



UNIwersytet  
EKONOMICZNY  
W POZNANIU

**Krzysztof Juś**

**Mikrobiologiczne metody ograniczania występowania grzybów  
i mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym**

**Microbiological methods for reducing the fungi and *Fusarium* mycotoxins  
occurrence in food chain**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. inż. Daniela Gwiazdowska

Pracę przyjęto dnia:

Podpis Promotora

Wydział: Towaroznawstwa

Katedra: Przyrodniczych Podstaw Jakości

Poznań 2018

*Składam serdeczne podziękowania **Pani dr hab. inż. Danieli Gwiazdowskiej**  
za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej, oraz za  
doświadczenie i pasję Pani doktor, które natchnęły mnie do wkroczenia w świat nauki.*

*Dziękuję **dr inż. Katarzynie Marchwińskiej**  
za wsparcie okazane podczas przygotowania pracy doktorskiej oraz za wspólną drogę przebytą na  
studiach doktoranckich*

*Dziękuję Wam za udowodnienie, że w świecie nauki przyjaźń ma ogromne znaczenie*

*Pracę dedykuję **Piotrowi Juś**,  
ojcu, który zawsze we mnie wierzył  
tacie, który zawsze się mną opiekował  
przyjacielowi, który zawsze mnie wspierał*

## Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli.....	7
Wstęp .....	9
CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	12
1. Znaczenie grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w produkcji rolniczej.....	12
1.1. Charakterystyka i występowanie grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	12
1.2. Charakterystyka i występowanie ważniejszych mykotoksyn fuzaryjnych .....	14
1.3. Wpływ mykotoksyn fuzaryjnych na zdrowie ludzi i zwierząt hodowlanych .....	22
1.4. Ekonomiczne skutki występowania grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> i mykotoksyn w łańcuchu żywnościowym .....	25
2. Strategie ograniczania ilości mykotoksyn fuzaryjnych w produkcji rolniczej .....	28
2.1. Strategie przedzbiorowe .....	29
2.2. Strategie pozbiorowe .....	32
2.3. Regulacje prawne związane z mykotoksynami .....	34
3. Znaczenie bakterii fermentacji mlekowej w ograniczeniu występowania mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym.....	37
CZĘŚĆ BADAWCZA.....	44
4. Założenia badawcze .....	44
4.1. Cel pracy i hipotezy badawcze .....	45
4.2. Zakres pracy .....	46
Materiały i metodyka badawcza .....	53
5. Materiały .....	53
5.1. Materiał badawczy .....	53
5.2. Przedmiot badań .....	53
5.3. Mikroorganizmy wskaźnikowe.....	53
5.4. Podłoża .....	54
5.4.1. Izolacja i namnażanie bakterii fermentacji mlekowej.....	54
5.4.2. Podłoża do namnażania i oznaczeń z wykorzystaniem mikroorganizmów wskaźnikowych .....	54
5.4.3. Optymalizacja składu podłoża w kierunku wzmocnienia aktywności fungistatycznej bakterii fermentacji mlekowej .....	55
5.4.4. Podłoża wykorzystane do oznaczenia podstawowej jakości mikrobiologicznej kiszonki z lucerny.....	57
5.5. Krążki antybiotykowe .....	57
5.6. Odczynniki .....	58
5.7. Ważniejsze bufony i roztwory.....	59
6. Metodyka badawcza .....	64
6.1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych .....	64

6.1.1. Wyodrębnienie czystych kolonii bakterii fermentacji mlekowej.....	64
6.1.2. Namnażanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej .....	64
6.1.3. Przechowywanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	64
6.2. Skrining izolatów bakterii fermentacji mlekowej pod względem wybranych właściwości...	65
6.2.1. Oznaczenie aktywności fungistatycznej wobec wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .	65
6.2.2. Oznaczenie aktywności antibakteryjnej wobec wybranych szczepów patogennych .....	65
6.2.3. Określenie ilości wybranych kwasów organicznych wytwarzanych przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej .....	66
6.2.4. Oznaczanie wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki	67
6.3. Identyfikacja wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego.....	68
6.3.1. Identyfikacja fenotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	68
6.3.2. Identyfikacja genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej .....	68
6.3.3. Sekwencjonowanie zamplifikowanego fragmentu genu 16S rRNA .....	71
6.4. Możliwości praktycznego zastosowania izolatów bakterii fermentacji mlekowej .....	71
6.4.1. Ograniczenie wzrostu grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> i wytwarzania przez nie mykotoksyn w warunkach modelowych .....	71
6.4.2. Określenie wiązania mykotoksyn fuzaryjnych przez komórki bakterii kwasu mlekowego	73
6.4.3. Określenie stabilności kompleksu bakterie-zearalenon w symulowanym układzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych.....	75
6.4.4. Wykorzystanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej w produkcji kiszonek paszowych	76
6.5. Modelowanie właściwości fungistatycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej poprzez optymalizację składu podłoża .....	78
6.6. Analiza statystyczna .....	79
7. Wyniki badań i dyskusja .....	80
7.1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych .....	80
7.2. Skrining izolatów bakterii fermentacji mlekowej pod względem wybranych właściwości...	84
7.2.1. Aktywność fungistatyczna bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszonek paszowych .....	84
7.2.2. Aktywność antibakteryjna izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	95
7.2.3. Określenie zawartości wybranych kwasów organicznych produkowanych przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej .....	106
7.2.4. Określenie wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki .....	112
7.3. Identyfikacja fenotypowa i genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej .....	123
7.4. Określenie możliwości praktycznego zastosowania wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.....	129
7.4.1. Ograniczenie wzrostu grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> i wytwarzania przez nie mykotoksyn w ziarnie pszenicy .....	129

7.4.2. Określenie wiązania mykotoksyn fuzaryjnych przez komórki bakterii kwasu mlekowego .....	137
7.4.3. Określenie stabilność kompleksu bakterii fermentacji mlekowej z zearalenonem w symulowanym układzie pokarmowym.....	146
7.4.4. Wykorzystanie wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej do produkcji kiszonek paszowych.....	148
7.5. Modelowanie właściwości fungistatycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej poprzez optymalizację składu podłoża .....	156
7.5.1. Wzrost wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na przygotowanych podłożach .....	156
7.5.2. Wpływ przygotowanych podłoży na aktywność fungistatyczną wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej .....	168
Podsumowanie.....	182
Wnioski.....	185
Bibliografia .....	187
Wykaz tabel, wykresów, rysunków i fotografii .....	217
Załącznik.....	221
Wykaz dorobku naukowego.....	225

## Wykaz stosowanych skrótów i symboli

15-AcDON - 15-acetyldeoxyniwalenol.

3-AcDON - 3-acetyldeoxyniwalenol,

ATCC® (ang. American Type Culture Collection) – Amerykańska Kolekcja Kultur,

BCA – (ang. biological control agent) – biologiczny czynnik ochrony roślin

BHI (ang. Brain Heart Infusion medium) – podłoże mózgowo-sercowe bogate w składniki odżywcze, pożywka hodowlana ogólnego stosowania,

BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool) – program do obliczania podobieństwa sekwencji nukleotydów,

BSA – (ang. Brilliance™ Salmonella Agar Base -podłoże chromogenne do oznaczania obecności bakterii z rodzaju Salmonella

CLSI (ang. Clinical and Laboratory Standard Institute) – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych

dNTP – deoksynukleotydy,

DON – deoksyniwalenol,

EFSA – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, ang. European Food Safety Authority,

EUCAST (ang. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) - Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości –

FAO (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations) – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa,

FB<sub>1</sub> – fumonizyna B<sub>1</sub>

FB<sub>2</sub> – fumonizyna B<sub>2</sub>

FDA (ang. Food and Drug Administration) – Agencja Żywności i Leków,

FUS-X – fusarenon,

gen 16S rRNA – gen kodujący rybosomalny kwas rybonukleinowy (rRNA), wchodzący w skład podjednostki małej rybosomów u Prokaryota,

GRAS (ang. Generally Recognised As Safe) – uważane za bezpieczne,

HPLC (ang. high-performance liquid chromatography) – wysokosprawna chromatografia cieczowa,

IARC – ( ang. - International Agency for Research on Cancer) - Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem

JECFA - (ang. Joint Expert Committee on Food Additives) - Połączony Komitet Ekspertów

LAB (ang. lactic acid bacteria) – bakterie fermentacji mlekowej,

M-17 – pożywka stosowana do wykrywania obecności paciorkowców mlekowych,

MRS (de Man, Rogosa i Sharpe,) – pożywka do wykrywania, namnażania i oznaczania bakterii fermentacji mlekowej,

NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information) – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej

NCCLS (ang. National Committee for Clinical Laboratory Standards), Krajową Komisję ds. Laboratoryjnych Norm Klinicznych

NIV – niwalenol,

PBS (ang. phosphate buffered saline) – bufor fosforanowy,

PCA (ang. Plate Count Agar) – pożywka hodowlana ogólnego stosowania,

PCM (ang. Polish Collection of Microorganisms) – Polska Kolekcja Drobnoustrojów, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu,

PCR (ang. Polymerase Chain Reaction)– reakcja łańcuchowa polimerazy,

PGPM (ang. Plant Growth Promoting Microorganisms) – mikroorganizmy wspomagające wzrost roślin

QPS (ang. Qualified Presumption of Safety) – zakwalifikowane jako bezpieczne,

RASFF – (ang. Rapid Alert System for Food and Feed) - System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznych Produktach Żywnościowych i Środkach Żywienia Zwierząt

TBE (ang. tris-borate-EDTA buffer) – bufor tris-kwas borowy-EDTA wykorzystywany m.in. do elektroforezy na żelu agarozowym,

TPY (ang. Trypticase Phytone Yeast Extract) – podłoże wykorzystywane do oznaczania obecności pałeczek z rodzaju Bifidobacterium,

TSA (ang. Trypticasein Soy Agar) – podłoże agarowe tryptozowo-sojowe,

TSB (ang. Trypticasein Soy Broth) – bulion tryptozowo-sojowy,

Tween® 80 – polisorbat 80,

UE – Unia Europejska,

WHO (ang. World Health Organization) – Światowa Organizacja Zdrowia,

YIB (ang. Yield Increasing Bacteria) - bakterie plonotwórcze

ZEA – zearalenon



## Wstęp

Zachowanie równowagi między rosnącym popytem na żywność wśród ludności świata a globalną produkcją rolną jest istotne dla zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego, oznaczającego fizyczny i ekonomiczny dostęp do wystarczającej i bezpiecznej żywności, która zaspokoi potrzeby i preferencje żywieniowe konsumenta. Według Organizacji ds. Wyżywienia i Rolnictwa FAO (ang. *Food and Agriculture Organization*) pomiędzy rokiem 1960 a 2010 globalna produkcja żywności wzrosła niemal trzykrotnie, co przy niemal dwukrotnym wzroście populacji pozwoliło na wzrost produkcji żywności na osobę o ponad 30%. Szacuje się, że aby zaspokoić rosnący popyt na żywność, produkcja rolna powinna w najbliższych 40 latach wzrosnąć o 60%. Podstawowym produktem pokarmowym na świecie są surowce roślinne, głównie zboża. Od ich ilości w dużej mierze zależy wielkość produkcji zwierzęcej, co ma również wpływ na poziom wyżywienia ludności. Oprócz zapewnienia żywności należy tu również uwzględnić surowce dla rozwijającej się produkcji biopaliw.

Rolnictwo, obok dostarczania niezbędnych dóbr, wywiera znaczący wpływ na środowisko. Na etapie swojego rozwoju, rolnictwo przechodziło wiele faz rozwojowych w swoich dziejach, włączając w to zmiany typu rewolucyjnego, jak rewolucja agrarna w XIX wieku. Duże znaczenie miał rozwój technologiczny, mechanizacja rolnictwa, wprowadzanie nowych środków chemicznych, udoskonalanie odmian roślin i ras zwierząt, które prowadziły do intensyfikacji produkcji rolniczej (Pawlak, 2015). Przemiany te prowadziły do industrializacji rolnictwa, zorientowanej na koncentrację i intensyfikację produkcji, która jest obecnie zastępowana koncepcją rozwoju zrównoważonego. Zrównoważone rolnictwo definiuje się jako efektywną produkcję bezpiecznych, wysokiej jakości produktów rolnych przy jednoczesnej ochronie środowiska naturalnego, wsparciu poprawy warunków społeczno-gospodarczych rolników, pracowników i społeczności lokalnych, biorąc pod uwagę ochronę zdrowia i dobrostanu zwierząt. Coraz częściej podkreśla się bowiem negatywne oddziaływanie rolnictwa na wody powierzchniowe, podziemne, glebę czy powietrze, jak również niekorzystny wpływ na wiele ekosystemów. Warto również podkreślić, że obecnie jednym z priorytetów polityki UE i zarazem jednym z najważniejszych jej wyzwań jest ochrona środowiska, co znajduje swoje odzwierciedlenie również w rozwoju współczesnego rolnictwa.

W obecnym świecie zjawiska takie jak industrializacja, globalizacja i liberalizacja ułatwiają dostęp do różnorodnych dóbr, w tym również żywności. Warto przy tym podkreślić, że na konkurencyjnym rynku produktów żywnościowych ważnym wyróżnikiem jest jakość, na którą należy zwracać uwagę w całym łańcuchu żywnościowym. Jednakże globalizacja, utożsamiana najczęściej ze zmianą wartości kulturowych oraz rozwojem międzynarodowego handlu, a zarazem napędzana rozwojem technologicznym, może prowadzić do wzrostu liczby zagrożeń w łańcuchu żywnościowym (Smyth i in., 2014). Najprostszym przykładem może być chociażby import żywności zanieczyszczonej drobnoustrojami na tereny, na których nigdy dotąd mikroorganizmy te nie występowały.

Największym problemem dla bezpieczeństwa żywności są zagrożenia mikrobiologiczne, w tym obecność chorobotwórczych wirusów czy bakterii, jak również toksycznych metabolitów. Ze względu na powszechność występowania i szkodliwość, do czynników obniżających w znacznym stopniu jakość żywności i pasz, a zarazem stanowiącym poważne zagrożenie bezpieczeństwa żywności należą grzyby strzępkowe i ich toksyczne metabolity, mykotoksyny.

Termin „mykotoksyny” pochodzi od słów z języka greckiego: *mycos* – grzyb i łacińskiego: *toxicum* – trucizna. Jest to określenie definiujące wtórne metabolity grzybów strzępkowych, które wywołują biochemiczne, fizjologiczne i patologiczne zmiany w organizmach żywych. Są to związki o niskiej masie cząsteczkowej i wywołujące toksyczny efekt już w niskich stężeniach. Klasyfikacja mykotoksyn zależy od przyjętego kryterium. W zależności od biologicznego pochodzenia i struktury cząsteczki wyróżnia się terpeny, cyklopeptydy, poliketydy, pochodne aminokwasów itp. Biorąc pod uwagę wpływ mykotoksyn na funkcjonowanie komórek można wyróżnić teratogeny, mutageny, kancerogeny i alergen. Jako kryteria podziału uwzględnia się również pochodzenie mykotoksyn czy oddziaływanie na organizm ludzki (Bennet i Klich, 2003).

Zgodnie z szacunkami FAO każdego roku około 25% plonów na całym świecie ulega skażeniu mykotoksynami, chociaż niektóre źródła literaturowe sugerują, że może to być nawet 50%, jeśli weźmie się pod uwagę obecność metabolitów, które nie są wykrywane w standardowych analizach bądź które dopiero zostały poznane (Stanciu i in., 2015).

Zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i pasz związane z obecnością grzybów i ich toksycznych metabolitów skłania do poszukiwania nowych sposobów ograniczenia ich przedostawania się do łańcucha żywnościowego. W obliczu wspomnianego już zrównoważonego rozwoju rolnictwa i dbałości o ochronę środowiska

coraz większe zainteresowanie budzą metody biologiczne, w tym wykorzystanie mikroorganizmów jako czynników stanowiących element biokontroli patogenów w uprawach roślin, hamujący rozwój grzybów podczas produkcji kiszonek czy unieszkodliwiający mykotoksyny w paszach.

Biorąc pod uwagę powyższe przesłanki zasadniczym celem niniejszej pracy było określenie możliwości zastosowania odpowiednio wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej do ograniczania występowania grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz wytwarzanych przez nie mykotoksyn w łańcuchu żywnościowym. Szczególną uwagę zwrócono na możliwości zastosowania tych mikroorganizmów na etapie uprawy roślin i w hodowli zwierząt, gdzie zagrożenie wspomnianymi grzybami i ich toksynami jest największe. Założeniem pracy była szeroka charakterystyka wybranych mikroorganizmów uwzględniając m.in. ich właściwości fungistatyczne, zdolność do wiązania i redukcji stężenia mykotoksyn, ale także inne cechy, przydatne z punktu widzenia wykorzystania ich jako składników preparatów biologicznych o szerokim spektrum zastosowania. Biorąc pod uwagę fakt, iż w uprawach roślin dominującą rolę odgrywają wciąż środki chemiczne, przebadane w niniejszej pracy bakterie fermentacji mlekowej mogą stanowić ciekawą alternatywę, szczególnie dla gospodarstw ekologicznych. Z kolei w produkcji zwierzęcej wyselekcjonowane bakterie mogą stanowić element preparatów do zakiszania, które dzięki swoim szeroko scharakteryzowanym właściwościom, mogłyby być konkurencyjne dla produktów znajdujących się już na rynku. Mając na uwadze koszty produkcji biopreparatów na większą skalę, w pracy uwzględniono także możliwość wykorzystania surowców odpadowych do hodowli wybranych mikroorganizmów, co z jednej strony jest rozwiązaniem przyjaznym dla środowiska, a z drugiej pozwala obniżyć koszty produkcji.

## CZĘŚĆ LITERATUROWA

### 1. Znaczenie grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w produkcji rolniczej

#### 1.1. Charakterystyka i występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium*

Rodzaj *Fusarium* obejmuje ponad 70 gatunków fitopatogennych grzybów i jest uważany za jeden z najważniejszych w kontekście jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego upraw, żywności i pasz. Wynika to zarówno z rozpowszechnienia tych mikroorganizmów w różnych rejonach świata jak i szkodliwości dla wielu upraw, ponieważ grzyby z rodzaju *Fusarium* powodują choroby zbóż, warzyw i owoców. Generuje to znaczące straty, a dodatkowo stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt ze względu na wytwarzanie różnorodnych mykotoksyn (Soriano, 2007; Kotowicz, Frąc i Lipiec, 2014).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* zgodnie z aktualną systematyką należą do typu *Ascomycota*, podtypu *Pezizomycotina*, klasy *Sordariomycetes*, podklasy *Hypocreomycetidae*, rzędu *Hypocreales* i rodziny *Nectriaceae* (Index Fungorum). Teleomorfy *Fusarium* sp. zaliczane są najczęściej do rodzaju *Giberella*, przy czym w warunkach naturalnych częściej występują formy anamorficzne (Moretti, 2009; Gräfenhan, Schroers, Nirenberg i Seifert, 2011). Mikroorganizmy te występują powszechnie w glebie, jak również w resztkach roślinnych czy różnych substratach organicznych, jako saprofity. W sprzyjających warunkach mogą powodować choroby roślin, atakując zarówno podziemne jak i nadziemne części. Są przy tym uznawane za jedne z najgroźniejszych patogenów roślin, powodując choroby zbóż, ziemniaków, warzyw, a także roślin leśnych i ozdobnych. Większość gatunków *Fusarium* sp. należy do grzybów polifagicznych i infekuje wiele gatunków roślin. W uprawach zbóż grzyby te są odpowiedzialne m.in. za fuzaryjną zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, fuzariozę liści i fuzariozę kłosów (Łukanowski i Sadowski, 2002; Champeil, Doré i Fourbet, 2004). W zależności od stopnia nasilenia choroby mogą prowadzić do poważnych strat ekonomicznych, dochodzących nawet do kilkudziesięciu procent. Grzyby z rodzaju *Fusarium* są również często wykrywane w kiszonkach i paszach, jak wskazują badania prowadzone w różnych rejonach świata. Obecność *F. vertillioides* stwierdzono w próbkach kiszzonek z kukurydzy we Francji (Garon i in., 2006) i Argentynie (Gonzalez-Pereyra i in., 2011), a *Fusarium* sp. bez wskazania konkretnych gatunków odnotowano w próbkach kiszzonek ze Słowacji (Biro i in., 2009), Irlandii (O'brienn i in., 2008) i Argentyny (Alonso i in., 2009).

