXIN B₁ CONTAMINATION OF MEADOW SWARD SILAGES

Summary

The aim of the study was to evaluate the ability of different strains of lactic acid bacteria from *Lactobacillus spp.* genera to reduce the level of aflatoxin B₁ in model and production conditions.

Lactic acid bacteria strains were isolated from natural environment, from ensilaged plants. The strains tested *in vitro* have shown the ability to reduce the level of aflatoxin B₁ in MRS medium. AFLB₁ elimination level was 36-61%, the effect was dependent on the strain used and partially reversible. The highest level of toxin elimination was observed during the growth of strains at 20 °C.

Silages from meadow sward from I harvest were prepared in ballots with and without the addition of mixed starter culture of three selected strains from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri* genus. Ensiling meadow sward with the addition of bacteria has contributed to a significant reduction of aflatoxin B₁ in relation to its content in control silages. The toxin content in silages with the addition of bacteria was three times lower than in the control silages. In silages prepared with lactic acid bacteria strains the number of moulds was significantly lower than in control silages. Addition of bacteria did not influence on other silages parameters like pH and lactic and acetic acid content.

Ensiling of meadow sward with the addition of lactic acid bacteria strains, which have ability to reduce aflatoxin B₁ level, constitutes an useful, biological method of feed decontamination.

Key words: aflatoxin B₁, lactic acid bacteria, silage

WSTĘP

Kiszenie jest jedną z najpowszechniejszych metod konserwowania pasz objętościowych. Wytwarzany w wyniku tego procesu kwas mlekowy wpływa na obniżenie pH kiszonek, przyczyniając się do zahamowania wzrostu wielu drobnoustrojów i zachowania trwałości kiszonych roślin podczas ich przechowywania. Jednak przy nieodpowiednio zachodzącej fermentacji mlekowej w kiszonce mogą rozwijać się bakterie gnilne, drożdże czy grzyby pleśniowe, które obniżają jakość kiszonych pasz poprzez procesy tzw. wtórnej fermentacji. Dochodzi wtedy do utraty cennych składników paszy oraz pogorszenia jej cech organoleptycznych. Jednakże większym niebezpieczeństwem dla zwierząt skarmianych

kiszonkami są metabolity wtórne grzybów pleśniowych z rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Występowanie grzybów toksynotwórczych powodujących straty w uprawach uzależnione jest od wielu czynników, w tym od pogody [Lenart, Klimek-Kopyra 2011]. Podwyższona temperatura i duża ilość opadów w czasie wegetacji roślin sprzyjają ich porażeniu przez grzyby pleśniowe.

Mikotoksyny są związkami kancerogennymi, mutagennymi, teratogennymi itp., a do najbardziej niebezpiecznych zalicza się aflatoksyny [Laciaková i in. 2008]. W mleku krowim stwierdza się obecność aflatoksyny M, która jest pochodną aflatoksyny B₁ (efekt carry-over) [Masoero i in. 2007]. Z tego powodu należy kontrolować stan higieniczny kiszonek podawanych bydłu, pomimo że zwierzęta poligastryczne uznawane są za mniej wrażliwe na działanie mikotoksyn z uwagi na zdolność mikroorganizmów żwacza do neutralizowania toksyn pleśniowych [Laugalis i in. 2007].

Od wielu lat prowadzone są badania nad możliwościami ograniczenia skażenia żywności i pasz mikotoksynami zarówno poprzez hamowanie wzrostu grzybów pleśniowych, jak i eliminację toksyn na drodze chemicznej, fizycznej i mikrobiologicznej [Bata, Lasztity 1999; Denli, Okan 2006]. Najbardziej przydatna do praktycznego zastosowania jest metoda mikrobiologiczna związana z wykorzystaniem bakterii kwasu mlekowego do poprawy jakości i trwałości kiszonych pasz [Grajewski i in. 2007; Kung, Ranjit 2001; Weinberg i in. 2002]. Niektórzy badacze twierdzą, że bakterie fermentacji mlekowej syntetyzują związki, które hamują działanie mikotoksyn. Związki te należą do polipeptydów i mogą być unieczynniane pod wpływem aktywności enzymów proteolitycznych [Dalie i in. 2010]. Jako mechanizm usuwania mikotoksyn ze środowiska przez bakterie mlekowe wymienia się również wiązanie toksyn do struktur ścian komórkowych [Bueno i in. 2006; Byun, Yoon 2003; Lahtinen i in. 2004].

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz.U. 2014 poz. 1213) określa, że dopuszczalna maksymalna zawartość aflatoksyny B₁ w materiałach paszowych o zawartości wody 12% wynosi 0,02 mg/kg. W przypadku mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych podawanych bydłu mlecznemu i cielętom, rozporządzenie ogranicza maksymalną zawartość AFLB₁ do 0,005 mg/kg.

Skażenie pasz toksynami pleśniowymi jest szkodliwe dla zdrowia ludzi i zwierząt, dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych metod, których celem jest dekontaminacja zanieczyszczonych produktów. Aby zastosować w praktyce bakterie fermentacji mlekowej charakteryzujące się zdolnością do usuwania aflatoksyny B₁ ze środowiska, konieczne jest określenie warunków, w jakich działanie poszczególnych szczepów, polegające na obniżaniu

zawartości toksyny do bezpiecznego poziomu, jest najbardziej efektywne.

Celem pracy była ocena zdolności różnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonych roślin, do obniżania zawartości aflatoksyny B₁ w warunkach modelowych oraz określenie skuteczności synergicznego ich działania w procesie dekontaminacji kiszonych pasz w warunkach produkcyjnych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Szczepy użyte do badań pochodziły z Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie i zostały wyizolowane ze środowiska naturalnego, z kiszonych roślin. Na podstawie analizy sekwencji podjednostki 16S rRNA szczepy te zostały zidentyfikowane jako: *Lactobacillus plantarum* (K), *Lactobacillus plantarum* (C), *Lactobacillus buchneri* (B), *Lactobacillus paracasei* (P), *Lactobacillus fermentum* (F), *Lactobacillus rhamnosus* (R), *Lactobacillus brevis* (D).

W celu zbadania zdolności wyżej wymienionych szczepów do usuwania aflatoksyny B₁ w warunkach modelowych wykonano następujące doświadczenie. Płynną pożywkę MRS zaszczerpiono 24-godziną kulturą pojedynczych szczepów, uzyskując początkową koncentrację bakterii rzędu 10⁹ jtk·ml⁻¹ (co określono poprzez pomiar gęstości optycznej zawiesiny komórek). Do pożywki dodano wzorzec aflatoksyny B₁ (Biopure), uzyskując stężenie 50 ng·ml⁻¹. Bakterie inkubowano przez 4 doby w temperaturze 30°C. Po określonym czasie komórki bakterii odwirowano (15 min, 10 000 rpm), a w podłożu oznaczono zawartość mikotoksyny immunoenzymatyczną metodą Elisa (testy firmy r-Biopharm, czytnik Stat Fax firmy Awarness). Zbadano też zdolność szczepów do obniżania poziomu AFLB₁ w zależności od temperatury hodowli. Bakterie hodowano przez 24 godz. w pożywce MRS w obecności aflatoksyny B₁ (50 ng·ml⁻¹) w temperaturze: 20, 25, 30 i 35°C (początkowa liczba bakterii wynosiła 10⁹ jtk·ml⁻¹).

Wszystkie próby powtórzono co najmniej trzy razy.

Ilość toksyny w podłożu pochodzonym porównywano z ilością AFLB₁ w próbach kontrolnych (inkubowanych bez bakterii). Poziom eliminacji aflatoksyny B₁ obliczono według wzoru:

$$\text{poziom eliminacji AFLB}_1 = [(\text{stężenie AFLB}_1 \text{ w próbce kontrolnej} - \text{stężenie AFLB}_1 \text{ w próbce badanej}) / \text{stężenie AFLB}_1 \text{ w próbce kontrolnej}] * 100\%$$

W celu określenia skuteczności synergicznego działania wybranych szczepów LAB (ang. *Lactic Acid Bacteria*) w warunkach produkcyjnych w Instytucie Technologicznym

w Falentach zostały wykonane w balotach kiszonki z podsuszanej, ekologicznej runi łąkowej z pierwszego pokosu. W czasie balotowania na rośliny został rozpylony roztwór wodny preparatu zawierający wybrane szczepy bakterii. Preparat (rozpuszczalny w wodzie granulat wyprodukowany metodą suszenia fluidyzacyjnego) zawierał bakterie w ilości nie mniej niż 10^9 jtk \cdot g⁻¹. Preparat został wykonany opatentowaną metodą opracowaną w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie, a szczepy w nim zawarte były zmieszane w stosunku 1:1:1. Rozpylono taką ilość preparatu, aby uzyskać koncentrację bakterii ok. 10^5 jtk \cdot g⁻¹ kiszonki. Wykonano również kiszonki kontrolne bez dodatku bakterii. Po 12 tygodniach kiszenia ze środka balotów oraz z warstwy zewnętrznej kiszzonek zostały pobrane próby materiału w celu dokonania oceny jakościowej kiszzonek.