Do najgroźniejszych patogenów z rodzaju *Fusarium* zalicza się gatunki: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. oxysporum* i *F. solani*. Poszczególne gatunki występują często w uprawach, przy czym w zależności od rośliny obserwuje się dominację określonych gatunków *Fusarium* sp. Przykładowo, Bernhoff i in. (2010) wykazali, że owies jest zwykle bardziej zanieczyszczony grzybami z rodzaju *Fusarium* niż pszenica, jak również, że gatunki *F. poae* i *F. langsethiae* występują częściej w uprawach owsa niż pszenicy i jęczmienia. Należy również zwrócić uwagę, iż skład gatunkowy grzybów w uprawach dynamicznie się zmienia, przy czym nie wszystkie są w takim samym stopniu chorobotwórcze. Naturalnym zjawiskiem jest koegzystencja wielu gatunków. W rozwoju fuzariozy kłosów zbóż, choroby o dużym znaczeniu ekonomicznym, bierze udział około 17 różnych gatunków, z czego dominujące są *F. graminearum*, występujący w klimacie ciepłym i wilgotnym i *F. poae*, który preferuje raczej relatywnie ciepłe i suche warunki klimatyczne (Yli-Mattila, 2010; Backhouse, 2014). Gatunek *F. graminearum*, który wraz z 16 innymi gatunkami tworzy *F. graminearum* kompleks (FGC) (Aoki, Ward, Kistler i O'donnel 2012), jest najczęściej występującym i najbardziej agresywnym gatunkiem wywołującym fuzariozę. Występuje w południowej Europie (Boutigny, Ward, Ballois, Iancu i Loos, 2014), Ameryce (McMullen i in., 2012) i Azji, Puri, Saucedo i Zhong, 2012), przy czym rozprzestrzenia się także na chłodniejsze rejony Europy (Finlandia, Rosja, Szwecja) (Yli-Mattila i in., 2008; Fredlund i in., 2013). W rozwoju fuzariozy zbóż obserwuje się także gatunki *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides* i *F. langsethiae*, które mają mniejsze znaczenie niż *F. graminearum*, mogą jednak odgrywać rolę dominującą, gdy czynniki klimatyczne nie sprzyjają rozwojowi głównych czynników odpowiedzialnych za tę chorobę. Podobnie jest w przypadku fuzariozy kolb kukurydzy, za którą w największym stopniu odpowiedzialny jest gatunek *F. verticillioides*, chociaż ważnymi czynnikami w rozwoju tej choroby są *F. proliferatum* i *F. subglutinians*. Gatunek *F. verticillioides* dominuje w Europie (Balconi i in., 2014; Cao i in., 2014), Afryce (Fandohan, Hell, Marasas i Wingfield, 2003), Azji (Mohammadi i in., 2016) i Ameryce (Jurjevic i in., 2005; Stumpf i in., 2013) przy czym często towarzyszy mu *F. subglutinians*, który rozwija się w takich samych niszach ekologicznych. Z kolei gatunek *F. proliferatum* pojawia się częściej w rejonach południowej Europy (Bottalico, 1998).

Występowanie określonych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* jest ściśle związane z czynnikami klimatycznymi jak temperatura i wilgotność (Doohan, Brennan i Cooke., 2003) i zależy od kontynentu i regionu, warunków agroekologicznych (Bottalico i Perrone, 2002),

ale także uszkodzeń roślin przez owady (Lew, Adler i Edinger., 1991) czy podatności danego gatunku rośliny na Infekcje (Pascale, Visconti i Chełkowski, 2002). Dane literaturowe wskazują, że zmiany klimatu mogą wpłynąć na zanikanie lub pojawianie się niektórych gatunków w miejscach, w których nie występowały bądź zwiększenie lub zmniejszenie dominacji określonych gatunków w danych rejonie. Przykładowo jako efekt zmian klimatycznych tłumaczy się obecną dominację gatunku *F. graminearum* w Europie Północnej, podczas gdy wcześniej gatunkiem dominującym był *F. culmorum* (Waalwijk i in., 2004; Fredlund i in., 2008; Yli-Mattila, 2010). W uprawach kukurydzy w Polsce też obserwowano zmienność w dominacji gatunków odpowiedzialnych m.in. za fuzariozę kolb. W latach 1985 - 1991 najczęściej występującym gatunkiem był *F. subglutinans*, któremu towarzyszyło kilka innych gatunków. Od roku 1995 obserwowano większą częstotliwość infekcji z udziałem gatunku *F. verticillioides*, szczególnie do roku 2006. W ostatnich latach coraz częściej pojawiał się również gatunek *F. poae*. Badania przeprowadzone w sezonach 2013 – 2014 wykazały obecność czterech dominujących gatunków: *F. graminearum*, *F. poae*, *F. subglutinans* i *F. verticillioides* (Chełkowski, Lew i Pettersson, 1994; Chełkowski, 1998; Gromadzka, Górna, Chełkowski i Waśkiewicz, 2016).

Należy podkreślić, że występowanie i dominacja określonych gatunków *Fusarium* sp. w danych uprawach wiąże się z obecnością wytwarzanych przez te gatunki mykotoksyn. Biorąc pod uwagę fakt, że poszczególne gatunki są producentami różnych mykotoksyn, będzie to wpływało na ich obecność, skład i ilość w roślinach stanowiących surowiec do produkcji żywności czy pasz.

## **1.2. Charakterystyka i występowanie ważniejszych mykotoksyn fuzaryjnych**

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są producentami różnych mykotoksyn (tabela 1), z których za najważniejsze z ekonomicznego punktu widzenia uważa się trichoteceny, fumonizyny i zearalenon. Nieco mniej znane są toksyny takie jak fuzaproliferyna, bowerycyna, enniantyny czy moniliformina, które zostały odkryte stosunkowo niedawno (Sumerell i Leslie, 2011). Mykotoksyny fuzaryjne są wytwarzane jeszcze podczas uprawy roślin na polu, jednak może dojść do zanieczyszczenia nimi na różnych etapach produkcji żywności czy pasz, m.in. podczas przechowywania, transportu czy przetwarzania (Kotowicz, Frąc i Lipiec, 2014). Biorąc pod uwagę, iż jeden gatunek grzyba może wytwarzać więcej niż jedną toksynę, a jedna toksyna może być syntezowana przez kilka gatunków, należy spodziewać się występowania w danym surowcu różnych mykotoksyn, a także mieć na uwadze

możliwość interakcji pomiędzy nimi, w tym zarówno synergizmu jak i antagonizmu (Placinta, D’Mello i Macdonald, 1999; Streit i in., 2012).

**Tabela 1. Mykotoksyny wytwarzane przez ważniejsze gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium***

Gatunek <i>Fusarium</i>	Mykotoksyny
<i>F. avenaceum</i>	moniliformina, bowerycyna, fusarenon, neosolaniol, enniatyny A, A1, B, B1
<i>F. cerealis</i>	niwalenol, fusarenon, zearalenon
<i>F. culmorum</i>	deoksyniwalenol, 3-acetyl-deoksyniwalenol, niwalenol, toksyna T-2, toksyna HT-2, neosolaniol, zearalenon
<i>F. equiseti</i>	toksyna T-2, toksyna HT-2, diacetoksyscirpenol, fuzarenon, neosolaniol, zearalenon
<i>F. graminearum</i>	deoksyniwalenol, 3-acetyl-deoksyniwalenol, 15-acetyl-deoksyniwalenol, niwalenol, diacetoksyscirpenol, zearalenon
<i>F. langsethiae</i>	toksyna T-2, toksyna HT-2
<i>F. oxysporum</i>	bowerycyna, zearalenon, moniliformina
<i>F. poae</i>	bowerycyna, enniatyny, niwalenol, fuzarenon, toksyna T-2, toksyna HT-2
<i>F. proliferatum</i>	fumonizyna B1, fumonizyna B2; fuzarenon, moniliformina, bowerycyna
<i>F. subglutinans</i>	fumonizyna B1, fumonizyna B2, fumonizyna B3, fuzaryna C
<i>F. sporotrichioides</i>	toksyna T-2, toksyna HT-2, neosolaniol
<i>F. semisectum</i>	diacetoksyscirpenol, bowerycyna
<i>F. tricinctum</i>	diacetoksyscirpenol, moniliformina, zearalenon
<i>F. verticillioides</i>	fumonizyna B1, fumonizyna B2, fumonizyna B3, fuzaryna C

Skróty: BEA – bowerycyna, 3AcDON – 3-acetylodeoksyniwalenol, 15AcDON – 15-acetylodeoksyniwalenol, DAS – diacetoksyscirpenol, DON – deoksyniwalenol, HT-2 – toksyna HT-2, MON – moniliformina, NEO – neosolaniol, NIV – niwalenol, ZEA – zearalenon, FB<sub>1</sub> – fumonizyna B<sub>1</sub>, FUS – fuzarenon, FU-C – fuzaryna C, T-2 – toksyna T-2

Źródło: opracowanie własne na podstawie (Döll i Dänicke, 2011; Stępień i Waśkiewicz, 2013; Kotowicz, Frąc i Lipiec, 2014)

Występowanie toksyn fuzaryjnych w uprawach różni się znacząco w zależności od rejonu geograficznego, a także od roku. Przykładowo, deoksyniwalenol jest wykrywany powszechnie w uprawach na całym świecie (Miller 2008), podczas gdy obecność toksyn T-2 i HT-2 jest częściej stwierdzana w północnej Europie (Van der Fels-Klerx i Stratakou, 2010). Podobnie, jak występowanie grzybów, będących producentami mykotoksyn, tak obecność i ilość poszczególnych toksyn fuzaryjnych w uprawach, jest ściśle związana z warunkami klimatycznymi, ale może zależeć także od rodzaju uprawy i stosowanych praktyk agrotechnicznych. Niektóre źródła literaturowe wskazują, że poziom toksyn T-2 i HT-2 w organicznych uprawach owsa i innych zbóż był niższy niż w uprawach konwencjonalnych (Edwards, 2009a, 2009b; Bernhoft, Clasen, Kristoffersen i Torp, 2010). Z kolei Lindblad i in. (2012) stwierdzili, że czynniki klimatyczne i agronomiczne miały niewielki wpływ na poziom deoksyniwalenolu w uprawach owsa w Skandynawii.

Różnorodność obserwacji wskazuje na wzajemne oddziaływanie wielu czynników, które występując w różnych kombinacjach, w rezultacie mogą wpływać na poziom określonych mykotoksyn w poszczególnych uprawach.

Mykotoksyny fuzaryjne stanowią poważny problem w hodowli zwierząt, gdzie ich obecność odnotowuje się w kiszonkach, ale także innych sfermentowanych paszach czy dodatkach paszowych, którymi mogą być produkty uboczne produkcji słodu, piwa i bioetanolu. Karmi się nimi zwykle konie, świnie, ale także kurczaki i kury nioski.

Spośród mykotoksyn fuzaryjnych, największe znaczenie, zarówno z ekonomicznego punktu widzenia, jak i ze względu na oddziaływanie na organizmy żywe, mają trichoteceny, w tym deoksyniwalenol, zearalenon i fumonizyny.

### **Trichoteceny**

Trichoteceny stanowią zróżnicowaną grupę mykotoksyn fuzaryjnych wytwarzanych przez niezwiązane taksonomicznie rodzaje grzybów: *Fusarium*, *Myrothecium* i *Stachybotrys*. Jest to ponad 200 toksyn o niskiej masie cząsteczkowej, wielkości 200 do 500 Da, o charakterze amfipatycznym. Mają strukturę epoksydów seskwiterpenowych ze szkieletem 12,13-epoksy 9-trichotecenowym odpowiedzialnym za ich cytotoxycywność z podwójnym wiązaniem pomiędzy C-9 i C-10, które różnią się podstawnikami. Wyróżnia się cztery główne grupy trichotecenów: A, B, C i D rozróżniane na podstawie różnych podstawników. Trichoteceny A, B i C można rozróżnić w oparciu o podstawniki w pozycji C-8. Trichoteceny z grupy A, do których należą związki o największej toksycywności, jak toksyna T-2, HT-2, neosolaniol i diacetoksyscirpenol, posiadają grupę hydroksylową bądź estrową lub inną niż karbonylową. Trichoteceny z grupy B, do których zaliczane są: deoksyniwalenol i jego pochodne, niwalenol, fuzarenon-C, zawierają w pozycji C-8 grupę karbonylową. Trichoteceny z grupy C posiadają grupę epoksydową, a typ D ma dodatkowy pierścień pomiędzy atomami węgla C-4 i C-5 (McCormick, Stanley, Stover i Alexander, 2011; Pinton i Oswald, 2014). Do najważniejszych, z ekonomicznego punktu widzenia, mykotoksyn z grupy trichotecenów, należy deoksyniwalenol, który jest najczęściej wykrywany, zarówno w surowcach roślinnych, jak i paszach czy żywności. Często występuje razem z jego mono-(3-AcDon, 15-Ac-DON) i diacetylową pochodną (3,15-AcDON) oraz niwalenolem.

Trichoteceny są wykrywane w uprawach na wszystkich kontynentach, m.in. w kukurydzy, pszenicy, ryżu, owsie, jęczmieniu czy warzywach. Powszechnie stwierdza się też ich obecność w paszach dla zwierząt. DON najczęściej wykrywany jest w pszenicy,



kukurydzy i jęczmieniu (tabela 2). Palacios i in. (2017) wykrył DON we wszystkich badanych próbkach pszenicy Durum w Argentynie, podobnie jak Bryła i in. (2016) w próbkach pszenicy w Polsce w sezonie 2013/2014 czy Dall’Asta, Dall’Erta, Mantovani, Massi i Galaverna (2012) w 150 (100%) pszenicy z północnego i centralnego regionu Włoch. Z kolei Trombete i in. (2016) badając 17 próbek pszenicy w Portugalii stwierdzili obecność DON w 58,5% próbek, a NIV w 29,5% próbek. Badania wykazały, że temperatury umiarkowane wraz z wydłużonymi okresami wysokiej wilgotności podczas kwitnienia czy zawiązywania łuszczyń sprzyjają akumulacji DONu (Hooker i Schaafsma, 2002; DeWolf, Madden i Lipps, 2003).

**Tabela 2. Występowanie deoksyniwalenolu w wybranych surowcach i produktach na terenie Europy**

Surowiec/ produkt	Kraj	Stężenie µg/kg		Literatura
		zakres	średnia	
<b>SUROWCE ROŚLINNE</b>				
<b>pszenica</b>	Niemcy	-	309	Schollenberger i in. (2005)
	Belgia	Max. 150		De Boevre i in. (2012)
	Włochy	9,6 – 99,6	-	Juan, Ritieni i Mañes (2013)
		13 - 1230	-	Alkadri i in. (2014)
	Rumunia	294 - 3390	-	Alexa i in. (2013)
	Słowacja	220 - 7880	-	Šliková i in. (2014)
	Serbia	630 - 1840	1235	Jajić, Jurić i Abramović (2008)
-		282,4 – 605,5	Stanković i in. (2012)	
<b>pszenżyto</b>	Polska	196 - 1326	511	Bryła i in. (2016)
<b>jęczmień</b>	Polska	10 - 1050	300	Perkowski, Kiecana i Kaczmarek (2003)
	Polska (jary)	76 - 222	126	Bryła i in. (2016)
	Polska (ozimy)	54 - 1602	512	Bryła i in. (2016)
	Litwa	śl - 198	-	Mankevičienė i in. (2007)
<b>kukurydza</b>	Włochy	0 - 13990	856 - 1042	Covarelli, Beccari i Salvi (2011)
	Serbia	40 - 2460	536	Jajić, Jurić i Abramović (2008)
	Polska	bd - 48500	413 - 1434	Twarużek, Grajewski, Błajet-Kosicka (2012)
<b>owies</b>	Niemcy	bd - 720	170	Schollenberger i in. (2005)
	Litwa	122 - 204	-	Mankevičienė i in. (2007)
	Polska	67 - 149	118	Bryła i in. (2016)
<b>KISZONKI I PASZE DLA ZWIERZĄT</b>				
<b>Kiszonka z kukurydzy</b>	Chorwacja	38,3 - 13407	3879	Pleadin i in. (2017)
	Szwajcaria	780 - 2990	1356	Eckard i in. (2011)

Surowiec/ produkt	Kraj	Stężenie µg/kg		Literatura
		zakres	średnia	
<b>KISZONKI I PASZE DLA ZWIERZĄT</b>				
<b>Pasza dla bydła mlecznego</b>	Chorwacja	24,1	10120	Pleadin i in. (2017)
<b>Pasza sojowa</b>	Szwajcaria	800 - 6400	2600	Gutleb i in. (2015)
<b>Pasza dla prosiąt</b>	Portugalia	100 - 864	-	Almeida i in. (2011)
<b>Pasza dla drobiu</b>	Słowacja	64 - 1230		Labuda i in. (2005b)
<b>PRODUKTY</b>				
<b>Mąka kukurydziana</b>	Niemcy	20 – 98	51	Schollenberger i in. (2005)
<b>Płatki kukurydziane</b>	Hiszpania	-	109	Cano-Sancho i in. (2011)
<b>Mąka pszenna</b>	Niemcy	15 - 1379	234 - 404	Schollenberger i in. (2002)
	Niemcy	Max. 177	-	Reinhold i Reinhardt (2011)
	Dania	10 - 2591	-	Rasmussen i in. (2003)
<b>Chleb pszenny</b>	Niemcy	125 - 247	-	Schollenberger, Müller i Drochner (2003)
	Hiszpania	0 – 146,6	-	González-Osnaya i in. (2011)
<b>Otręby pszenne</b>	Niemcy	319 - 389	360	Schollenberger i in. (2005)
<b>Płatki pszenne</b>	Portugalia	<100 - 5000	-	Martins i Martins (2001)
	Hiszpania	-	190	Cano-Sancho i in. (2011)
<b>Płatki owsiane</b>	Niemcy	11 - 148	48	Schollenberger i in. (2005)
<b>Środki spożywcze dla niemowląt i małych dzieci</b>	Polska	bd – 739	-	Rybińska i in. (2008)
<b>Żywność bezglutenowa</b>	Niemcy	11 - 227	55	Schollenberger i in. (2005)
<b>Piwo</b>	Belgia	13,4 – 25,8	20,3	Kuzdraliński, Solarska i Muszyńska (2013)
	Niemcy	<0,5 – 10,1	3,1	Bertuzzi i in. (2011)
	Irlandia	<0,5 – 4,1	2,0	Bertuzzi i in. (2011)
	Polska	7,5 – 70,2	20,66	Kuzdraliński, Solarska i Muszyńska (2013)

Źródło: opracowanie własne

## Zearalenon

Zearalenon, wytwarzany przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium*, jest jedną z częściej wykrywanych w środowisku mykotozyn (Overy i in. 2003). Wiele szczepów *Fusarium*, wytwarzających zearalenon, wytwarza zwykle jedną lub więcej trichotecenów (Summerell i Leslie, 2011). Pod względem chemicznym jest to β-rezorcyno-lakton, który w swojej strukturze obok pierścienia rezorcynowego zawiera makrocykliczny pierścień laktonowy o układzie podobnym do układu hormonów sterydowych, stąd też toksyna ta jest określana jako niesteroidowy mykoestrogen (Bennet i Klich 2003).

Toksyna ta jest powszechnie wykrywana w różnych gatunkach zbóż, takich jak owies, żyto, pszenica czy kukurydza, ale jej źródłem są również pasze i kisonki przeznaczone dla zwierząt (tabela 3). Obecność zearalenonu odnotowuje się na całym świecie, szczególnie w rejonach o umiarkowanym klimacie, m.in. w Ameryce (Tralamazza, Bemvenuti, Zorzete, de Souza Garcia i Corrêa, 2016), Europie (Edwards, 2011), Azji (Wang i in., 2013), ale również w Afryce (Zaied, Zouaoui, Bacha i Abid, 2012). Często występuje jednocześnie z deoksyniwalenolem i fumonizyną B<sub>1</sub>, co sugeruje synergistyczne lub addytywne interakcje tych toksyn w organizmach żywych.