Wartość pH kiszzonek oznaczono metodą potencjometryczną (pH-metr SevenEasy, Mettler Toledo), zawartość kwasów organicznych metodą enzymatyczną (testy firmy R-BIOPHARM), liczebność grzybów pleśniowych zgodnie z PN-ISO 21527-1:2009. Łącznie przeanalizowano kiszonki z 30 balotów (15 balotów z kiszonką kontrolną i 15 balotów z kiszonką wykonaną z udziałem preparatu bakteryjnego). Z każdego balotu pobrano minimum dwie próby ze środka i dwie próby z powierzchni (z różnych miejsc).

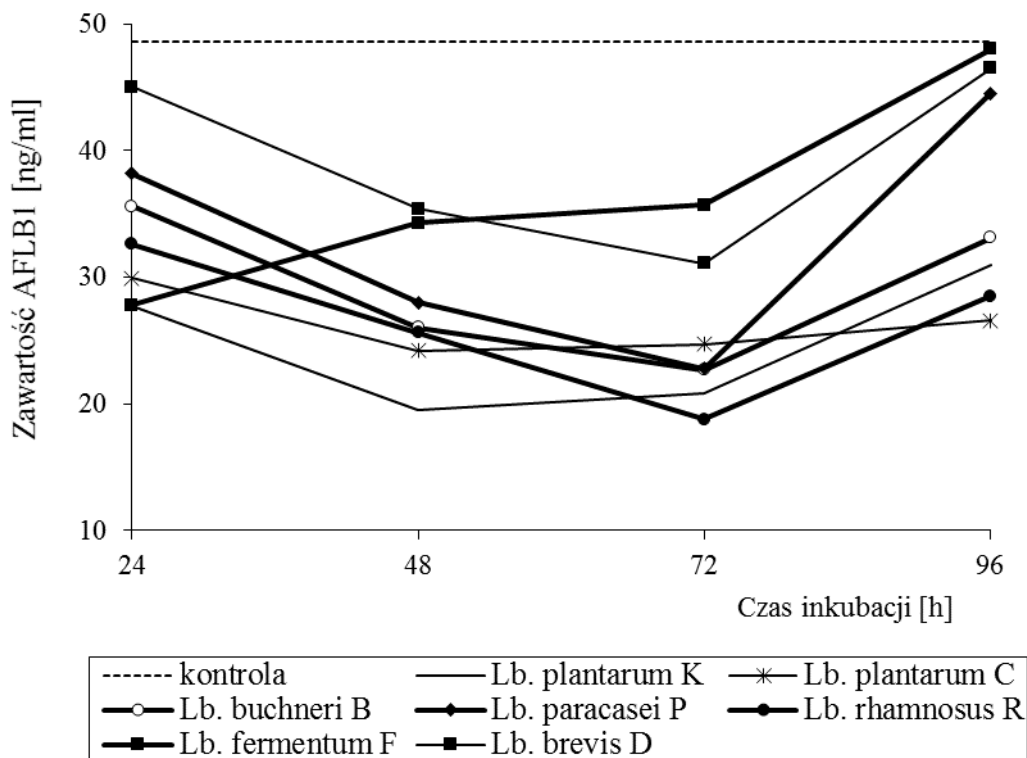
Metody analizy statystycznej

Porównania średnich wartości pH, zawartości kwasów organicznych i liczebności grzybów pleśniowych w kiszzonekach dokonano testem t-Studenta, przy poziomie istotności $\alpha=0,05$ (Statistica 8).

W celu zbadania wpływu efektu temperatury hodowli na poziom eliminacji ochratoksyny A z podłoża (warunki modelowe) oraz wpływu dodatku bakterii na skażenie kiszzonek ochratoksyną wykonano czynnikiemową analizę wariancji. W przypadku stwierdzenia istotności efektów wykonano analizy post hoc w celu szczegółowego porównania średnich wartości poziomów eliminacji OTA. Dla wszystkich analiz przyjęto poziom istotności 0,05.

WYNIKI I DYSKUSJA

Poziomy eliminacji aflatoksyny B₁ z podłoża w warunkach modelowych były zróżnicowane i zależne od szczepu bakterii oraz od czasu ich hodowli (rysunek 1).

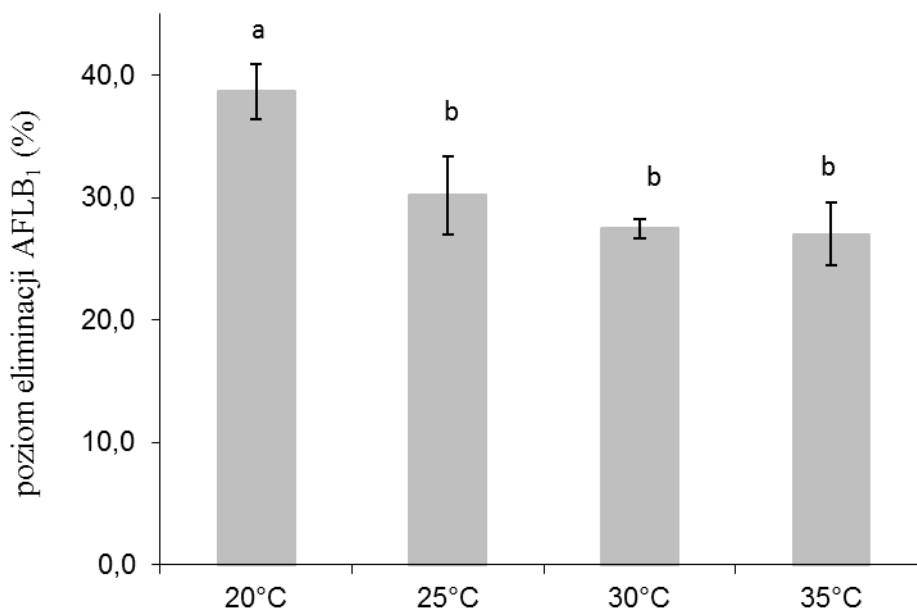


Rysunek 1. Zmiana zawartości AFLB₁ w podłożu w czasie hodowli różnych szczepów bakterii fermentacji mlekowej (temperatura inkubacji 30°C)
AFLB₁ content change in the medium during incubation of different strains of lactic acid bacteria (temperature of incubation 30°C)

Najwyższy poziom eliminacji aflatoksyny B₁ (61,3%) wykazał szczep *Lactobacillus rhamnosus* (R) po trzeciej dobie inkubacji, natomiast *Lactobacillus brevis* (D) obniżył zawartość toksyny w najmniejszym stopniu (poziom eliminacji 36% po trzeciej dobie hodowli). Zawartość AFLB₁ w podłożu spadała do drugiej lub trzeciej doby inkubacji w zależności od szczepu (wyjątek stanowił *Lactobacillus fermentum* (F), w przypadku którego najniższą zawartość AFLB₁ oznaczono po pierwszej dobie inkubacji). Po trzeciej dobie inkubacji zawartość AFLB₁ w podłożu wzrosła, co może wskazywać na fizyczny charakter mechanizmu jej usuwania poprzez wiązanie toksyny do struktur ściany komórkowej. Spostrzeżenie, że wiązanie aflatoksyny B₁ do struktur ścian komórkowych jest procesem szybkim i częściowo odwracalnym, potwierdzają też inne doniesienia literaturowe [El-Nezami i in. 1998 b; Peltonen i in. 2001].

Wykazano również, że temperatura hodowli w przedziale 25–35°C nie ma istotnego wpływu na zróżnicowanie średnich poziomów eliminacji AFLB₁ przez wszystkie badane szczepy. Poziom eliminacji OTA po pierwszej dobie hodowli wynosił 18–30%. Istotnie wyższy poziom eliminacji toksyny ($p \leq 0,05$) zaobserwowano w przypadku inkubacji

wszystkich badanych szczepów w temperaturze 20°C, poziom ten mieścił się w przedziale 37–40% (rysunek 2).