**Tabela 3. Występowanie zearalenonu w wybranych surowcach i produktach na terenie Europy**

Surowiec/ produkt	Kraj	Stężenie µg/kg		Literatura
		zakres	średnia	
<b>SUROWCE ROŚLINNE</b>				
pszenica	Chorwacja	Max. 107	-	Pleadin i in. (2013)
	Węgry	50 - 890	-	Rafai i in. (2000)
	Włochy	2,35 – 27,15	-	Juan i in. (2013)
	Rumunia	28 - 1000	-	Alexa i in. (2013)
	Serbia	10 - 201	-	Stanković i in. (2012)
	Bułgaria	bd – 10	10	Manova i Mladenova (2009)
jęczmień	Polska (jary)	2 - 31	10	Bryła i in. (2016)
	Polska (ozimy)	2 - 19	7	Bryła i in. (2016)
	Bułgaria	bd – 36,6	29,0	Manova i Mladenova (2009)
	Litwa	10 - 193,4	-	Mankevičienė i in. (2007)
owies	Polska	5 - 15	11	Bryła i in. (2016)
	Niemcy	-	21	Schollenberger i in. (2005)
pszenżyto	Polska	4 - 86	23	Bryła i in. (2016)
	Litwa	0	-	Mankevičienė i in. (2007)
kukurydza	Bułgaria	bd – 148	80,6	Manova i Mladenova (2009)
	Chorwacja	2 - 511	69	Pleadin i in. (2012)
	Polska	bd - 4009	33,3 - 207	Twarużek, Grajewski, Błajet-Kosicka (2012)
	Włochy	0 - 83	2,3 – 8,9	Covarelli, Beccari i Salvi (2011)
<b>KISZONKI I PASZE DLA ZWIERZĄT</b>				
Kiszonka z kukurydzy	Chorwacja	9,2 - 11424	2084	Pleadin i in. (2017)
	Szwajcaria	nd - 430	180,9	Eckard i in. (2011)
Pasza dla bydła mlecznego	Chorwacja	5,7 - 2298	526	Pleadin i in. (2017)
Pasza dla prosiąt	Portugalia	5 - 73	-	Almeida i in. (2011)

Surowiec/ produkt	Kraj	Stężenie µg/kg		Literatura
		zakres	średnia	
Pasza dla drobiu	Słowacja	3 - 86	-	Labuda i in. (2005b)
<b>PRODUKTY</b>				
Mąka kukurydziana	Niemcy	2 - 40	12	Schollenberger i in. (2005)
Mąka pszenna	Niemcy	1 - 24	1 - 6	Schollenberger i in. (2002)
	Dania	Max. 2	-	Rasmussen i in. (2003)
	Portugalia	7,4 – 15,3	-	Aldana i in. (2014)
	Serbia	1,9 – 21,1	-	Škrbić i in. (2011)
Otręby pszenne	Niemcy	3 - 67	29	Schollenberger i in. (2005)
Środki spożywcze dla niemowląt i małych dzieci	Polska	bd – 7,25	-	Rybińska i in. (2008)
Żywność bezglutenowa	Niemcy	2- 14	6	Schollenberger i in. (2005)
Piwo	Irlandia	0,46 – 0,55	0,50	Kuzdraliński, Solarska i Muszyńska. (2013)
	Polska	<0,26 – 0,4	0,04	

Źródło: opracowanie własne

## Fumonizyny

Fumonizyny po raz pierwszy wykryto w hodowli *Fusarium moniliforme* (obecnie *F. verticillioides*), od którego pochodzi nazwa tej grupy toksyn. Pod względem chemicznych mykotoksyny te są wielowodorotlenowymi alkiloaminami estryfikowanymi dwoma kwasami karboksylowymi (ApSimon, 2001; Lazzaro i in., 2012). W zależności od podstawników występujących przy atomach węgla C-1, C-2, C-4, C-5, C-10, C-14 i C-15 wyróżnia się fumonizyny serii A, B, C i P, jednak największe znaczenie mają fumonizyny z grupy B, w szczególności fumonizyna B1, wykrywana w największych ilościach. Głównymi producentami tych toksyn są grzyby z rodzaju *Fusarium*, jednakże zdolność do syntezy fumonizyny B1 stwierdzono również u *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* (Chen, Mirocha, Xie, Hogge i Olson, 1992), a fumonizyny B2 u *Aspergillus niger* (Frisvad, Smedsgaard, Samson, Larsen, i Thrane 2007).

Fumonizyny występują najczęściej w kukurydzy (tabela 4). Ich obecność w zbożach innych niż kukurydza jest zwykle niska, jak wykazały m.in. badania w Polsce (Bryła i in., 2016), chociaż zdarzają się przypadki ich silnego zanieczyszczenia fumonizynami. Wysoki poziom FB1 + FB2 odnotowano w próbkach pszenicy w Argentynie (Palacios i in., 2011), a także w próbkach jęczmienia i pszenicy w Hiszpanii (Castellá, Bragulat i Cabañes, 1999). Niskie ryzyko zanieczyszczenia fumonizynami pszenicy, jęczmienia, owsa czy pszenżyta

wynika z faktu, że gatunki wytwarzające te toksyny, *F. verticillioides* i *F. proliferatum* częściej infekują kukurydzę.

**Tabela 4. Występowanie fumonizyn w wybranych surowcach i produktach na terenie Europy**

Surowiec/ produkt	Kraj	Stężenie µg/kg		Literatura
		zakres	średnia	
<b>SUROWCE ROŚLINNE</b>				
<b>pszenica</b>	Serbia	750 - 5400	-	Stanković i in. (2012)
	Polska	40 - 150	40	Bryła i in. (2016)
<b>kukurydza</b>	Bułgaria	0 - 4050	1150	Manova i Mladenova (2009)
	Polska	bd - 1885	27,9 - 247	Twarużek, Grajewski, Błajet-Kosicka (2012)
	Dania	70 - 4222	-	Kpodo, Thrane i Hald (2000)
	Włochy	100 - 76323	4343 - 5727	Covarelli, Beccari i Salvi (2011)
	Portugalia (kukurydza żółta)	bd - 1061	421	Silva i in. (2007)
	Portugalia (kukurydza biała)	bd - 1162	638	
<b>jęczmień</b>	Polska (jary)	-	101	Bryła i in. (2016)
<b>KISZONKI I PASZE DLA ZWIERZĄT</b>				
<b>Kiszonka z kukurydzy</b>	Chorwacja	49,3 - 6300	849	Pleadin i in. (2017)
<b>Pasza dla bydła mlecznego</b>	Chorwacja	33,1 - 1854	855	Pleadin i in. (2017)
<b>Pasza sojowa</b>	Włochy	100 - 2500	400	Gutleb i in. (2015)
<b>Pasza dla prosiąt</b>	Portugalia	50 - 391	-	Almeida i in. (2011)
<b>Pasza dla drobiu</b>	Słowacja	36 - 1160	-	Labuda i in. (2005a)
<b>PRODUKTY</b>				
<b>Płatki pszenne</b>	Niemcy	20,2 – 59,8	-	Rubert i in. (2013)
	Francja	75,8 – 125,8	-	Rubert i in. (2013)
<b>Płatki kukurydziane</b>	Hiszpania	20 - 100		Sanchis i in. (1994)
<b>Mąka kukurydziana</b>	Portugalia	bd - 2026	995	Silva i in. (2007)
<b>Popcorn</b>	Niemcy	<100 - 160	-	Usleber, Straka i Terplan (1994)
	Włochy	10 - 60	-	Doko i Visconti (1994)
<b>Polenta</b>	Niemcy	46 - 1230	-	Usleber, Straka i Terplan (1994)
	Holandia	< 40	-	De Nijs i in. (1998)
<b>Środki spożywcze dla niemowląt i małych dzieci</b>	Polska	bd – 264,2	-	Rybińska i in. (2008)

Surowiec/ produkt	Kraj	Stężenie µg/kg		Literatura
		zakres	średnia	
Piwo	Chorwacja	<0,1 – 0,9	0,5	Bertuzzi i in. (2011)
	Francja	0,5 – 4,5	2,3	
	Włochy	0,1 – 33,9	10,3	

Źródło: opracowanie własne

### 1.3. Wpływ mykotoksyn fuzaryjnych na zdrowie ludzi i zwierząt hodowlanych

Ze względu na dużą różnorodność mykotoksyn fuzaryjnych, symptomy, jakie obserwuje się u ludzi i zwierząt, są również bardzo zróżnicowane. Największe zagrożenie dla ludzi i zwierząt stanowi akumulacja mykotoksyn fuzaryjnych w żywności i paszach. Jest to zarazem największy problem ekonomiczny. Oddziaływanie mykotoksyn fuzaryjnych może mieć charakter zarówno ostry jak i przewlekły. Ostre zatrucia u ludzi występują raczej rzadko, natomiast powszechną uwagę zwraca problem chronicznego narażenia na mykotoksyny i jego wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Reakcje ze strony organizmu narażonego na działanie pojedynczej toksyny bądź kilku toksyn obejmują m.in. upośledzenie układu immunologicznego, zaburzenia hormonalne, problemy żołądkowo-jelitowe, powstawanie nowotworów, uszkodzenie nerek i wątroby czy zaburzenia układu nerwowego (Soriano, 2007; Haschek i Voss, 2013; Marroquín-Cardona, Johnson, Phillips i Hayes, 2014).

W przypadku zwierząt zatrucie tymi metabolitami może powodować ostre objawy chorobowe nawet ze skutkiem śmiertelnym, ale może też obniżać odporność na patogeny czy zmniejszać wydajność zwierząt. Najczęściej problem stanowią małe dawki spożywane przez długi czas, co prowadzi do różnych zaburzeń metabolicznych, fizjologicznych czy immunologicznych (Kanora i Maes, 2009).

Skutki narażenia na mykotoksyny są różne w zależności od rodzaju związku (tabela 5). Niepożądane skutki trichotecenów obejmują wymioty, nudności, anoreksję, opóźnienie wzrostu, zmiany neuroendokrynne i immunosupresję. Dowiedziono, że u ludzi trichoteceny są często związane ze stanami zapalnymi żołądka i jelit. Na poziomie molekularnym trichoteceny mogą hamować pierwotny metabolizm komórek eukariotycznych, wpływając na syntezę białek, DNA i RNA (Alassane-Kpembé i in., 2013). Narażenie na trichoteceny może powodować u zwierząt odmowę pokarmu, problemy immunologiczne, wymioty, zapalenie skóry i zmiany krwotoczne (McCormick i in., 2011). Może też wywołać zaburzenia rozrodcze

u zwierząt domowych (Cortinovis, Pizzo, Spicer i Caloni 2013). Deoksyniwalenol, który jest najczęściej wykrywaną toksyną trichotecenową, nazywany jest womitoksyną, ponieważ wywołuje wymioty i odmowę spożycia pasz, szczególnie u świń, które są najbardziej wrażliwe na jego działanie. Drób wykazuje zdecydowanie mniejszą wrażliwość i odmowa spożycia paszy pojawia się dopiero przy bardzo dużych dawkach DONu (Eriksen i Pettersson, 2004). Najmniej wrażliwe są przeżuwacze, co wynika z faktu, że bakterie obecne w żwaczu biorą udział w detoksyfikacji DONu (Rotter, Prelusky i Pestka, 1996).

Ze względu na wpływ na układ odpornościowy, narażenie na trichoteceny może zwiększać wrażliwość ludzi i zwierząt na choroby zakaźne. Dotyczy to w szczególności osób wrażliwych, takich jak małe dzieci, osoby z obniżoną odpornością i osoby starsze (Gouze i in., 2007). Trichoteceny są również fitotoksyczne i mogą powodować chlorozę, hamowanie wzrostu i wydłużania korzeni, karłowatość, jak również mogą działać jako czynnik wirulencji w niektórych chorobach roślin (McCormick i in., 2011).

Zearalenon jest mykotoksyną o strukturze cząsteczki przypominającej estrogeny, stąd też głównym celem tego metabolitu jest układ rozrodczy. Toksyna ta łączy się z receptorami estrogenów i powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu układu rozrodczego, co stwierdzono u wielu zwierząt laboratoryjnych, jak też zwierząt hodowlanych. Jak wskazują dane literaturowe, zearalenon wykazuje nawet kilkakrotnie silniejsze działanie estrogenne niż naturalnie występujące estrogeny (Bennet i Klich, 2003). Zmiany w układzie rozrodczym mogą powodować powiększenie macicy, zmniejszoną płodność, zwiększoną resorpcję zarodków, mniejsze rozmiary miotu oraz zmiany stężenia progesteronu i estradiolu w surowicy, co obserwowano u zwierząt laboratoryjnych (Koraichi i in., 2012). Podobne problemy występują u zwierząt hodowlanych, szczególnie u świń, które są najbardziej wrażliwe na działanie tej toksyny (Fink-Gremmels i Malekinejad, 2007; Tiemann i Dänicke, 2007). Badania prowadzone nad wpływem zearalenonu na organizm ludzki wykazały zależność pomiędzy przedwczesnym dojrzewaniem lub częstością występowania gruczolakoraków endometrium a stężeniem ZEA w surowicy, tkankach i spożywanych środkach spożywczych (Koraichi i in., 2012). Zearalenon może mieć również działanie hepatotoksyczne, immunotoksyczne i nefrotoksyczne, a także zwiększać peroksydację lipidów (Pistol i in., 2014).

Objawy wywoływane przez fumonizyny są bardzo różnorodne. Dotyczą m.in. uszkodzenia neuronów u noworodków czy zmian w mózgu u koni. Badania wykazały również, że spożycie karmy zanieczyszczonej FB<sub>1</sub> powoduje obrzęk płuc u świń (Scott,

2012). Fumonizyny są jednak szkodliwe również dla kur i innych zwierząt hodowlanych (Ahangarkani, Rouhi i Azizi, 2014)., wykazuje też działanie nefrotoksyczne i hepatotoksyczne u szczurów i myszy (Scott, 2012). U koni FB<sub>1</sub> zakłóca syntezę mieliny i powoduje leukoencefalomalację oraz martwicę wątroby, a w efekcie może doprowadzić do śmierci tych zwierząt. Z kolei u ludzi najczęściej fumonizyny wiąże się z apoptozą, rakiem przełyku i wadami cewy nerwowej (Scott, 2012; Ahangarkani i in., 2014). Fumonizyny nie są rakotwórcze, jednakże Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem IARC zakwalifikowała je w 2003 roku do grupy 2B, jako związki potencjalnie rakotwórcze dla ludzi (IARC 1993).

**Tabela 5. Wpływ ważniejszych mykotoksyn fuzaryjnych na ludzi i zwierzęta hodowlane**

Mykotoksyny	Oddziaływanie na ludzi/zwierzęta	Literatura
Trichoteceny	<p><b>Ludzie</b></p> <p>wymioty, nudności, anoreksja, zmiany neuroendokryne, immunosupresja, zapalenie żołądka i jelit i toksyczność żołądkowo-jelitowa, zaostrzenie infekcji</p>	<p>Reddy i in. (2010); Kubena i in. (1997); Galhardo i in. (1997); Haschek, Voss i Beasley (2002)</p>
	<p><b>Zwierzęta</b></p> <p><b>świnie:</b> odmowa jedzenia, wymioty, biegunki, krwawienia, zmniejszenie spożycia paszy, zapalenia skóry, obrzęki</p> <p><b>drób:</b> wzrost masy żołądka i serca, zmniejszony przyrost masy ciała, uszkodzenia w jamie ustnej</p> <p><b>bydło:</b> anoreksja, zmiany w obrębie przewodu pokarmowego, zmniejszenie produkcji mleka</p>	
Zearalenon	<p><b>Ludzie</b></p> <p>Działanie estrogenie, rak szyjki macicy (podejrzenie), przedwczesne dojrzewanie dziewcząt</p>	<p>Dacasto i in. (1995); Reddy i in. (2010)</p>
	<p><b>Zwierzęta</b></p> <p><b>Świnie:</b> Zapalenie sromu i pochwy, martwica ogona, wrodzone wady zewnętrznych narządów płciowych, zmniejszenie wydzielania hormonu luteinizującego i progesteronu</p> <p><b>Bydło:</b> bezpłodność, zmniejszenie produkcji mleka, hyperestrogenizm</p>	
Fumonizyny	<p><b>Ludzie</b></p> <p>Wady cewy nerwowej, rak przełyku</p>	<p>Schumacher i in. (1995); Fazekas i in. (1998); WHO (2000); Marasas (2001)</p>
	<p><b>Zwierzęta</b></p> <p><b>świnie:</b> powiększenie wątroby i płuc, obrzęk płuc, zmniejszony przyrost wagi, nieregularny wzrost i spożycie paszy</p> <p><b>drób:</b> redukcja masy ciała, biegunka, wzrost śmiertelności</p> <p><b>konie:</b> obrzęk płuc, leukodystroficzne rozmiękanie mózgu, martwica wątroby</p>	

Źródło: opracowanie własne



Istotnym zagadnieniem w ostatnich latach stało się również współwystępowanie mykotoksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, co może się wiązać ze złożonymi i nieokreślonymi jak dotąd konsekwencjami dla zdrowia ludzi i zwierząt. Danych na ten temat jest stosunkowo niewiele. Na przykład w badaniach dotyczących jednoczesnego występowania DON i FB1 w przewodzie pokarmowym prosiąt odnotowano cztery różne interakcje na różnych poziomach jelita: synergizm, antagonizm, efekt addytywny i mniej niż addytywny. Wpływ ten objawiał się m.in. zmianami liczby eozynofili, komórek plazmatycznych, interleukin czy interferonu, jak również ekspresji niektórych cytokin (Bracarense i in., 2012).

#### **1.4. Ekonomiczne skutki występowania grzybów z rodzaju *Fusarium* i mykotoksyn w łańcuchu żywnościowym**

Ekonomiczne skutki wynikające z obecności grzybów i ich toksycznych metabolitów w łańcuchu żywnościowym są wielowymiarowe i trudne do określenia. Koszty związane z takimi zanieczyszczeniami obejmują szereg elementów, włączając w to straty w uprawach, straty w hodowlach zwierząt, straty na rynku eksportowym, jak również koszty związane z kontrolowaniem poziomu mykotoksyn w surowcach i produktach.

Biorąc pod uwagę wielowymiarowość problemu, należy zauważyć, że straty ekonomiczne wynikają z kilku zasadniczych przyczyn:

- straty plonów z powodu chorób wywołanych przez grzyby toksynotwórcze;
- obniżoną jakość, a tym samym wartość plonów wynikającą z zanieczyszczenia mykotoksynami;
- straty wydajności zwierząt spowodowane problemami zdrowotnymi spowodowanymi przez mykotoksyny;
- koszty zdrowia ludzi;
- dodatkowe koszty - koszty zarządzania na wszystkich poziomach - zapobieganie, pobieranie próbek, koszty badań.

Warto podkreślić, że skutki te są odczuwalne w całym łańcuchu dostaw żywności i pasz, co oznacza, że dotyczą zarówno producentów roślin, hodowców zwierząt, sprzedawców i dystrybutorów ziarna, jak również przetwórców, konsumentów i całe społeczeństwo (ze względu na koszty opieki zdrowotnej i straty wydajności).

Straty w uprawach roślin wynikające z porażenia przez grzyby mogą być bezpośrednie, wynikające z obniżenia ilości i jakości plonów, jak również pośrednie, związane np. ze zmniejszonego kiełkowania roślin. Bezpośrednie straty związane są z chorobami, jakie powodują grzyby, m.in. z rodzaju *Fusarium*, które nie tylko obniżają ilość plonów, ale też jego jakość, obniżając masę nasion w kłosach oraz masę tysiąca nasion. Przykładowo, do najczęściej uprawianych na całym świecie roślin zbożowych należą pszenica i jęczmień. W latach 2014-2015 światowe uprawy pszenicy sięgały 707,2 mln ton, a jęczmienia 135,65 mln ton, co stanowiło zarazem 1/3 światowych upraw zbóż (FAO 2014, USDA 2014). Fuzarioza kłosów, która jest uważana za największy problem w uprawach roślin zbożowych, może w skrajnych przypadkach doprowadzić do strat sięgających 70%. Dotyczyło to zarówno wysokości plonów, jak i pogorszenia jakości ziarna i produktów zbożowych. W Europie straty spowodowane fuzariozą kłosów wynoszą średnio od 10 – 20% (Sayler, 1998). Ponieważ rozwój grzybów jest silnie uzależniony od czynników klimatycznych, również zmiany klimatu mogą znacząco wpłynąć na spadek jakości plonów, szczególnie w obliczu obserwowanych w ostatnich latach ekstremalnych zjawisk klimatycznych. Szacuje się, że ze do roku 2050 zmiana klimatu wpłynie na wszystkie uprawy w większości krajów na świecie. Wpływ klimatu jest widoczny przede wszystkim w jakości plonów, których obniżenie skutkuje wytwarzaniem produktów uboższych w składniki odżywcze i o obniżonej jakości.

Poważne straty związane z obecnością mykotoksyn w paszach dotyczą hodowców zwierząt. Są one związane ze spadkiem masy ciała zwierząt na skutek odmowy spożycia pasz czy też wymiotów i innych objawów ze strony przewodu pokarmowego, a także chorób. Czasami mykotoksyny występują w stężeniach wystarczająco wysokich, aby spowodować poważne straty w zdrowiu i wydajności zwierząt. Wtedy też stosunkowo łatwo takie straty obliczyć. Jednak najczęściej mykotoksyny występują w niskich stężeniach, powodując objawy na tyle subtelne, że są trudne do uchwycenia, a ich oddziaływanie przejawia się zwiększoną wrażliwością na mikroorganizmy patogenne, a tym samym wzrost częstości występowania chorób i zmniejszoną wydajnością reprodukcyjną. Dla hodowcy zwierząt te straty subkliniczne mają większe znaczenie gospodarcze niż straty spowodowane skutkami ostrymi. Oprócz obniżonej jakości produktów pochodzenia zwierzęcego, koszty wynikają również z konieczności ulepszania technologii produkcji, badań analitycznych oraz stosowania różnych sposobów przeciwdziałania problemowi przedostawania się mykotoksyn do łańcucha żywnościowego.

Dane dotyczące kosztów związanych z występowaniem grzybów i mykotoksyn w łańcuchu żywnościowym są najczęściej szacunkowe i nieprecyzyjne. Szacuje się, że w USA całkowita roczna strata spowodowana obecnością aflatoksyn w kukurydzy wynosi około 163 miliony USD (73 miliony do 332 miliony USD). Vardon, McLaughlin i Nardinelli (2003) oszacowali potencjalne roczne straty kukurydzy, pszenicy i orzeszków ziemnych spowodowane obecnością trzech mykotoksyn (aflatoksyny, fumonizyny i deoksyniwalenolu) w Stanach Zjednoczonych na 418 milionów USD do 1,66 miliarda USD. Autorzy oszacowali ponadto, że koszty i straty związane z łagodzeniem skutków dla zwierząt gospodarskich mogą wynieść odpowiednio 466 milionów USD i 6 milionów USD rocznie (Vardon i in., 2003).

W literaturze niewiele można znaleźć danych dotyczących kosztów zdrowia ludzi. Przeprowadzane są jedynie pojedyncze analizy dotyczące konkretnej mykotoksyny, co nie daje niestety odzwierciedlenia rzeczywistych kosztów związanych z jednoczesnym występowaniem różnych metabolitów i różnorodnych objawów. Przeprowadzono na przykład oddzielne analizy w celu oszacowania globalnego obciążenia związanego z nowotworami wątroby, które można przypisać aflatoksynie. Liu i Wu (2010) zastosowali ilościowe podejście do oceny ryzyka wystąpienia nowotworu, wykorzystując dane dotyczące zależności dawka-odpowiedź dla zależności pomiędzy aflatoksyną a populacjami zwiększonego ryzyka wystąpienia nowotworu wątroby u osób z ujemnym i dodatnim wynikiem na obecność wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV). W analizie, która obejmowała około 5 miliardów osób na całym świecie (zsumowując populacje w krajach, dla których dostępne były dane dotyczące aflatoksyny), oszacowano, że 25 200-15 000 przypadków raka wątroby rocznie można przypisać ekspozycji na aflatoksynę. W kolejnych badaniach Liu, Chang, Marsh i Wu (2012) oszacowali ryzyko wystąpienia nowotworów wątroby na podstawie systematycznego przeglądu i metaanalizy 17 badań epidemiologicznych dotyczących aflatoksyny, HBV i raka wątroby w Afryce i Azji. Autorzy oszacowali, że około 23% (21-24%) wszystkich przypadków raka wątroby rocznie można przypisać aflatoksynie, co odpowiada w sumie około 172 000 przypadkom rocznie. Ponieważ nowotwór ten jest trzecią najczęstszą przyczyną zgonów na raka na całym świecie, a śmierć następuje szybko po rozpoznaniu, udział aflatoksyny należy określić jako znaczący. Niewiele, jeśli w ogóle, jest danych dotyczących innych mykotoksyn, co wynika m.in. z braku pewności co do związku między poszczególnymi chorobami człowieka a narażeniem na określone mykotoksyny, jak również brak pewności co do narażenia ludzi

na mykotoksyny w różnych częściach świata ze względu na rodzaj zastosowanych metod analitycznych i ich dokładność.

## **2. Strategie ograniczania ilości mykotoksyn fuzaryjnych w produkcji rolniczej**

Całkowite uniknięcie spożycia jakiegokolwiek dawki mykotoksyn nie jest możliwe, a potwierdzeniem takiego stwierdzenia są zarówno opinie światowych organizacji do spraw bezpieczeństwa i jakości żywności, jak i coroczne dane dostarczane przez system RASFF. Dlatego też skuteczne ograniczenie skażenia żywności i pasz mykotoksynami należy zaliczyć do jednych z trudniejszych zadań współczesnego przetwórstwa i technologii żywności (Kapturowska, Zielińska, Stecka i Kupryś, 2010; Juś, Gwiazdowska i Waśkiewicz, 2016). Wiele znanych metod dekontaminacji mykotoksyn bywa nieskuteczna lub niewystarczająca do zapewnienia optymalnych standardów bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i pasz (Upadhaya, Park i Ha, 2010) ze względu na szereg czynników, wpływających na obecność grzybów pleśniowych w środowisku i żywności, jak również na ilość produkowanych przez nie toksyn. Nie jest również w pełni możliwe oszacowanie ryzyka wystąpienia skażenia mykotoksynami surowców i produktów żywnościowych. Należałoby więc do problemu związanego z mykotoksynami podchodzić w sposób złożony i wieloetapowy, stosując szeroko pojęte działania integrowane (Wambacq, Vanhoutte, Audenaert, De Gelder i Haesaert, 2015). Integrowana ochrona roślin zakłada wykorzystanie różnych metod (fizycznych, chemicznych i biologicznych) oraz praktyk agrotechnicznych do zredukowania poziomu kontaminacji płodów rolnych przez patogeny roślinne. Zastosowanie różnych technik ochrony roślin, oprócz zredukowania strat ilościowych oraz pogorszenia jakości plonów, ogranicza stosowanie chemicznej ochrony roślin, co również przyczynia się do poprawy jakości oraz bezpieczeństwa żywności i pasz (Toś-Luty, 2001; Banaszkiewicz, 2003; Wójcicki, 2008). Połączenie metod do zwalczania negatywnego wpływu grzybów *Fusarium* na uprawy roślinne, może znaleźć również zastosowanie w późniejszym postępowaniu z płodami roślinnymi, mianowicie podczas ich przetwarzania i przechowywania. Głównym zamierzeniem takiego podejścia jest kontrola skażenia pasz oraz żywności grzybami *Fusarium* i ich metabolitami zarówno przed i w trakcie uprawy, jak również w trakcie zbiorów, podczas obróbki, aż po przechowywanie finalnego produktu. Stosowane techniki ochrony roślin, pasz i żywności uzupełniane są często przez różnego rodzaju metody dekontaminacji już skażonego, lub potencjalnie skażonego materiału

roślinnego, w skład których wchodzi metody fizyczne, chemiczne i biologiczne. Dodatkowo powszechne jest stosowanie wielu zabiegów prewencyjnych, które efektywnie mogą poprawić bezpieczeństwo płodów rolnych i produktów z nich wytworzonych, na każdym etapie ich cyklu życia (uprawa, produkcja, przechowywanie). Kompleksowe i wielowymiarowe podejście do kontroli grzybów *Fusarium* i produkowanych przez nie mykotoksyn, zdaje się być prawidłowym podejściem w kontekście zwiększenia jakości i bezpieczeństwa żywności i pasz. (Edwards, 2004; Jouany, 2007; Magan i Aldred, 2007; Jard, Liboz, Mathieu, Guyonvarc'h i Lebrihi, 2011; Dunière, Sindou, Chaucheyras-Durand, Chevallier i Thévenot-Sergentet, 2013; Gwiazdowska, 2014; Wambacq i in., 2015; Lemmens i in., 2016; Zhu, Hassan, Watts i Zhou, 2016; Wang i in., 2015; Patriarca i Fernández-Pinto, 2017).

### **2.1. Strategie przedzbiorowe**

Działania przedzbiorowe mają w dużej mierze charakter prewencyjny, a ich stosowanie ma na celu w jak największym stopniu ograniczyć ryzyko potencjalnego skażenia upraw przez agrofagi, w tym również przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Biorąc pod uwagę podejście integrowane, do przedzbiorowych działań prewencyjnych należy zaliczyć: dobór materiału siewnego oraz odpowiedniej odmiany roślinnej, data zasiewu, nawożenie i nawadnianie gleby, technika i rodzaj prowadzonej uprawy, rotacja prowadzonych upraw (płodozmian), ochrona roślin (chemiczna i biologiczna) oraz szacowanie (modelowanie) ryzyka wystąpienia grzybów i toksyn fuzaryjnych (Edwards, 2004; Jouany, 2007; Jard i in., 2011; Gwiazdowska, 2014; Wambacq i in., 2015)

Dobór odpowiedniej jakości materiału siewnego jest istotny w zapobieganiu wystąpienia grzybów *Fusarium* i ich metabolitów na uprawie rolnej z punktu widzenia dobrych praktyk rolniczych. Nasiona przeznaczone do zasiewu powinny być zdrowe, jak również nie powinny wykazywać znamion działalności różnego rodzaju szkodników, co zwiększa wytrzymałość na niekorzystne działanie agrofagów w okresie wzrostu (Clements i White, 2004; Jard i in., 2011). Oprócz odpowiedniej selekcji jakościowej nasion, istotnym jest, by do zasiewu wybierać odmiany roślin, wykazujące odporność na infekcje grzybami strzępkowymi z rodzaju *Fusarium*. Prowadzenie upraw z wykorzystaniem odmian roślinnych odpornych lub wykazujących częściową odporność wobec grzybów *Fusarium*, jest jednym z najlepszych rozwiązań w ramach działań prewencyjnych, ograniczających skażenie płodów rolnych mykotoksynami (Jouany 2007; Buerstmayr i in. 2002).

W przypadku zbóż istnieje wiele różnic w zakresie podatności poszczególnych odmian na infekcje grzybami *Fusarium*, co skorelowane jest z różnym poziomem zanieczyszczenia mykotoksynami. Wspomniane powyżej różnice są prawdopodobnie wynikiem odmiennej puli genetycznej programów hodowlanych w poszczególnych krajach, jak również warunków agronomicznych oraz środowiskowych, w jakich prowadzona jest uprawa (Edwards, 2004). Do efektywnego prowadzenia hodowli odpornych na grzyby *Fusarium* istotne są dwa elementy, a mianowicie dostępność odpowiedniego, odpornego materiału oraz narzędzi umożliwiających dokonanie odpowiedniego wyboru linii odporności w przyszłej hodowli (Lemmens i in., 2016). Odpowiedni termin zasiewu również może wpłynąć na ochronę płodów rolnych przed patogennymi grzybami. Ryzyko zainfekowania roślin przez grzyby strzępkowe i zanieczyszczenie mykotoksynami jest największe, gdy termin kwitnienia danej odmiany roślinnej zbiega się z terminem uwalniania zarodników przez grzyby (Champeil, Fourbet, Doré i Rossignol, 2004; Januany, 2007). Przykładowo, odmiany zimowe jęczmienia i pszenicy, które dojrzewają i rozwijają się wcześniej niż odmiany wiosenne, są znacznie mniej narażone na skażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Januany, 2007). W przypadku kukurydzy wczesny termin zasiewu, w klimacie umiarkowanym, także może przyczynić się do ochrony uprawy przed skażeniem grzybami z rodzaju *Fusarium* (Magan i Aldret, 2007), jednakże, wszelkie zmiany pogodowe mogą skutkować zmniejszeniem efektywności takiego zabiegu (Munkvold, 2003). Znaczący w ochronie płodów rolnych jest również odpowiedni dobór technik prowadzenia uprawy. Stosowanie głębokiej orki, jak również innych zabiegów zmierzających do oczyszczenia gleby z resztek roślinnych, będących wektorem zarodników, zmniejsza ryzyko porażenia roślin przez patogenne grzyby strzępkowe (Obst, Lepschy-von Gleissenthall i Beck, 1997; Munkvold, 2003; Champeil i in., 2004). Istotny wpływ na zawartość toksyn fuzaryjnych w roślinach uprawnych ma także plodozmian. Niektórzy autorzy wskazują na wzrost lub spadek stężenia toksyn, w zależności od rodzaju prowadzonej uprawy w miejscu zasiewu nowej. Dill-Mackay i Jones (2000) zaobserwowali niewielkie, lecz istotne obniżenie występowania fuzariozy kłosów i poziomu DON w pszenicy uprawianej po soi, aniżeli pszenicy czy kukurydzy. Przy skutecznym ograniczaniu porażenia płodów rolnych przez patogenne grzyby strzępkowe należy pamiętać o unikaniu uszkodzeń ziaren, które mogą ułatwić jego infekcję przez grzyby. Należy zatem unikać czynników wpływających na uszkodzenia ziaren, do których zaliczyć można między innymi szkodniki lub brak odpowiedniej ilości wody (Edwards, 2004; Jard i in., 2011).

Należy wspomnieć, iż niezależnie od zastosowanych metod prewencyjnych, w celu ograniczenia występowania grzybów toksynotwórczych, często istnieje konieczność zastosowania chemicznej ochrony płodów rolnych jako zabiegu prewencyjnego. Pomimo, iż niektóre fungicydy skutecznie ograniczają występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* i ich toksycznych metabolitów wtórnych (Pirgozliev, Edwards, Hare i Jenkinson, 2003), stosowanie tych związków zwiększa ryzyko pogorszenia bezpieczeństwa zdrowotnego finalnych produktów i surowców (Jard i in., 2011), jak również mogą negatywnie wpływać na środowisko (Banaszkiewicz, 2003). Z tego względu, coraz większe znaczenie odgrywa biologiczna ochrona roślin uprawnych. Biologiczna ochrona roślin zakłada wykorzystanie tylko czynników pochodzenia naturalnego, do których zaliczyć można przede wszystkim różnego rodzaju mikroorganizmy (Zubek, 2001; Sobiczewski, 2010). Największe zainteresowanie skupia się na bakteriach PGPR (ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), które, oprócz działania antagonistycznego wobec różnego rodzaju patogenów roślin, wpływają pozytywnie na wzrost i rozwój płodów rolnych. Niebagatelną przewagą tej grupy mikroorganizmów jest fakt, iż już niewielkie ilości mogą przynieść pożądany efekt w zakresie ochrony roślin. Antagonistyczne oddziaływanie różnych mikroorganizmów na grzyby strzępkowe, w tym grzyby z rodzaju *Fusarium*, efektywnie ogranicza występowanie tych patogenów i ich toksycznych metabolitów w płodach rolnych (Nguyen, Strub, Fontana i Schorr-Galindo, 2017).

Ciekawym, a zarazem nowoczesnym sposobem prewencyjnym, w zakresie ochrony roślin, jest wykorzystanie różnego rodzaju programów i modeli, opierających się na parametrach klimatycznych, które wskazują na okres występowania istotnych zagrożeń wystąpienia skażenia płodów rolnych przez grzyby strzępkowe i inne patogeny (Jard, i in., 2011).

Etapem kończącym wszelkie działania prewencyjne jest zbiór plonów, w którym najistotniejsze czynniki stanowią warunki atmosferyczne, termin, jak również sama technika wykonania zbioru. Podczas plonów kluczowym jest, by nie doszło do uszkodzeń mechanicznych oraz zabrudzenia płodów rolnych, które mogą skutkować późniejszym wystąpieniem porażenia przez grzyby strzępkowe i mykotoksyny (Jauany i in., 2007; Neme i Mohammed; 2017).

## 2.2. Strategie pozbiiorowe

Postępowanie z płodami rolnymi po zbiorach również powinno obejmować działania zmierzające do ograniczenia ryzyka wystąpienia w roślinach skażenia grzybami strzępkowymi oraz mykotoksynami. Do najważniejszych działań pozbiiorowych należy zaliczyć poprawne i możliwie szybkie osuszanie, sortowanie, oczyszczanie z zabrudzeń poźniwnych, właściwe przechowywanie i stosowanie środków (chemicznych i biologicznych) do ochrony roślin przed agrofagami, jak również właściwe pakowanie i transport (Hell i Mutegi, 2011; Wild, Miller i Groopman, 2015). W strategiach pozbiiorowych należy również uwzględnić wszelkiego rodzaju działania zmierzające do edukacji i uświadamiania producentów rolnych w zakresie stosowania odpowiednich praktyk, co zdecydowanie ułatwi ograniczenie ekspozycji płodów rolnych na mykotoksyny (Wild i in., 2015). Do najbardziej interesujących zabiegów pozbiiorowych, które są szeroko opisane w literaturze, należy wymienić różnego rodzaju metody dekontaminacji mykotoksyn ze skażonych płodów rolnych, które można podzielić na chemiczne, fizyczne i biologiczne.

Chemiczne metody polegają na zastosowaniu substancji, które mogą zniszczyć lub inaktywować mykotoksyny, jak kwasy, zasady, związki utleniające, redukujące czy związki chloru. Przykładem chemicznej degradacji toksyn jest amoniakowanie pasz, stosowane do detoksykacji orzeszków, bawełny i kukurydzy (Piva, Galvano, Pietri i Piva, 1995; Gomaa, Ayesh, Galil i Naguib 1997) czy też stosowanie kwasów, czego przykładem jest wykorzystanie kwasu cytrynowego, do degradacji aflatoksyny (Méndez-Albores, Del Río-García i Moreno-Martínez, 2007). Spośród związków utleniających czy redukujących wymienić należy ozon wykorzystywany do detoksykacji aflatoksyn (Beuchat, Chmielewski, Keswani, Law i Frank, 1999) czy wodorosiarczyn sodu, zastosowany do degradacji aflatoksyny w kukurydzy (Doyle, Applebaum, Brackett i Marth, 1982) i deoksyniwalenolu (Young, Trenholm, Friend i Prelusky, 1987). Dane literaturowe wskazują także na możliwość zastosowania związków takich jak: związki chloru, nadmanganian potasu, boran sodu, formaldehyd czy metanol (Samarajeewa, Sen, Cohen, i Wei, 1990; Piva i in., 1995; Yazici i Velioglu, 2002). W praktyce stosowanie chemicznych substancji jest jednak ograniczone z kilku powodów, wśród których należy zwrócić uwagę na możliwość powstawania związków pochodnych, równie toksycznych jak wyjściowa toksyna. Poza tym dodatek substancji chemicznych może mieć wpływ na właściwości sensoryczne, odżywcze czy też funkcjonalne produktu (Méndez-Albores i in., 2007).



Metody fizyczne są bardzo zróżnicowane i obejmują proste czynności związane z sortowaniem ziarna, łuskaniem i myciem, ale też stosowanie promieniowania, inaktywacji termicznej czy adsorbentów. Działania takie jak sortowanie czy obłuskanie pozwalają na zmniejszenie ilości toksyn nawet o kilkadziesiąt procent, zakładając, że nasiona różnią się wizualnie oraz że toksyczne metabolity znajdują się w ich powierzchniowych warstwach (House, Nyachoti i Abramson, 2003; Fandohan i in., 2005). Coraz częściej stosowanym rozwiązaniem jest też użycie adsorbentów takich jak węgiel aktywny, glinokrzemiany czy polimery. Przeprowadzono wiele badań, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, z wykorzystaniem różnych adsorbentów, potwierdzając ich skuteczność w procesie usuwania toksyn. Przy doborze adsorbentów ważne są jego cechy fizyczne, w tym całkowita powierzchnia oddziaływania czy porowatość, ale też cechy chemiczne tej powierzchni, m.in. rodzaj i ilość grup funkcyjnych. Z drugiej strony, równie istotne są cechy mykotoksyn, które mają być zaadsorbowane, jak wielkość cząsteczki, jej kształt, polarność, rozpuszczalność (Huwig, Freimund, Käppeli i Dutler, 2001).