Rysunek 2. Poziom eliminacji AFLB₁ po 24 godzinach hodowli bakterii w zależności od temperatury na przykładzie *Lactobacillus plantarum* K (wartości średnie i odchylenia standardowe; a, b – grupy jednorodne)
Aflatoxin B₁ elimination level depending on the temperature of incubation, e.x. Lactobacillus plantarum K (mean values and standard deviations; a, b – homogenous groups)

Jak podają źródła literaturowe, wiele gatunków bakterii fermentacji mlekowej jest zdolnych do usuwania aflatoksyny B₁ w warunkach modelowych [Shahin 2007; Zinedine i in. 2005]. El-Nezami i in. [1998 a] twierdzą, że do istotnie znaczącego obniżenia zawartości aflatoksyny B₁ potrzeba minimum 10⁹ jtk·ml⁻¹ bakterii, a badane przez nich probiotyczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej w najwyższym stopniu obniżyły zawartość aflatoksyny B₁ w temp. inkubacji 37°C.

Przedstawione badania wskazują więc, że zdolność bakterii mlekowych do usuwania aflatoksyny B₁ ze środowiska jest bardzo zróżnicowana w zależności od gatunku, szczepu czy warunków hodowli. W celu wykorzystania zdolności LAB do usuwania aflatoksyny B₁ z kiszonek należy dobrać takie szczepy, które w tych warunkach środowiskowych będą wykazywać najwyższą pożądaną aktywność.

Do dalszych badań wybrano dwa szczepy z gatunku *Lactobacillus plantarum* (K i C) oraz *Lactobacillus buchneri* B, w przypadku których efekt ponownego uwalniania aflatoksyny B₁

do środowiska był najmniejszy. Weszły one w skład mieszanej kultury starterowej przeznaczonej do zakiszenia runi łąkowej w skali produkcyjnej.

W kiszonkach kontrolnych średnia zawartość aflatoksyny B₁ była ponad trzykrotnie wyższa (9,3 µg·kg⁻¹ ś.m.) niż w kiszonkach inokulowanych bakteriami (2,8 µg kg⁻¹ ś.m.) (tabela 1).

Tabela 1. Zawartość AFLB₁ w runi łąkowej i kiszonkach (wartości średnie i odchylenia standardowe)

AFLB₁ content in meadow sward and silages (mean values and standard deviations)

	Aflatoksyna B ₁ (µg·kg ⁻¹ ś.m.)
run łąkowa	1,7 ± 0,5 a
kiszonka kontrolna	9,3 ± 1,9 b
kiszonka z dodatkiem bakterii	2,8 ± 0,3 c

a, b, c – grupy jednorodne

ś.m. – świeża masa

Spadek zawartości aflatoksyny B₁ w kiszonkach nie jest spowodowany jedynie przez fizyczne wiązanie toksyny przez bakterie mlekowe. Jak podają źródła literaturowe, LAB wytwarzają wiele substancji o działaniu hamującym wzrost i wytwarzanie mikotoksyn przez grzyby pleśniowe. Do związków tych, poza kwasem mlekowym, octowym i propionowym, należą też 2,3-butanodiol, kwas 3-fenylomlekowy, kwas hydrocynamonowy, azelainowy, 3,4-hydroksycykloheksano-1-karboksyłowy i inne [Oliveira i in. 2014; Dalie i in. 2010].

Dodatek wybranych szczepów nie wpłynął istotnie na zmianę pH oraz zawartość kwasów mlekowego i octowego w kiszonkach, które, podobnie jak kiszonki kontrolne, charakteryzowały się dobrą jakością, na co wskazywała również ocena organoleptyczna. W kiszonkach z dodatkiem bakterii istotnie niższa była liczebność grzybów pleśniowych w porównaniu z kiszonkami kontrolnymi (tabela 2).

Tabela 2. Parametry kiszonek z runi łąkowej (wartości średnie i odchylenia standardowe)
Parameters of meadow sward silages (mean values and standard deviations)

kiszonki	pH	kwasy organiczne (g·kg ⁻¹ s.m.)			liczebność grzybów pleśniowych (log jtk·g ⁻¹ ś.m.)	ocena organoleptycz na
		mlekowy	octowy	masłowy		
kontrolne	5,0 ± 0,01	33,4 ± 9,9	5,1 ± 0,51	n.o.	5,3 ± 4,4 a	struktura roślin dobrze zachowana, barwa zbliżona do trawy przed zakiszeniem, zapach typowy dla kiszonki
z dodatkiem bakterii	4,8 ± 0,05	36,4 ± 9,4	2,2 ± 0,23	n.o.	2,5 ± 2,0 b	struktura roślin dobrze zachowana, barwa zbliżona do trawy przed zakiszeniem, zapach intensywny, typowy dla kiszonki

n.o. – nie oznaczono (poniżej granicy oznaczalności metody)

a, b – grupy jednorodne

ś.m. – świeża masa

s.m. – sucha masa

WNIOSKI

Wyizolowane z roślin badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* w warunkach *in vitro* wykazały zdolność do obniżania poziomu aflatoksyny B₁ z podłoża hodowlanego, przy czym efekt ten był zależny od szczepu i częściowo odwracalny. Najwyższy poziom eliminacji toksyny zaobserwowano w przypadku hodowli badanych szczepów w temperaturze 20°C.