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie w kontekście ochrony przed mykotoksynami budzą metody biologiczne, które postrzega się obecnie jako najbardziej obiecujące. Poza tym metody chemiczne i fizyczne mogą wiązać się z ograniczeniami związanymi m.in. z bezpieczeństwem produktu czy obniżeniem ich jakości. Stąd coraz większe zainteresowanie mikroorganizmami jako czynnikami detoksyfikującymi. Dane literaturowe wskazują, że wiele mikroorganizmów może wykazywać właściwości degradujące, transformujące bądź też wiążące mykotoksyny. Wiele bakterii i grzybów, a także roślin, może prowadzić enzymatyczną degradację czy transformację toksyn, co opisano m.in. u *Flavobacterium aurantiacum*, grzybów z rodzajów *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* sp., *Penicillium*, *Trichoderma viridae*, *Candida lipolytica* i innych (Ciegler, Lillehoj, Peterson i Hallz 1966; Liu i in., 1998, 2001; Shetty i Jespersen, 2006; Abrunhosa, Santos i Venancio 2006; Bejaoui, Mathieu, Taillandier, i Lebrihi, 2006). Degradacja lub transformacja to procesy, które mogą prowadzić do redukcji stężenia danej mykotoksyny bez ryzyka powstania związków pochodnych, jednakże istnieje ryzyko przekształcenia wyjściowego związku w związki pochodne o toksyczności porównywalnej, a niekiedy nawet wyższej niż macierzysty związek. Przykładem jest przekształcenie zearalenonu do  $\alpha$  i  $\beta$ -zearalenolu, dając w rezultacie związek o wyższej aktywności estrogennej ( $\alpha$ -zearalenol) niż zearalenon (Böswald, Engelhardt, Vogel, i Wallnöfer, 1995). Wspomniane wyżej metody raczej nie znajdują powszechnego uznania, głównie ze względu na brak dostatecznej wiedzy

na temat procesu prowadzonego przez dany mikroorganizm, jak również ryzyko związane z możliwością powstawania toksycznych związków pochodnych.

W tej sytuacji ciekawym rozwiązaniem jest zastosowanie mikroorganizmów wiążących mykotoksyny. Zjawisko takie zaobserwowano u wielu bakterii fermentacji mlekowej (Pierides, El-Nezami, Peltonen, Salminen i Ahokas, 2000; El-Nezami, Chrevatidis, Auriola, Salminen i Mykkänen, 2002; El-Nezami, Polychronaki, Salminen i Mykkänen, 2002; Piotrowska i Żakowska, 2005; Niderkorn, Boudra i Morgavi, 2006), a także u drożdży (van der Aa Kühle, Skovgaard i Jespersen, 2005; Shetty, Hald i Jespersen, 2007; Piotrowska, Nowak i Czyżowska, 2013). Redukcja stężenia toksyn na drodze wiązania mikrobiologicznego może być bardzo zróżnicowana i zależy od szczepu, stanu fizjologicznego komórek, a także od warunków środowiskowych. Sugeruje się, że mechanizmem odpowiedzialnym za usuwanie mykotoksyn jest adsorpcja do powierzchni komórek, ponieważ wielu autorów opisuje tę zdolność u bakterii żywych, jak i martwych. Wskazuje się nawet na możliwość wiązania mykotoksyn przez wypreparowane ściany komórkowe (Angioni i in., 2007; Patharajan i in., 2011). W przypadku bakterii fermentacji mlekowej niewiele jest danych wyjaśniających, jakie elementy ściany komórkowej mogą brać udział w procesie wiązania, natomiast u drożdży są to najprawdopodobniej glukany i mannoproteiny (Raju i Dewegowda, 2000; Yiannikouris i in., 2004).

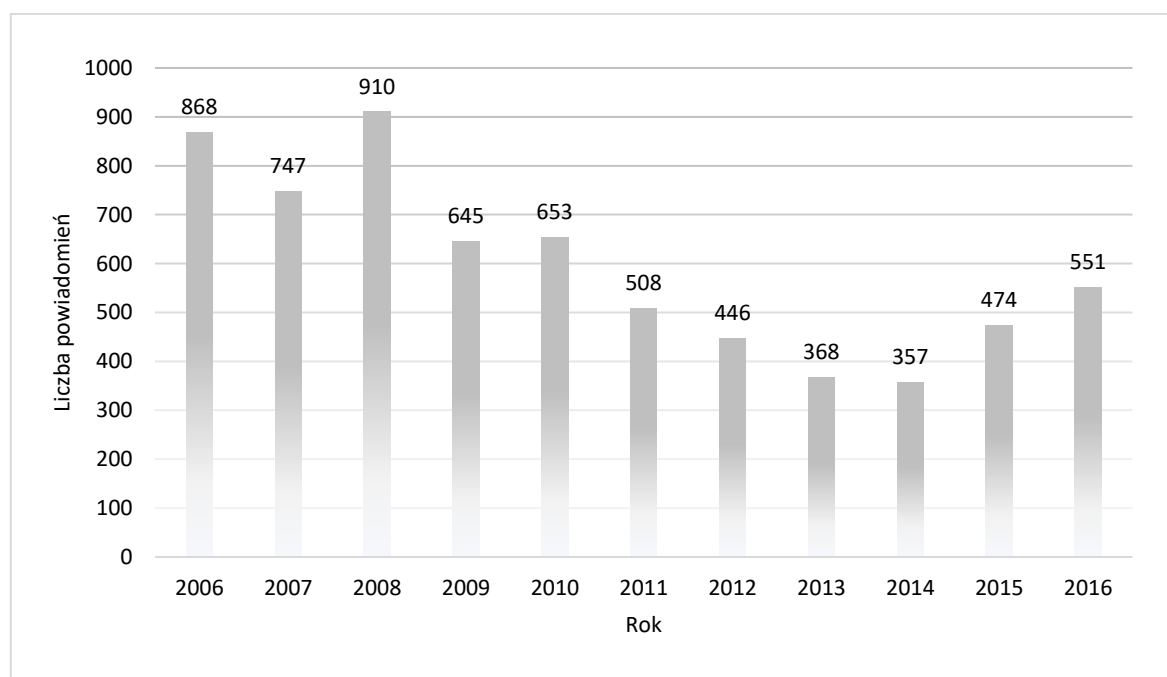
### **2.3. Regulacje prawne związane z mykotoksynami**

Ważnym elementem strategii związanych z ograniczeniem występowania mykotoksyn w łańcuchu żywnościowym jest opracowanie odpowiednich dokumentów, których głównym zadaniem jest skompletowanie informacji dotyczących ryzyka, metod oznaczania oraz minimalnych dozwolonych stężeń toksycznych metabolitów w żywności i paszach. Na kształt poszczególnych regulacji i standardów prawnych związanych z mykotoksynami, zwłaszcza w kontekście globalnej normalizacji, wpływają w głównej mierze takie czynniki jak dostępność informacji w zakresie toksyczności i ekspozycji tych związków, wiedza na temat przedostawania i ilości mykotoksyn w produktach, jak również regulacje prawne w poszczególnych krajach (Binder, 2007; van Egmond, Schothorst i Jonker, 2007). Wspomniane czynniki mogą wpływać na trudności w ustaleniu międzynarodowych przepisów, związanych z mykotoksynami, czego przykładem są niekiedy różne limity ustalone w ramach jednej toksyny, w zależności od dokumentu czy kraju.

Obecnie w wielu krajach funkcjonują odpowiednie dokumenty prawne, mające na celu ograniczenie ryzyka transferu mykotoksyn do łańcucha żywnościowego. Warto wspomnieć, iż istnieje kilka zharmonizowanych dokumentów w zakresie mykotoksyn, które powstały w ramach wspólnot ekonomicznych, m. in. Unii Europejskiej, MERCOSUR czy Australia/Nowa Zelandia (FOA, 2004). W dużej mierze zapewnieniem bezpieczeństwa konsumentów, zachowaniem odpowiednich praktyk handlu i obrotu żywnością, jak również wsparciem współpracy organizacji międzynarodowych ustalających normy żywnościowe, zajmuje się Komisja Kodeksu Żywnościowego CAC (ang. *Codex Alimentarius Commission*), która w kwestiach naukowych wspierana jest przez JECFA (ang. *Joint Expert Committee on Food Additives*). Wspólne działania CAC i JECFA koncentrują się na opracowywaniu międzynarodowych standardów tak, by nie ograniczały globalnego handlu produktami żywnościowymi (Egmond i Jonger, 2004).

W Unii Europejskiej funkcjonuje bardzo rozbudowany system uregulowań prawnych i norm w zakresie bezpieczeństwa żywności i pasz. Koordynację nad szacowaniem ryzyka oraz bezpieczeństwem łańcucha żywnościowego sprawuje Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), który przy współpracy z Parlamentem Europejskim, Komisją Europejską oraz państwami członkowskimi dostarcza m. in. odpowiednie opinie naukowe czy też doradza w zakresie działań odnośnie zarządzania ryzykiem. Wszelkie prace EFSA przekazywane są do Komisji Europejskiej, która w strukturach UE sprawuje główną rolę w zarządzaniu ryzykiem (Rozporządzenie 178/2002; van Egmond i in., 2007; Andrysiak, 2009), natomiast w Polsce, do realizacji zadań EFSA, utworzono zespół instytucji naukowo – badawczych, w skład których wchodzi m. in. Instytut Żywności i Żywienia, Instytut Biotechnologii i Przemysłu Rolno – Spożywczego czy Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny (Andrysiak, 2009). W celu zapewnienia odpowiedniej jakości i bezpieczeństwa produktów żywnościowych w UE opracowano odpowiednie akty prawne, ustalające m. in. minimalne stężenia mykotoksyn w żywności i paszach. Przykładem takiego aktu prawnego jest Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19.12.2006, które już kilkarotnie aktualizowano (Rozporządzenie 1126/2007 i 105/2010), jak również opracowane zostały odpowiednie wytyczne w zakresie monitorowania produktów importowanych z poza UE (Rozporządzenie 401/2006). Ważnym elementem w strategii ograniczenia przedostawania się mykotoksyn do łańcucha żywnościowego jest wymiana informacji między Państwami Członkowskimi, związanych z zagrożeniem naruszenia bezpieczeństwa żywności i pasz. W tym celu, na mocy

Rozporządzenia Komisji (WE) 178/2002, powołany został System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach – RASFF, który koordynuje właściwy obieg informacji wewnątrz UE. W Polsce całą strukturą systemu RASFF zarządza Główny Inspektor Sanitarny. Dzięki tak szeroko rozbudowanej strukturze wymiany informacji możliwe jest skuteczne zapobieganie wystąpienia zagrożeń, związanych z bezpieczeństwem żywności i pasz, oraz zastosowanie właściwych metod zaradczych (Ledzion i in., 2010). Dzięki funkcjonowaniu systemu RASFF można zwrócić uwagę, iż mykotoksyny, obok patogennych mikroorganizmów i pestycydów, są najczęstszym zgłaszanym zagrożeniem w krajach UE (wykres 1). Jak wynika z raportów RASFF, główną grupą mykotoksyn, zanieczyszczających produkty żywnościowe, są aflatoksyny i ochratoksyny, rzadziej toksyny fuzaryjne. Warto w tym miejscu podkreślić, iż w przypadku pasz przeznaczonych dla zwierząt, również tylko dla aflatoksyn ustalone zostały wartości minimalne, natomiast dla pozostałych toksyn opracowano jedynie wartości orientacyjne (Gwiazdowska, 2014).



**Wykres 1. Liczba powiadomień do systemu RASFF dotyczących obecności mykotoksyn**

Źródło: opracowanie własne na podstawie (RASFF, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016)

### 3. Znaczenie bakterii fermentacji mlekowej w ograniczeniu występowania mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym

Bakterie z grupy fermentacji mlekowej (LAB, ang. *lactic acid bacteria*) są to gramodatnie, nieruchliwe, niesporulujące (wyj. *Sporolactobacillus inulinus*), względnie beztlenowe drobnoustroje, które metabolizują węglowodany z wytworzeniem kwasów organicznych, głównie mlekowego. Komórki tych bakterii stanowią morfologiczne formy o kształcie ziarniaków lub pałeczek, które przyjmują regularne skupiskowe układy (łańcuchy; tetrazy i paciorkowce). Kształt komórek bakterii jest zależny od m.in. fazy wzrostu oraz zastosowanego podłoża (Schlegel, 2004; Vos i in., 2009). Produktem dominującym, powstającym w wyniku fermentacji mlekowej cukrów przez te mikroorganizmy, jest kwas mlekowy, natomiast produktami ubocznymi są m.in. kwas octowy, aldehyd octowy, acetoina, diacetyl, butanodiol, etanol i dwutlenek węgla, natlenek wodoru, jak również bakteriocyny (Gollop, Zakin i Weinberg, 2005; Shim i in., 2012). Do grupy bakterii fermentacji mlekowej zalicza się mikroorganizmy z rzędów *Lactobacillales* i *Bacillales* w obrębie gromady *Firmicutes*, jak również rodziny *Bifidobacteriaceae*. Środowisko naukowców przyjmuje zróżnicowaną postawę w kwestii, czy odległe filogenetycznie bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* należy uznawać za grupę bakterii fermentacji mlekowej (Vos i in., 2009; Rzepkowska, Zielińska i Kołożyn-Krajewska, 2014).

Różnorodność i powszechne występowanie bakterii fermentacji mlekowej stwarza szerokie możliwości ich wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu. Znane są sposoby wykorzystywania tych bakterii w przemyśle spożywczym, ale coraz częściej podejmowane są badania dotyczące aplikacji bakterii kwasu mlekowego w produkcji rolniczej. Obserwuje się tym samym pojawianie nowych bądź ulepszonych w stosunku do istniejącej oferty, produktów, zawierających bakterie fermentacji mlekowej. Przykładem jest coraz szersza oferta zakiszaczy czy probiotyków. Jednocześnie podejmowane są próby opracowania produktów innowacyjnych jak biopreparaty będące alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin. Warto przy tym podkreślić, że wiele gatunków bakterii fermentacji mlekowej posiada status GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) ustanowiony przez amerykańską Komisję ds. Żywności i Leków (FDA), jak status QPS (ang. *Qualified Presumption of Safety*), ustalony przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA (Meile, Le Blay i Thierry, 2008).

W produkcji zwierzęcej bakterie fermentacji mlekowej, jak już wspomniano, znajdują zastosowanie m.in. jako dodatki do pasz czy preparaty do zakiszania, co jest rozwiązaniem dość dobrze znanym, jednak intensywnie rozwijanym w ostatnich latach. Warto podkreślić, iż produkcja pasz dla zwierząt stanowi ważny sektor produkcji rolniczej, szczególnie w krajach rozwiniętych, gdzie aż do 70% zbóż przeznaczanych jest na pasze dla zwierząt (Awika, 2011).

Produkcyjność zwierząt gospodarskich determinowana jest poprzez osiągnięcia w hodowli, status zdrowotny stada i żywienie zwierząt. Stosowanie pasz o wysokiej wartości odżywczej stanowi warunek zdrowia oraz dobrych wyników hodowlanych. W celu osiągnięcia wymiernych korzyści ekonomicznych w żywieniu zwierząt gospodarskich powszechnie stosuje się kiszonki roślinne. Dostępność zakiszonego materiału roślinnego przez cały rok umożliwia bowiem zbilansowanie dawki pokarmowej dla zwierząt, a tym samym uzyskanie wysokiej wydajności hodowli. Kiszonki należą do pasz soczystych wytwarzanych w wyniku fermentacji mlekowej przebiegającej naturalnie lub z wykorzystaniem dodatków handlowych preparatów, środków biologicznych i/lub chemicznych. Zakiszanie materiału organicznego polega na przeprowadzeniu w warunkach kontrolowanych fermentacji roślin z wykorzystaniem bakterii kwasu mlekowego. Powstające w procesie kisenia metabolity wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec mikroorganizmów patogennych, m.in. bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Salmonella* spp. czy *Listeria* spp., jak również wobec mikroflory niepożądaną tj. bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz bakterii gnilnych (Marciňáková, Simonová, Strompřová i Lauková, 2005; Ratanapibulsawat, Kroujkaew, Sadahiro i Nitisinprasert, 2005). Ponadto krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe regulują pH środowiska obniżając jego wartość do poziomu letalnego dla bakterii chorobotwórczych (Commane i in., 2005; Fayol-Messaoudi, Berger, Coconnier-Polter, Moal, i Servin 2005). Fermentacja mlekowa jest procesem beztlenowym, który zachodzi w temperaturze ok. 25-35°C, przy wilgotności 65-75%. Proces ten odbywa się w obecności odpowiedniej ilości cukrów w zakiszonym materiale, która zapewnia minimum cukrowe, czyli warunkuje wytworzenie odpowiedniej ilości kwasu mlekowego która obniży pH kiszonki do 4,2.

Wysoka aktywność wodna kiszzonej paszy oraz technologia produkcji (nie obejmuje obróbki termicznej) sprawiają, że jakość mikrobiologiczna produktu finalnego determinowana jest głównie przez mikroflorę roślin, warunki fermentacji oraz zastosowane dodatki. Mikroflora zakiszanych zielonek zależna jest od wielu czynników,

takich jak rejon geograficzny, warunki klimatyczne, jakość gleby, nawożenie, jak również występujące na danym terenie zwierzęta. Powierzchnia roślin przeznaczonych do zakiszania jest naturalnym rezerwuarem zróżnicowanych drobnoustrojów m.in. bakterii tlenowych, beztlenowych i grzybów mających wpływ na jakość kiszonki. Populacja bakterii kwasu mlekowego odpowiedzialna za fermentację mlekową kiszonki jest kilka rzędów wielkości niższa od innych grup mikroorganizmów występujących na powierzchni surowca roślinnego (Pahlow, Muck, Driehuis, Elferink i Spoelstra, 2006; Kukier, Kwiatek, Goldsztejn i Grenda, 2015). Obecnie obserwuje się powszechne stosowanie preparatów kiszonkarskich, które inicjują, ukierunkowują i stabilizują proces fermentacji materii organicznej, jak również poprawiają jakość kiszonki. Kiszonka paszowa dobrej jakości cechuje się wysoką wartością pokarmową, smakowitością w tym przyjemnym zapachem, odpowiednią strukturą i kolorem, stabilnością tlenową, pH 4-5 i jakością mikrobiologiczną. Stosowanie dodatków bakteryjnych w przemyśle paszowym niesie ze sobą wymierne korzyści. Często stwierdza się poprawę wydajności i produktywności na skutek stosowania dodatku bakterii fermentacji mlekowej w paszy, przypisując te efekty zwiększonemu spożyciu paszy i poprawie jej wykorzystania. W skład biopreparatów do zakiszania wchodzi wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej o określonych właściwościach. Szczepy bakterii wybrane do kiszania pasz powinna cechować wysoka wydajność i synergia oddziaływania. Wybrane szczepy bakterii kwasu mlekowego, wykorzystywane jako kultury starterowe do zakiszania pasz, poprawiają stan higieniczny oraz przeciwdziałają fermentacji wtórnej produktu finalnego. Doniesienia literaturowe wskazują, że stosowanie dodatków bakteryjnych do produkcji kiszzonek (biopreparaty do zakiszania) zapewnia niższe pH i wyższą stabilność tlenową produktu finalnego w porównaniu do spontanicznej fermentacji (Kung, Taylor, Lynch i Neylon, 2003; Podkówa, Podkówa i Jermak, 2003; Kapturowska, Zielińska i Stecka, 2012). Wytwarzany przez mikroorganizmy kwas mlekowy, w odpowiedniej ilości, zakwasza surowiec, cechuje się też działaniem m.in. konserwującym czy też bakteriobójczym, a także detoksykującym. Pożyteczną mikrobiotę kiszzonek stanowią bakterie właściwej fermentacji mlekowej m.in. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Enterococcus* spp. (Kung i in., 2003; Purwin, Lipiński i Pysera, 2012).

Tabela 6. Przegląd preparatów handlowych do zakiszania, zawierających w składzie bakterie fermentacji mlekowej

Nazwa handlowa preparatu	Materiał zakiszany	Mikroorganizmy wchodzące w skład preparatu	Liczba bakterii
<b>Labacsil® Bakterie</b>	kukurydza, trawy, zboża, lucerna	<i>Enterococcus faecium</i> M74® <i>Lactobacillus plantarum</i> LSI <i>Lactobacillus plantarum</i> L-256 <i>Pediococcus acidilactici</i> 33-11 <i>Pediococcus acidilactici</i> 33-06	1,0 x 10 <sup>6</sup> jtk/g zakiszzonego produktu
<b>Farma Sil</b>	trawy, koniczyna, zboża (GPS), kukurydza	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ 16627 <i>Pediococcus acidilactici</i> NCIMB 300005 <i>Lactobacillus paracasei</i> NCIMB 30151	1,0 x 10 <sup>10</sup> jtk/g preparatu
<b>MicroSile</b>	rośliny motylkowe, zboża, trawy, kukurydza, wysłodki	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	6,0 x 10 <sup>10</sup> jtk/g preparatu
<b>Feedtech Silage F3000</b>	trawy, mieszanki traw z roślinami motylkowymi, rośliny motylkowe, zboża, kukurydza	Szczep bakterii MilaB393	b.d.
<b>Feedtech Silage F400</b>	trawy, zboża, ziarno, kukurydza	<i>Lactobacillus buchneri</i>	1,0 x 10 <sup>5</sup> jtk/g zakiszzonego produktu
<b>Feedtech™ silage M20XC</b>	b.d.	<i>Lactobacillus lactis</i>	b.d.
<b>BIO-SIL</b>	trawy, lucerna, zboża, kukurydza, młóto browarniane	Szczepy bakterii <i>Lactobacillus plantarum</i>	3,0 x 10 <sup>5</sup> jtk/g preparatu
<b>Blattin® AWS Special Premium</b>	trawy, lucerna, zboża (GPS)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ 16627 <i>Pediococcus acidilactici</i> NCIMB 30005	1,0 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu
<b>Blattisil® DRY Special</b>	kukurydza, zboża (GPS)	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu
<b>Blattisil® Corn</b>	kukurydza	<i>Lactobacillus brevis</i>	1,0 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu
<b>Dolsil Perfect</b>	lucerna, koniczyna, zboża, wysłodki buraczane	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	b.d.
<b>POLMASIL®</b>	trawy, rośliny motylkowe i ich mieszanki, kukurydza	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	1,25 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu
<b>POLMASIL EXTRA®</b>	trawy, rośliny motylkowe i ich mieszanki, kukurydza	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i>	1,5 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu
<b>POLMASIL Buchneri®</b>	kukurydza, lucerna, trawy, koniczyna	<i>Lactobacillus buchneri</i>	2,0 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu
<b>POLMASIL CORN®</b>	kukurydza	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	1,0 x 10 <sup>11</sup> jtk/g preparatu

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych producentów



Preparaty do zakiszania pasz dostępne na Polskim rynku zawierające w swoim składzie zróżnicowane gatunki bakterii fermentacji mlekowej to produkty w formie płynnych lub stałych dodatków, koncentratów oraz inokulatów. W zadeklarowanym składzie dostępnych biopreparatów można odnotować występowanie hetero- i homofermentatywnych bakterii fermentacji mlekowej z gatunków *Lactobacillus*, *Enterococcus* oraz *Pediococcus* (tabela 6). Kompozycja handlowych biopreparatów wskazuje na tendencyjność stosowania tych samych szczepów bakterii w produktach dedykowanych różnemu materiałowi roślinnemu. Obserwuje się zatem niski stopień zróżnicowania w obrębie stosowanych drobnoustrojów, a ilością oferowanych preparatów w portfolio produktowym poszczególnych producentów. Ponadto, skład komercyjnych produktów do zakiszania zawierających bakterie fermentacji mlekowej, wielokrotnie stanowi tajemnicę producenta, a dane informujące o kompozycji produktu są nieprecyzyjne i obejmują jedynie informacje o obecności bakterii kwasu mlekowego, bez informacji o nazwie gatunku czy też ich koncentracji.

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na znaczenie bakterii fermentacji mlekowej w uprawach roślin, choć wciąż niewiele jest danych na ten temat. Dane literaturowe dotyczące badań interakcji między roślinami i mikroorganizmami podkreślają znaczenie drobnoustrojów w promowaniu zdrowia i odporności roślin (Smith, Praslickova i Ilangumaran, 2015; Smith, Subramanian, Lamont i Bywater-Ekegård, 2015). Szczegółowe komponowanie mikrobioty w celu promowania wzrostu roślin stanowi obiecującą strategię otrzymania produkcji roślinnej o wysokiej jakości w kontekście zmieniającego się klimatu i rosnącej populacji. Mikroorganizmy z grupy PGPM (ang. *Plant Growth Promoting Microorganisms*) wspierają procesy wzrostu i rozwoju roślin poprzez poprawę pozyskiwania składników odżywczych. Drobnoustroje mogą również działać jako czynniki zwalczania biologicznego - BCA (ang. *Biological Control Agents*), zwalczając mikroorganizmy patogenne dla roślin, poprawiając zdolność roślin do lepszego znoszenia stresu biotycznego i abiotycznego lub poprzez wytwarzanie związków, które bezpośrednio stymulują wzrost roślin. Ponadto w uprawie roślin wykorzystywane są również plonotwórcze bakterie - YIB (ang. *Yield Increasing Bacteria*). Większość mikroorganizmów wspiera procesy wzrostu i rozwoju roślin poprzez zróżnicowane mechanizmy jednocześnie (Avis, Gravel, Antoun i Tweddell, 2008). Należy też podkreślić, że obawy związane ze szkodliwym wpływem wielu pestycydów na środowisko i zdrowie ludzkie skłoniły do poszukiwania bezpieczniejszych alternatyw m.in. zastosowania dobroczynnych mikroorganizmów

Jak już wspomniano, bakterie fermentacji mlekowej mogą znaleźć zastosowanie jako bezpieczne i skuteczne biologiczne środki zwalczania bakteryjnych i grzybowych fitopatogenów. Mechanizm działania bakterii fermentacji mlekowej w tym przypadku polega na wytwarzaniu przez nie kwasu mlekowego, bakteriocyn i innych związków przeciwdrobnoustrojowych, jak również usuwaniu reaktywnych form tlenu (Compant, Duffy, Nowak, Clément i Barka, 2005). Zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej prowadzi również do hamowania rozwoju patogenów poprzez prewencyjne kolonizowanie tkanek roślinnych podatnych na zakażenie (Rosello i in., 2013) oraz przez zmianę odpowiedzi immunologicznej rośliny (Konappa i in., 2016). Efekt taki nazywany jest nabytą odpornością systemiczną, SAR (ang. *Systemic Acquired Resistance*). Badania doświadczalne wskazują, że zmiany w morfologii pomidorów traktowanych różnymi szczepami bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, stanowią przykład odpowiedzi SAR, prowadzącej do wytworzenia odporności na patogeny grzybowe (Hamed, Moustafa i Abdel-Aziz, 2011). Zaobserwowano, że nasiona pomidora traktowane bakteriami *Lactobacillus paracasei* izolowanymi z ryzosfery pomidora wytwarzały sadzonki, które były bardziej odporne na zakażenie fitopatogenami z powodu zróżnicowanej ekspresji metabolitów (Konappa i in., 2016).

Powszechne występowanie bakterii fermentacji mlekowej obserwuje się także w procesie kompostowania, gdzie mikroorganizmy te stanowią jedną z grup odpowiedzialnych za rozkład materii organicznej (Partanen, Hultman, Paulin, Auvinen i Romantschuk, 2010). Kompostowanie to proces tlenowy, podczas którego odpady organiczne są degradowane biologicznie przez mikroorganizmy. Wiele czynników, takich jak zawartość tlenu, wilgotność, skład, pH i temperatura, wpływa na proces kompostowania, a ostatecznie na jakość produktu końcowego. Kompost musi charakteryzować się stabilnością, brakiem występowania mikroorganizmów patogennych oraz nasion, powinien być także możliwy do wtórnego zastosowania. W ostatnich latach obserwuje się próby ulepszenia procesów kompostowania przez inokulację konsorcjami drobnoustrojów zawierającymi w składzie bakterie fermentacji mlekowej. Dane literaturowe wskazują, że kompost zaszczerpiiony dodatkiem bakterii kwasu mlekowego umożliwia uzyskanie wydajniejszych plonów i zwiększa pobór składników odżywczych m.in. przez pszenicę, soję oraz ryż w porównaniu do roślin uprawianych z zastosowaniem konwencjonalnego kompostu (Hussain, Javaid, Parr, Jilani i Haq, 1999; Hu i Qi, 2010; Javaid i Mahmood, 2010; Javaid, 2011). Zwiększona produktywność upraw nawożonych biokompostami, zaszczerpionymi bakteriami fermentacji mlekowej, może wynikać

ze zwiększonej biodostępności składników odżywczych (Shrestha, Kim i Park, 2014; Giassi, Kiritani i Kupper, 2016).

Biorąc pod uwagę zarówno aktualne dane literaturowe, jak i obserwowane na rynku zapotrzebowanie na preparaty oparte na biologicznych czynnikach, które znalazłyby zastosowanie w szeroko pojętej produkcji rolniczej, w pracy podjęto próbę określenia możliwości wykorzystania w tym zakresie bakterii fermentacji mlekowej. W celu ustalenia jak najszerszego spektrum zastosowania, szczególną uwagę zwrócono na określenie właściwości wyizolowanych i zidentyfikowanych bakterii, które byłyby przydatne w komponowaniu biopreparatów przeznaczonych np. do zakiszania roślin czy jako produktów alternatywnych dla chemicznych środków ochrony roślin. Główny nacisk położono na właściwości fungistatyczne i ograniczające występowanie mykotoksyn, ponieważ obecność grzybów i ich toksycznych metabolitów stanowi poważny problem w łańcuchu żywnościowych, wpływając ostatecznie na bezpieczeństwo żywności i pasz.

## CZĘŚĆ BADAWCZA

### 4. Założenia badawcze

Jak wspomniano w części literaturowej, problem związany z występowaniem patogennych grzybów strzępkowych i mykotoksyn w żywności i paszach jest powszechny na świecie i towarzyszy ludzkości od stuleci. Jednak dopiero w drugiej połowie XX wieku zaczęto podejmować próby zmierzające do ograniczenia ilości toksycznych metabolitów wtórnych grzybów strzępkowych w łańcuchu żywnościowym. Obecnie spożycie jednorazowo większych dawek mykotoksyn jest rzadko spotykane. Niemniej długotrwałe spożywanie małych ilości toksyn może w konsekwencji prowadzić do poważnych chorób czy schorzeń, zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Poza niewątpliwym, negatywnym wpływem mykotoksyn na zdrowie konsumentów (problem o wymiarze społecznym), związki te znacznie pogarszają jakość surowców i produktów roślinnych, jak również produktów pochodzenia zwierzęcego, generując tym samym duże straty w sektorze rolno – spożywczym (wymiar ekonomiczny). Z opinii organizacji międzynarodowych wynika, że nie jest możliwe uniknięcie spożycia jakichkolwiek dawek mykotoksyn. Zdając sobie sprawę z wpływu grzybów strzępkowych i ich toksycznych metabolitów, na ekonomiczno – społeczny obszar życia, wdrożono i rozwinięto wiele metod i uregulowań prawnych ograniczających ilość mykotoksyn w żywności i paszach. Dodatkowo, wzrost udziału w rynku upraw i produktów ekologicznych, zwłaszcza w ostatniej dekadzie, przyczynił się do rozwoju biologicznych metod ochrony roślin, które obejmują stosowanie między innymi różnego rodzaju mikroorganizmów.

Jednym z możliwych sposobów przeciwdziałania skażeniu żywności i pasz toksynotwórczymi grzybami strzępkowymi jest wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej. Bakterie należące do tej grupy są powszechne znane z wysokiej aktywności biologicznej, w tym aktywności fungistatycznej, przy czym określone właściwości uważane są za szczepozależne. Dlatego stale poszukuje się nowych szczepów LAB, wykazujących szeroką aktywność biologiczną. Ponadto, bakterie kwasu mlekowego znajdują szerokie zastosowanie w produkcji żywności i pasz. Związane jest to, oprócz cennych właściwości tej grupy bakterii, z przypisaniem bakterii fermentacji mlekowej jako mikroorganizmów bezpiecznych w stosowaniu w produkcji żywności, co potwierdza nadanie im statusu GRAS (Stany Zjednoczone) czy statusu QPS (Unia Europejska). W ostatnich latach, w literaturze naukowej, coraz częściej podkreśla się rolę bakterii kwasu mlekowego w ograniczaniu

występowania mykotoksyn w żywności i paszach, włączając je tym samym w integrowane strategie ochrony roślin.

Biorąc pod uwagę powyższe spostrzeżenia, w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę pozyskania nowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej i określenia ich przydatności w ograniczeniu migracji mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym. Jako materiał izolacyjny wybrano kiszonki paszowe poddane spontanicznej fermentacji, jako że produkty fermentowane (zwłaszcza przy użyciu tradycyjnych metod) uważa się za najlepsze źródło bakterii kwasu mlekowego o wysokiej aktywności biologicznej (Sip, Krasowska, Więckowicz i Grajek, 2009). W pracy zastosowano metodę skringową obejmującą w pierwszej kolejności określenie aktywności biologicznej poszczególnych izolatów, natomiast szczegółową identyfikację (fenotypową i genotypową) przeprowadzono dla kilku wyselekcjonowanych szczepów. Takie podejście uważa się za szybsze i bardziej ekonomiczne w zakresie izolacji efektywnych mikroorganizmów (De Martinis, Públio, Santarosa i Freitas, 2001; Ghrairi, Manai, Berjeadu i Frère, 2004). W doświadczeniach podjęto również próbę określenia przydatności wyizolowanych bakterii w strategiach minimalizujących ilość mykotoksyn fuzaryjnych w rolnictwie, jak również próby optymalizacji składu podłoża, w celu zwiększenia aktywności fungistatycznej badanych izolatów.

#### **4.1. Cel pracy i hipotezy badawcze**

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie możliwości zastosowania wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej jako czynników ograniczających występowanie grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym.

##### **Cele szczegółowe**

1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z materiału roślinnego, poddanego spontanicznej fermentacji.
2. Selekcja wyizolowanych bakterii pod kątem wybranych właściwości ze szczególnym uwzględnieniem aktywności fungistatycznej.
3. Identyfikacja fenotypowa i genetyczna wybranych izolatów bakterii mlekowych.
4. Określenie możliwości praktycznego zastosowania uzyskanych izolatów w redukcji poziomu mykotoksyn fuzaryjnych w warunkach modelowych.

5. Optymalizacja składu podłoża w celu zwiększenia właściwości fungistatycznych uzyskanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Tezę w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowiło założenie, że bakterie fermentacji mlekowej wykazują zdolność hamowania wzrostu grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* oraz redukcji ilości wytwarzanych przez nie mykotoksyn, przy czym właściwości te są gatunkowo i szczepozależne.

### **Hipotezy**

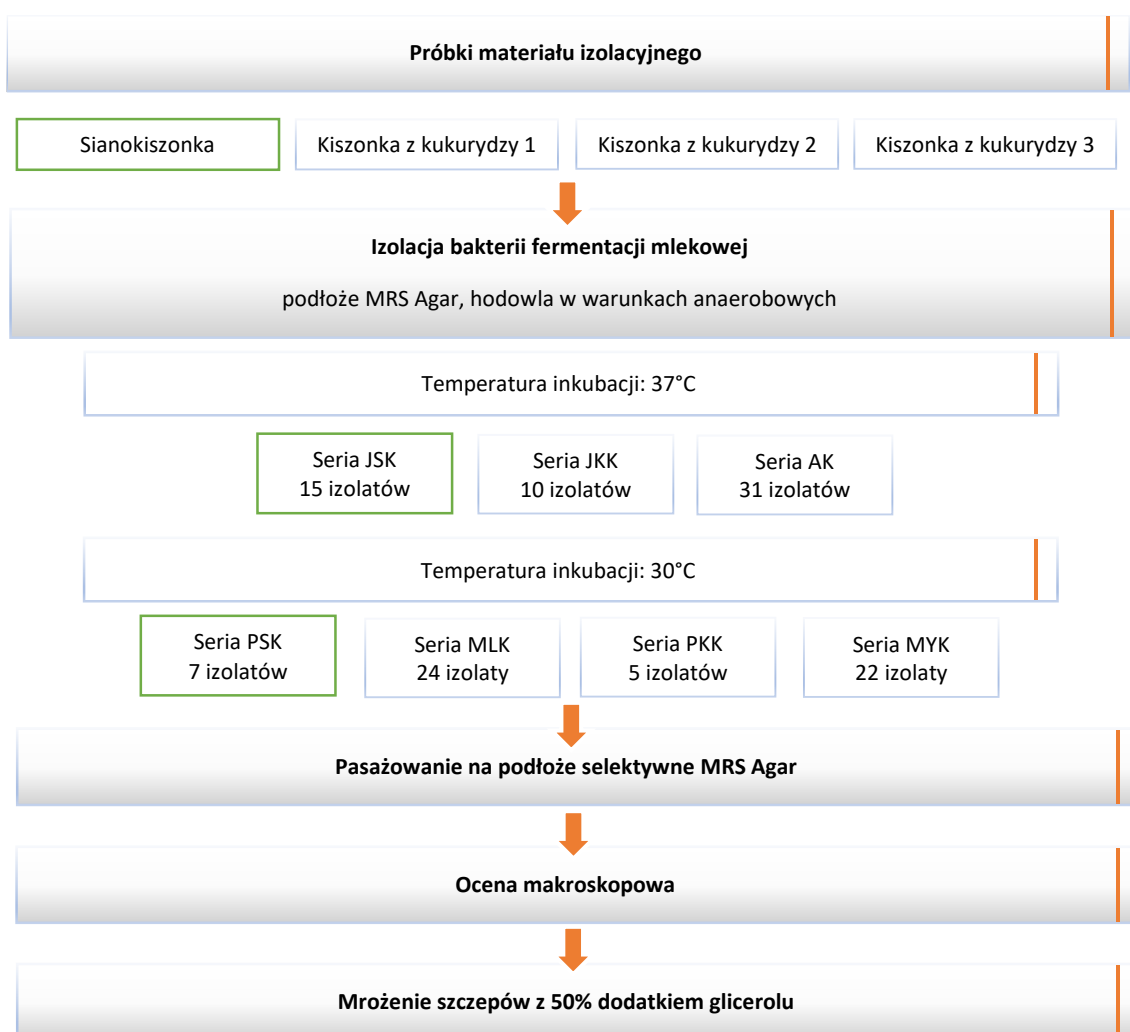
1. Materiał roślinny poddany spontanicznej fermentacji może być cennym źródłem bakterii fermentacji mlekowej, wykazujących działanie fungistatyczne i zdolność do wiązania lub degradacji mykotoksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.
2. Stopień redukcji mykotoksyn przez bakterie fermentacji mlekowej w warunkach *in vitro* jest zależny od czynników środowiskowych.
3. Bakterie fermentacji mlekowej mogą ograniczać biodostępność mykotoksyn fuzaryjnych w warunkach symulujących przewód pokarmowy zwierząt monogastrycznych.
4. Wykorzystanie odpowiednio dobranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej do produkcji kiszonek może wpływać na ich jakość mikrobiologiczną.
5. Odpowiedni dobór warunków hodowli bakterii fermentacji mlekowej może wpływać na ich właściwości fungistatyczne.

### **4.2. Zakres pracy**

Prezentowana rozprawa doktorska dotyczyła oceny aktywności biologicznej szczepów bakterii fermentacji mlekowej, wykazujących właściwości ograniczające występowanie grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych oraz możliwości ich praktycznego zastosowania. Doświadczenia zrealizowane w ramach prezentowanej rozprawy podzielono na pięć głównych etapów.

Pierwszy etap pracy doktorskiej obejmował izolację bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych poddanych spontanicznej fermentacji (rysunek 1). Z materiału badawczego stanowiącego 1 próbkę sianokiszonki i 3 próbki kiszonki z kukurydzy wyizolowano 114 czystych kultur mikroorganizmów. Do izolacji zastosowano podłoże

selektywne MRS Agar przeznaczone dla grupy bakterii fermentacji mlekowej. Izolacja prowadzona była zarówno w temperaturze 30 jak i 37°C w warunkach anaerobowych. Zarówno temperatura 30 jak i 37°C są podawane w literaturze jako optymalne warunki do hodowli bakterii fermentacji mlekowej, a ponadto sugeruje się, że zróżnicowanie warunków temperaturowych hodowli może wpływać na właściwości antagonistyczne izolowanych bakterii. Uzyskane kultury bakterii zamrożono w podłożu z dodatkiem glicerolu w celu długoterminowego przechowywania.