Kiszenie z dodatkiem wybranych trzech szczepów bakterii przyczyniło się do istotnego zmniejszenia zawartości aflatoksyny B₁ w stosunku do jej zawartości w kiszonkach kontrolnych. Dodatek bakterii istotnie wpłynął także na obniżenie liczebności grzybów pleśniowych w kiszonkach, nie miał natomiast wpływu na pozostałe parametry kiszonek (pH, zawartość kwasów organicznych).

Wykorzystanie szczepów bakterii fermentacji mlekowej, w postaci tzw. dodatków paszowych, w celu poprawienia jakości i trwałości kiszonek jest od dawna znane i stosowane

w praktyce. Poprzez dodatek odpowiednich szczepów bakterii fermentacji mlekowej, które efektywnie usuwają aflatoksynę B₁ ze środowiska, można dodatkowo zabezpieczyć kiszone pasze przed skażeniem tą niebezpieczną toksyną.

PIŚMIENNICTWO

1. Bata A., Lasztity R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.*, 10 (6/7), 223-228
2. Bueno D. J., Casale C. H., Pizzolitto R. P., Salvano M. A., Oliver G. (2006). Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J. Food Protect.*, 70 (9), 2148-2154
3. Byun J. R., Yoon Y. H. (2003). Binding of aflatoxin G₁, G₂ and B₂ by probiotic *Lactobacillus spp.* *Asian Australasian J. Anim. Sci.*, 16 (11), 1686-1689
4. Dalie D., Deschamps A., Richard-Forget F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21, 370-380
5. Denli M., Okan F. (2006). Efficiency of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B₁ in broiler diets. *South African J. Anim. Sci.*, 36 (4), 222-228
6. El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. (1998a). Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Sci.*, 61 (4), 466-468
7. El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. (1998b). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 321-326
8. Grajewski J., Potkański A., Raczkowska-Werwinska K., Twarużek M., Miklaszewska B., Grabowska M., Gubała A., Selwet M. (2007). Jakość higieniczna kiszonki z kukurydzy zakiszanej z dodatkiem biologicznym lub chemicznym. *Medycyna Wet.*, 63 (2), 205-208
9. Kung L., Ranjit N. K. (2001). The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.*, 84, 1149-1155
10. Laciaková A., Cicoňová P., Máté D., Laciak V. (2008). Aflatoxins and possibilities of their biological detoxification. *Medycyna Wet.*, 64 (3), 276-279
11. Lahtinen S., Haskard C., Ouwenhand A., Salminen S., Ahokas J. (2004). Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit. Contam.*, 21, 158-164

12. Laugalis J., Jatkauskas J., Vrotniakiene V., Zelvyte R., Sederevicius A., Monkeviciene I., Makauskas S. (2007). Effect of inoculation on silage quality and rumen fermentation in dairy cows. *Medycyna Wet.*, 63(9), 1057-1059
13. Lenart A., Klimek-Kopyra A. (2011). Wpływ warunków pogodowych na stopień porażenia grzybami pleśniowymi różnych odmian kukurydzy (*Zea mays* L.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 567, 177-182
14. Masoero F., Gallo A., Moschini M., Piva G., Diaz D. (2007). Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal.*, 1 (9), 1344-1350
15. Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Dairy Sci*, 84, 2152-2156
16. Piotrowska M., Żakowska Z. (2000). The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Prog. Biotechnol.*, 17, 307-310
17. PN-ISO 21527-1:2009 Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni – Część 1: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody wyższej niż 0,95
18. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 25 sierpnia 2014 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie zawartości substancji niepożądanych w paszach (Dz.U. 2014 poz. 1213)
19. Shahin A. A. M. (2007). Removal of aflatoxin B1 from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *Int. J. Agricult. Biol.*, 9 (1), 71-75
20. Weinberg Z. G., Ashbell G., Hen Y., Azrieli A., Szakacs G., Filya I. (2002). Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 7-11
21. Zinedine A., Faid M., Benlemlih M. (2005). In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *Int. J. Agricult. Biol.*, 7 (1), 67-70