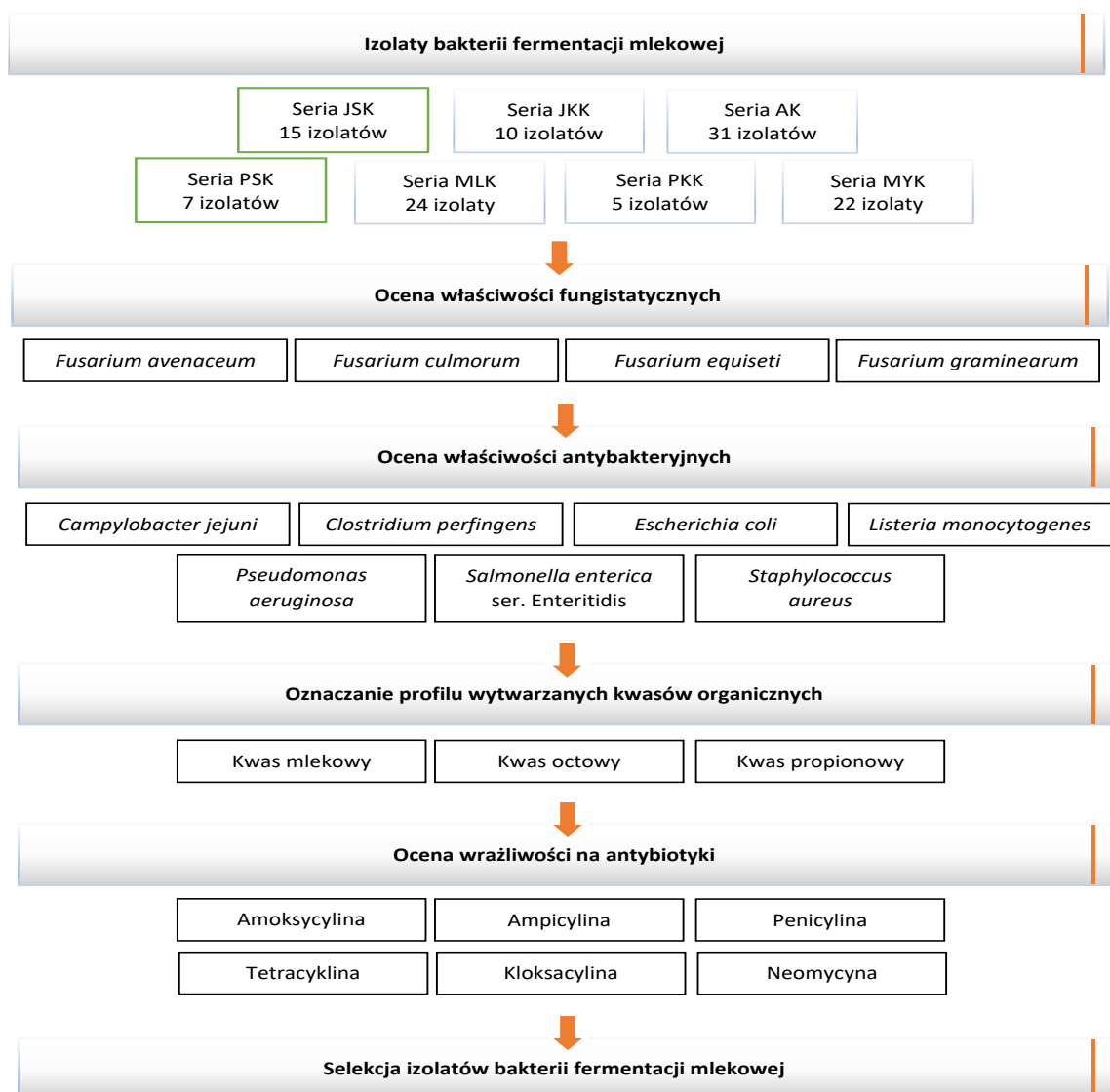


Rysunek 1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych - Etap 1

Źródło: opracowanie własne

Drugi etap badań dotyczył selekcji izolatów bakterii fermentacji mlekowej w oparciu o określone właściwości biochemiczno-mikrobiologiczne (rysunek 2). Główne kryterium selekcji stanowiła aktywność fungistatyczna badanych izolatów bakterii, określana wobec czterech gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium*. Dodatkowym kryterium była aktywność

przeciwdrobnoustrojowa badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego wobec wybranych mikroorganizmów wskaźnikowych. Następnie przeprowadzono analizę HPLC (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*) w celu określenia profilu ważniejszych kwasów organicznych. Uwzględniając możliwość praktycznego wykorzystania wyizolowanych drobnoustrojów w żywieniu zwierząt, przebadano również wrażliwość badanych izolatów bakterii na wybrane antybiotyki jako czynnik warunkujący ich bezpieczne zastosowanie. Drugi etap badań zakończono wyselekcjonowaniem izolatów bakterii fermentacji mlekowej charakteryzujących się najszerszym zakresem aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz wykazujących wrażliwość na badane antybiotyki.

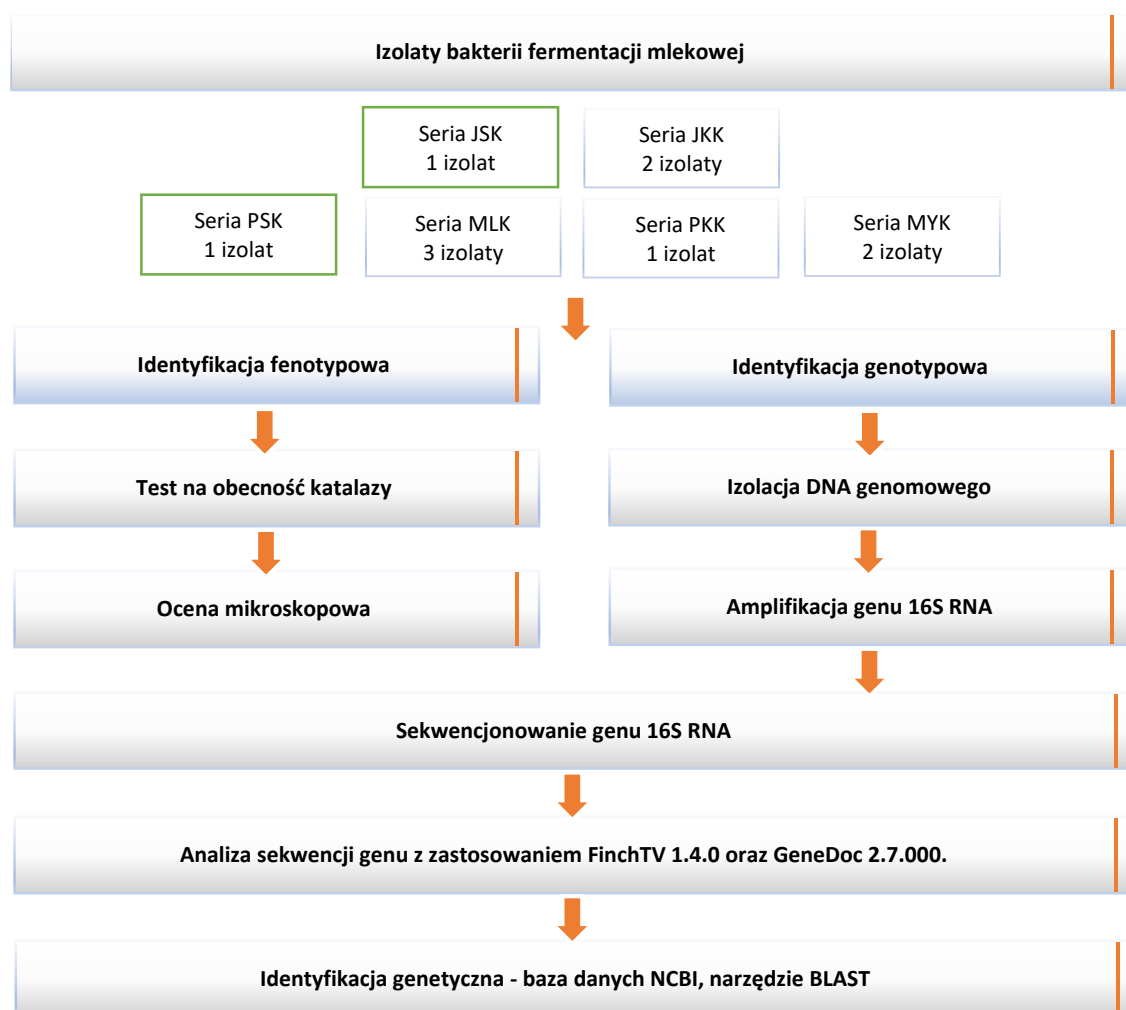


Rysunek 2. Selekcja izolatów bakterii fermentacji mlekowej na podstawie wybranych właściwości - Etap 2

Źródło: opracowanie własne



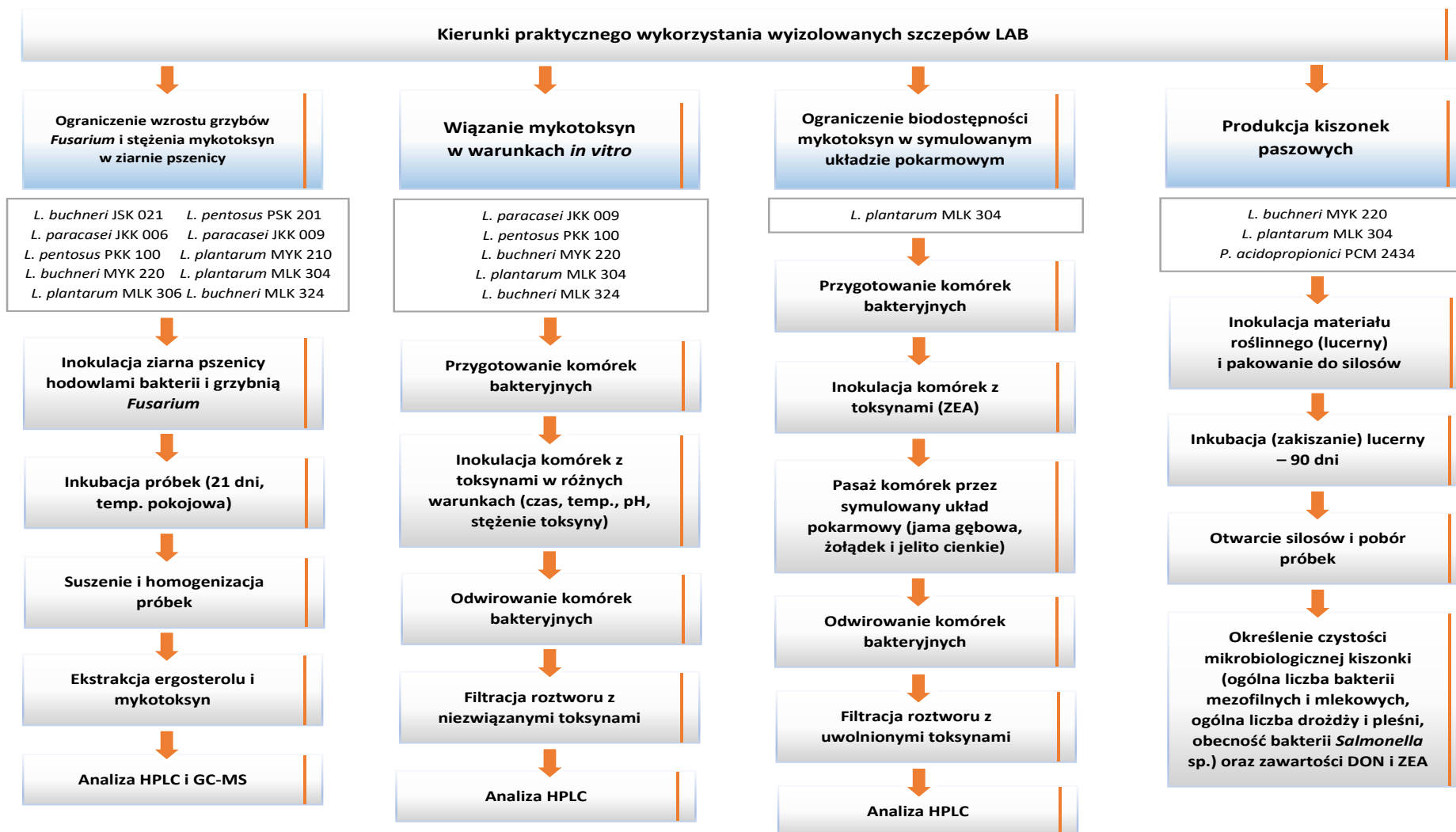
W trzecim etapie doświadczeń dla 10 wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono charakterystykę fenotypową, obejmującą ocenę mikroskopową i określenie zdolności do wytwarzania enzymu katalazy, oraz identyfikację genetyczną (rysunek 3). W tym celu dokonano izolacji DNA genomowego badanych bakterii, potwierdzając wynik izolacji poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Następnie przeprowadzono PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) z odpowiednio dobranymi starterami celem amplifikacji genu 16S rRNA i potwierdzono wynik reakcji metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Zamplifikowany fragment genu o wielkości 1500 pz przekazano do sekwencjonowania genu 16S rRNA. Otrzymane sekwencje badanych izolatów zanalizowano w programach GeneDoc 2.7.000 oraz FinchTV 1.4.0, a następnie porównano z bazą danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI) przy użyciu narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*). Finalnie uzyskano informację o przynależności gatunkowej badanych izolatów bakterii.



Rysunek 3. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej - Etap 3

Źródło: opracowanie własne

Etap czwarty stanowiło określenie zdolności wyselekcjonowanych szczepów do hamowania wzrostu grzybów strzępkowych i redukcji zawartości mykotoksyn w warunkach modelowych. Zaproponowano cztery możliwe rozwiązania, w tym wykorzystanie wyizolowanych mikroorganizmów do ograniczenia rozwoju grzybów z rodzaju *Fusarium* i wytwarzania mykotoksyn w ziarnie pszenicy poddanym inokulacji hodowlami bakterii LAB, w materiale roślinnym poddawany fermentacji oraz wiązanie i/lub degradację wybranych mykotoksyn fuzaryjnych w warunkach *in vitro*, jak również w symulowanym układzie pokarmowym. Do inokulacji ziarna pszenicy wykorzystano 10 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wybranych na podstawie przeprowadzonej wcześniej selekcji. Próbki ziarna pszenicy po inokulacji bakteriami LAB zaszczipiono krążkami hodowli grzybów: *F. culmorum* i *F. graminearum*. Po 3 tygodniach inkubacji dokonano oznaczeń zawartości ergosterolu oraz zearalenonu i trichotecenów z grupy B metodą HPLC. Spośród 10 izolatów wybrano 5 mikroorganizmów, które przebadano pod kątem ich zdolności do wiązania i/lub degradacji mykotoksyn w zróżnicowanych warunkach inkubacji tak, by określić jednocześnie ich wpływ na efektywność tego procesu. Jeden z izolatów wykorzystano następnie do określenia możliwości ograniczenia biodostępności w symulowanym przewodzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych. Ostatnią z możliwości zastosowania wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej było przygotowanie kiszonki paszowej na bazie lucerny, wykorzystując je jako kultury starterowe. Po 3 miesiącach przeprowadzono ocenę mikrobiologicznej jakości otrzymanych kiszonek uwzględniając liczbę i rodzaj grzybów strzępkowych oraz zawartość ważniejszych mykotoksyn fuzaryjnych.



Rysunek 4. Określenie kierunku praktycznego zastosowania wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej - Etap 4

Źródło: opracowanie własne

Biorąc pod uwagę praktyczne zastosowanie wyselekcjonowanych mikroorganizmów, ukierunkowane przede wszystkim na ograniczenie występowania grzybów z rodzaju *Fusarium*, w ostatnim etapie pracy podjęto działania zmierzające do zwiększenia aktywności fungistatycznej wybranych izolatów na drodze optymalizacji warunków hodowli. Dodatkowo, w procesie optymalizacji podłoża uwzględniono obniżenie kosztów hodowli poprzez zastosowanie pożywek bazujących na tanich surowcach, w tym produktach odpadowych czy ubocznych z przemysłu spożywczego.



Rysunek 5. Optymalizacja składu podłoża w kierunku zintensyfikowania właściwości fungistatycznych badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego – Etap 5

Źródło: opracowanie własne

## Materiały i metodyka badawcza

### 5. Materiały

#### 5.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły cztery kiszonki paszowe poddane spontanicznej fermentacji, co oznacza, że w procesie fermentacji uczestniczyła wyłącznie mikrobiota epifityczna. Do izolacji bakterii fermentacji mlekowej wykorzystano jedną sianokiszonkę oraz trzy kiszonki z kukurydzy (kiszonka z kukurydzy 1, 2 i 3). Sianokiszonkę oraz kiszonkę z kukurydzy 1 otrzymano od firmy JHJ Sp. z o. o., natomiast kiszonki z kukurydzy 2 oraz 3 otrzymano z Katedry Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

#### 5.2. Przedmiot badań

Przedmiot badań stanowiło 114 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z materiału roślinnego poddanego spontanicznej fermentacji (według opisu w punkcie 6.1).

#### 5.3. Mikroorganizmy wskaźnikowe

Aktywność przeciwdrobnoustrojową izolatów bakterii fermentacji mlekowej określano wobec wybranych grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* oraz wybranych bakterii gramdodatnich i gramujemnych. Pochodzenie szczepów wskaźnikowych oraz warunki ich hodowli przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Wykaz bakterii wskaźnikowych wraz z warunkami ich inkubacji i zastosowanym podłożem agarowym.

L.p.	Szczep	Oznakowanie/ Pochodzenie	Temperatura inkubacji	Atmosfera inkubacji	Podłoże mikrobiologiczne
<b>Grzyby strzępkowe</b>					
1.	<i>Fusarium graminearum</i>	Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu	20°C±1°C	tlenowa	PDA
2.	<i>Fusarium culmorum</i>		20°C±1°C	tlenowa	PDA
3.	<i>Fusarium avenaceum</i>		20°C±1°C	tlenowa	PDA
4.	<i>Fusarium equiseti</i>		20°C±1°C	tlenowa	PDA
<b>Bakterie gramdodatnie</b>					
5.	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC® 13124™	37°C	beztlenowa	TSA z krwią
6.	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19115™	37°C	tlenowa	BHI
7.	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 33862™	37°C	tlenowa	PCA

L.p.	Szczep	Oznakowanie/ Pochodzenie	Temperatura inkubacji	Atmosfera inkubacji	Podłoże mikrobiologiczne
<b>Bakterie gramujemne</b>					
8.	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC® 33291™	37°C	względnie beztlenowa	TSA
9.	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739™	37°C	tlenowa	PCA
10.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 9027™	37°C	tlenowa	PCA
11.	<i>Salmonella enterica</i> ser. Enteritidis	ATCC® 13076™	37°C	tlenowa	BHI

Źródło: opracowanie własne

Wszystkie mikroorganizmy wskaźnikowe, w trakcie prowadzenia doświadczeń, przechowywane były w warunkach chłodniczych (temperatura 4°C), na podłożu płynnym (bakterie) lub stałym (grzyby strzępkowe) odpowiednim dla optymalnego wzrostu (tabela 7). Wykorzystane bakterie wskaźnikowe długookresowo przechowywane były na podłożu płynnym z dodatkiem sterylnego, 80% glicerolu, w stosunku 1:1 w temperaturze -20°C.

#### 5.4. Podłoża

Podłoża mikrobiologiczne wykorzystane w doświadczeniach laboratoryjnych stanowiły zarówno dostępne na rynku gotowe pożywki (w postaci suchego proszku), jak i pożywki przygotowywane samodzielnie na podstawie danych literaturowych.

##### 5.4.1. Izolacja i namnażanie bakterii fermentacji mlekowej

Do izolacji i namnażania bakterii fermentacji mlekowej, stanowiących materiał testowy, wykorzystano podłoże **MRS** (de Man, Rogosa i Sharpe) firmy Biocorp Polska Sp. z o.o. w postaci bulionowej (nr kat. PS 60), pH 6,2 ± 0,2, oraz agarowej, (nr kat. PS 59), pH 6,5 ± 0,2. Pożywki przygotowywano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta i sterylizowano w autoklawie w 121°C przez 20 minut.

##### 5.4.2. Podłoża do namnażania i oznaczeń z wykorzystaniem mikroorganizmów wskaźnikowych

Zależnie od wymagań wzrostowych poszczególnych mikroorganizmów wskaźnikowych (tabela 7) wykorzystano następujące, gotowe podłoża mikrobiologiczne firmy Biocorp Polska Sp. z o. o. oraz BioShop Canada Inc.:

- **Bulion odżywczy** (Nutrient Broth) (nr kat. PS 90), pH 6,9 ± 0,2.

- **Agar odżywczy z glukozą** (Plate Count Agar - PCA), (nr kat. PS 37), pH  $7,0 \pm 0,2$ .
- **Bulion mózgowo-sercowy** (Brain Heart Infusion Broth), (nr kat. PS 04), pH  $7,4 \pm 0,2$ .
- **Agar mózgowo-sercowy** (Brain Heart Infusion Agar - BHI), (nr kat. PS 03), pH  $7,4 \pm 0,2$ .
- **Bulion tryptozowo-sojowy** (Trypticasein Soy Broth - TSB), (nr kat. PS 23), pH  $7,3 \pm 0,2$ .
- **Agar tryptozowo-sojowy** (Trypticasein Soy Agar - TSA), (nr kat. PS 37), pH  $7,3 \pm 0,2$ .
- **Agar tryptozowo-sojowy wzbogacony 5% dodatkiem odwłóknionej krwi baraniej** (TSA wzbogacone), pH  $7,3 \pm 0,2$  podłoże przygotowano poprzez dodanie odwłóknionej krwi baraniej w ilości  $10 \text{ cm}^3$  na każde  $200 \text{ cm}^3$  wysterylizowanej i schłodzonej pożywki.
- **Agar glukozowo – ziemniaczany** (Potato Dextrose Agar – PDA), (nr kat. PDA 501.500), pH  $5,6 \pm 0,2$ .

Pożywki przygotowywane były zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta i sterylizowane w autoklawie w  $121^\circ\text{C}$  przez 20 minut.

### **5.4.3. Optymalizacja składu podłoża w kierunku wzmocnienia aktywności fungistatycznej bakterii fermentacji mlekowej**

Podłoża do optymalizacji właściwości fungistatycznych wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej przygotowano na podstawie Toplaghaltsyan, Bazukyan i Trchounian (2017). Łącznie przygotowano 21 wariantów pożywek, różniących się między sobą źródłem związków azotowych (Pepton/Trypton + ekstrakt mięsny, serwatka, ekstrakt odpadowy po produkcji melasy), jak również rodzajem i proporcją podstawowego źródła węgla (glukoza, glicerol, octan sodu).

#### **1) Pożywka na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu:**

Skład: Trypton: 10 g/l; ekstrakt mięsny: 10 g/l; ekstrakt drożdżowy: 5 g/l; cytrynian amonowy: 2 g/l; Tween 80: 1 ml/l;  $\text{MgSO}_4$ : 0,05 g/l; źródło węgla:

- TM1: Glukoza: 20 g/l
- TM2: Glicerol: 20 g/l
- TM3: Octan sodu: 20 g/l
- TM4: Glukoza: 10 g/l; octan sodu: 10 g/l
- TM5: Glicerol: 10 g/l; octan sodu: 10 g/l
- TM6: Glukoza: 10 g/l; glycerol: 10 g/l
- TM7: Glukoza: 6,67 g/l; glycerol: 6,67 g/l; octan sodu: 6,67 g/l

Podłoża rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w autoklawie w 121°C przez 20 minut.

## **2) Pożywka na bazie serwatki**

Skład: Serwatka: 20 g/l; ekstrakt drożdżowy: 5 g/l; cytrynian amonowy: 2 g/l; Tween 80: 1 ml/l; MgSO<sub>4</sub>: 0,05 g/l; źródło węgla:

- S1: Glukoza: 20 g/l
- S2: Glicerol: 20 g/l
- S3: Octan sodu: 20 g/l
- S4: Glukoza: 10 g/l; octan sodu: 10 g/l
- S5: Glicerol: 10 g/l; octan sodu: 10 g/l
- S6: Glukoza: 10 g/l; glycerol: 10 g/l
- S7: Glukoza: 6,67 g/l; glycerol: 6,67 g/l; octan sodu: 6,67 g/l

Podłoża rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w autoklawie w 117°C przez 20 minut.

## **3) Pożywka na bazie odpadowego ekstraktu roślinnego po produkcji melasy**

Skład: Ekstrakt roślinny: 20 g/l; ekstrakt drożdżowy: 5 g/l; cytrynian amonowy: 2 g/l; Tween 80: 1 ml/l; MgSO<sub>4</sub>: 0,05 g/l; źródło węgla:

- ER1: Glukoza: 20 g/l
- ER2: Glicerol: 20 g/l
- ER3: Octan sodu: 20 g/l
- ER4: Glukoza: 10 g/l; octan sodu: 10 g/l
- ER5: Glicerol: 10 g/l; octan sodu: 10 g/l
- ER6: Glukoza: 10 g/l; glycerol: 10 g/l
- ER7: Glukoza: 6,67 g/l; glycerol: 6,67 g/l; octan sodu: 6,67 g/l

Podłoża rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w autoklawie w 117°C przez 20 minut.



#### 5.4.4. Podłoża wykorzystane do oznaczenia podstawowej jakości mikrobiologicznej kiszonki z lucerny

Zależnie od kierunku przeprowadzonych oznaczeń wykorzystano następujące, gotowe podłoża mikrobiologiczne firmy Biocorp Polska Sp. z o. o. oraz BioShop Canada Inc.:

- Agar MRS (de Man, Rogosa i Sharpe), (nr kat. PS 59), pH  $6,5 \pm 0,2$  – do oznaczenia ogólnej liczby bakterii fermentacji mlekowej
- Agar odżywczy z glukozą (Plate Count Agar - PCA), (nr kat. PS 37), pH  $7,0 \pm 0,2$  – do oznaczenia ogólnej liczby bakterii tlenowych mezofilnych
- Agar Sabouraud z chloramfenikolem, (nr kat. BR07), pH  $5,6 \pm 0,2$  – do oznaczenia ogólnej liczby drożdży i grzybów strzępkowych
- Brilliance™ Salmonella Agar Base, (nr kat. CM1092), pH  $7,3 \pm 0,1$  – podłoże chromogenne do oznaczania obecności bakterii z rodzaju *Salmonella*

Podłoża rozpuszczano w wodzie destylowanej i sterylizowano w autoklawie w  $121^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut.

#### 5.5. Krążki antybiotykowe

Wrażliwość badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego na antybiotyki oszacowano przy wykorzystaniu metody antybiogramów. Wybór antybiotyków w celu przeprowadzenia oznaczeń opierał się na podstawie przeglądu stosowanych substancji czynnych w lekach dla zwierząt hodowlanych. W badaniach zastosowano komercyjne krążki antybiotykowe firmy Oxoid Ltd. (Wielka Brytania). Wykaz zastosowanych antybiotyków przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wykaz antybiotyków zastosowanych w doświadczeniu

L.p.	Antybiotyk	Podział ze względu na budowę chemiczną	Stężenie [mcg]	Skrót
1.	Amoksycylina	B-laktamy	25	AML
2.	Ampicylina	B-laktamy	10	AMP
3.	Penicylina	B-laktamy	1,5	P
4.	Kloksacylina	B-laktamy	5	OB
5.	Tetracyklina	tetracykliny	30	T
6.	Neomycyna	aminoglikozydy	15	N

Źródło: opracowanie własne

## 5.6. Odczynniki

W celu przygotowania podłoży mikrobiologicznych, buforów oraz roztworów, wykorzystywanych w doświadczeniach, zastosowano następujące odczynniki:

### Odczynniki do podłoży mikrobiologicznych:

- agar Technical Grade (nr kat. AGR002.500), Tween 80 (nr kat. TWN 507.1), ekstrakt drożdżowy (nr kat. YEX 401.500) – **Bioshop Canada Inc.** (Kanada)
- sodu chlorek (WE:231-598-3), glukoza bezw., siarczan magnezu, sodu octan (WE:204-823-8) - **Chempur** (Polska)
- trypton (nr kat. PB02) - **Biocorp Sp. z o.o.** (Polska)
- glicerol bezw. (nr kat. BA3320113) – **POCH S.A.** (Polska)
- serwatka, ekstrakt poprodukcyjny melasy

### Odczynniki do oceny morfologicznej izolatów, Izolacji DNA, PCR i elektroforezy:

- odczynniki do zestawu barwienia Grama - **Biocorp Sp. z o.o.** (Polska)
- zestaw do izolacji DNA z komórek bakterii Genomic Mini AX Bacteria+ (Spin) (nr. kat. 060-100MS) - **A&A Biotechnology** (Polska)
- zestaw do reakcji PCR: PCR Mix Plus HGC nr kat. 2005-100G (skład: Taq DNA polimeraza 0,1U/μl; MgCl<sub>2</sub> 4mM; dNTPs: dATP 0,5 mM, dCTP 0,5 mM, dGTP 0,5 mM, dTTP 0,5 mM; PCR bufor, czynniki podwyższające specyficzność reakcji PCR, stabilizatory, czerwony barwnik, bufor obciążający) - **A&A Biotechnology** (Polska)
- wzorzec długości fragmentów DNA Nova 100bp DNA ladder (nr 01-230614) - **Novazym** (Polska)
- startery do reakcji PCR 1492r i S-D-Bact-0008 - **Future Synthesis** (Polska) oraz **Tib Molbiol Sp. z o.o.** (Polska)
- Agarozza Biotechnology Grade (nr kat. AGA 001.250), Tris Biotechnology Ultra Pure (nr kat. TRS001.1), EDTA Biotechnology Grade (nr kat. EDT 001.1) - **Bioshop Canada Inc.** (Kanada)
- kwas borowy (WE: 233-139-2), nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - **Chempur** (Polska)
- barwnik do żelu MIDORI GREEN (nr kat. MG 04) - **ABO Sp. z o.o.** (Polska)
- alkohol etylowy - **POCH S.A.** (Polska)

**Odczynniki do oszacowania ilości wytwarzanych kwasów organicznych i wiązania toksyn przez badane izolaty oraz metabolitów grzybów *Fusarium* w zakażonym ziarnie pszenicy:**

- wzorce kwasów organicznych (mlekowego, propionowego, octowego,), wzorce mykotoksyn fuzaryjnych (zearalenon, deoksyniwalenol, fuzarenon X, 3-acetylodeoksyniwalenol, 15-acetylodeoksyniwalenol, niwalenol), wzorzec ergosterolu, acetonitryl (99,93%), trimetylosiloloimidazol, trimetylochlorosilan - **Sigma-Aldrich** (Niemcy).
- Bufor fosforanowy (PBS) w tabletkach (nr kat. PBS 404.200) - **Bioshop Canada Inc.** (Kanada)
- Jednoamonowy cytrynian, jednowodny kwas cytrynowy, sodu wodorotlenek, potasu chlorek (KCl) – **Chempur** (Polska)
- Metanol, kwas solny (HCl), pentan – **POCH S.A.** (Polska)
- Tris Biotechnology Ultra Pure (nr kat. TRS001.1) - **Bioshop Canada Inc.** (Kanada)

**Odczynniki do przygotowania symulowanego układu pokarmowego:**

- lipaza, albumina,  $\alpha$ -amylaza, mucyna, kwas moczowy, pankreatyna, sole żółciowe, pepsyna, chlorowódz glukozoaminowy, kwas glukuronowy, tiocyjan potasu (KSCN) - **Sigma-Aldrich** (Niemcy)
- potasu chlorek (KCl), amonu chlorek ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), kwaśny węglan sodowy ( $\text{NaHCO}_3$ ), glukoza bezw., sodu siarczan ( $\text{NaSO}_4$ ), chlorek wapnia dwuwodny ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), chlorek sodu (NaCl), mocznik - **Chempur** (Polska)
- magnezu chlorek ( $\text{MgCl}_2$ ), potasu diwodorofosforan ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sodu diwodorofosforan ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), kwas solny (HCl) - **POCH S.A.** (Polska).

**5.7. Ważniejsze bufony i roztwory**

Wszystkie bufony i roztwory przygotowywano bezpośrednio przed doświadczeniami, w których były wykorzystywane. W sytuacji, gdy konieczne było zastosowanie sterylnych warunków, bufony i roztwory sterylizowano w autoklawie (121°C przez 20 minut).

- **Bufor fosforanowy – PBS**

Bufor PBS stosowano do płukania komórek bakteryjnych, w celu ich oczyszczenia z pozostałości pożywki, jak również do przygotowania roztworów mykotoksyn

w roztworze o pH 7. Bufor przygotowywano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta (1 tabletka/ 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej) i sterylizowano.

- **Bufor o pH 9**

Bufor stosowano do przygotowania roztworów mykotoksyn w roztworze o pH 9, wykorzystując 0,1 M Tris.

Do przygotowania 100 cm<sup>3</sup> 0,1 M buforu Tris o pH 9 wykorzystano:

Tris	1,2 g
Woda destylowana	100 cm <sup>3</sup>

- **Bufor o pH 3**

Bufor cytrynianowy stosowano do przygotowania roztworów mykotoksyn w roztworze o pH 3.

Do przygotowania 100 cm<sup>3</sup> buforu cytrynianowego o pH 3 wykorzystano:

0,1M kwas cytrynowy	82,00 cm <sup>3</sup>
0,1M cytrynian trisodowy	18,00 cm <sup>3</sup>

- **Bufor TBE**

Bufor TBE (89 mM Tris, 89 mM kwasu borowego oraz 1 mM EDTA) stosowano do rozdzielania elektroforetycznego DNA oraz produktów PCR w żelu agarozowym oraz do przygotowania żelu.

Do wykonania 500 cm<sup>3</sup> 5-krotnie stężonego buforu TBE wykorzystano:

Tris	27,00 g
kwas borowy	13,75 g
EDTA	0,925 g
woda destylowana	do 500 cm <sup>3</sup>
pH 8,0–8,3	

W celu otrzymania roztworu roboczego buforu 1 x TBE, bufor rozcieńczano czterokrotnie wodą destylowaną.

- **Roztwór soli fizjologicznej**

Roztwór soli fizjologicznej stosowano do wykonania rozcieńczeń dziesiętnych w analizach ilościowych oraz do przygotowania zawiesin mikroorganizmów

w poszczególnych eksperymentach (właściwości przeciwdrobnoustrojowe, wrażliwość na antybiotyki izolatów).

Do wykonania 1000 cm<sup>3</sup> 0,85% soli fizjologicznej zastosowano:

chlorek sodu	8,50 g
woda destylowana	do 1000 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór acetonitryl:woda**

Roztwór stosowano do ekstrakcji zearalenonu z zakażonego ziarna pszenicy, inokulowanego hodowlami wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej.

Do wykonania 100 cm<sup>3</sup> roztworu wykorzystano:

acetonitryl	90 cm <sup>3</sup>
woda destylowana	10 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór acetonitryl:metanol:woda**

Roztwór stosowano do rozpuszczania wyekstrahowanego zearalenonu z ziarna pszenicy.

Do wykonania 100 cm<sup>3</sup> roztworu wykorzystano:

acetonitryl	70 cm <sup>3</sup>
metanol	20 cm <sup>3</sup>
woda destylowana	10 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór metanol:acetonitryl**

Roztwór stosowano jako fazę ruchomą w rozdziale chromatograficznym ergosterolu, wyekstrahowanego z zakażonego ziarna pszenicy.

Do wykonania 100 cm<sup>3</sup> roztworu wykorzystano:

metanol	90 cm <sup>3</sup>
acetonitryl	10 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór acetonitryl:woda:metanol**

Roztwór stosowano jako fazę ruchomą w rozdziale chromatograficznym zearalenonu.

Do wykonania 100 cm<sup>3</sup> roztworu wykorzystano:

acetonitryl	46 cm <sup>3</sup>
woda destylowana	46 cm <sup>3</sup>
metanol	8 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór trimetylosililoimidazol:trimetylochlorosilan**

Roztwór stosowano do otrzymania trimetylosililowych pochodnych trichotecenów z grupy B (DON, FUS-X, 3-AcDON, 15-AcDON i NIV).

Do wykonania roztworu wykorzystano następujące odczynniki w odpowiedniej proporcji:

trimetylosililoimidazol	100 cm <sup>3</sup>
trimetylochlorosilan	1 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór woda:metanol**

Roztwór stosowano jako fazę ruchomą w rozdziale chromatograficznym deoksywalenolu.

Do wykonania 100 cm<sup>3</sup> roztworu wykorzystano:

woda	70 cm <sup>3</sup>
metanol	30 cm <sup>3</sup>

- **Roztwór podstawowy mykotoksyn fuzaryjnych**

Roztwory wyjściowe mykotoksyn fuzaryjnych (DON i ZEA) rozpuszczano w metanolu, otrzymując finalnie stężenie 1 mg/cm<sup>3</sup>.

- **Roztwory robocze mykotoksyn fuzaryjnych**

Roztwory mykotoksyn (DON i ZEA) stosowano do oszacowania wiązania toksyn przez wybrane izolaty bakterii fermentacji mlekowej. Roztwory przygotowywano zgodnie z tabelą 9, w zależności od założonego wariantu.

**Tabela 9. Ilość poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej, w zależności od wariantu doświadczenia, na 1 cm<sup>3</sup> roztworu**

Wariant		Ilość poszczególnych składników na 1 cm <sup>3</sup> roztworu		
		DON/ZEA*	Metanol	Bufor
<b>Czas i temperatura inkubacji</b>		5 µl	150 µl	845 µl PBS
<b>Stężenie toksyny</b>	1 µg/ml	1 µl	150 µl	845 µl PBS
	5 µg/ml	5 µl	150 µl	845 µl PBS
	10 µg/ml	10 µl	150 µl	845 µl PBS
<b>pH środowiska</b>	pH 3	5 µl	150 µl	845 µl bufor cytrynianowy
	pH 7	5 µl	150 µl	845 µl PBS
	pH 9	5 µl	150 µl	845 µl Tris

\*ilość pobrana z roztworu podstawowego

Źródło: opracowanie własne na podstawie Gwiazdowska, (2014)

- **Roztwory symulujące warunki panujące w układzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych**

Roztwory odwzorowujące poszczególne odcinki układu pokarmowego zwierząt monogastrycznych stosowano do określenia stabilności kompleksu bakteria – mykotoksyna w trakcie trawienia. Roztwory przygotowano na podstawie przepisu opisanego przez Versantvoort i in. (2005). Przepisy na poszczególne roztwory przedstawiono w tabeli 10.

**Tabela 10. Skład poszczególnych roztworów symulujących kolejne odcinki układu pokarmowego zwierząt monogastrycznych**

Roztwór	Ilość poszczególnych składników		Woda destylowana
<b>Ślina</b>	KCl – 0,9 g KSCN – 0,2 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,9 g NaSO <sub>4</sub> – 0,57 g NaHCO <sub>3</sub> – 1,7 g	NaCl – 0,3 g mocznik – 0,2 g α-amylaza – 290 mg kwas moczowy – 15 mg mucyna – 25 mg	1000 cm <sup>3</sup>
<b>Sok żołądkowy</b>	NaCl – 2,75 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,27 g KCl – 0,82 g CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0,4 g NH <sub>4</sub> Cl – 0,31 g HCl (37%) – 6,5 cm <sup>3</sup> glukoza – 0,65 g Mocznik – 0,085 g	kwas glukuronowy – 0,002 g chlorowodorek glukozaminy – 0,33 g g albumina – 1 g pepsyna – 2,5 g mucyna – 3 g	1000 cm <sup>3</sup>
<b>Sok jelitowy</b>	NaCl – 7,01 g NaHCO <sub>3</sub> – 3,39 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0,08 g KCl – 0,56 g MgCl <sub>2</sub> – 0,05 g HCl (37%) – 0,18 cm <sup>3</sup>	mocznik – 0,1 g CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0,2 g albumina – 1 g pankreatyna – 9 g lipaza – 1,5 g	1000 cm <sup>3</sup>
<b>Żółć</b>	NaCl – 5,26 g NaHCO <sub>3</sub> – 5,79 g KCl – 0,38 g HCl (37%) – 0,15 cm <sup>3</sup>	mocznik – 0,25 g CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O – 0,22 g albumina – 1,8 g sól żółciowa – 30 g	1000 cm <sup>3</sup>

Źródło: opracowanie własne na podstawie Versantvoort i in. (2005)

## **6. Metodyka badawcza**

### **6.1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych**

W celu wyizolowania bakterii fermentacji mlekowej z materiału badawczego, kiszonki paszowe odważono w ilości 10 g do sterylnych woreczków Bag Light 400, dodano 90 cm<sup>3</sup> jałowej soli fizjologicznej i poddano procesowi homogenizacji przez 3 minuty przy użyciu stomachera Bag Mixer<sup>®</sup> 400. Z otrzymanych zawiesin wykonano szereg rozcieńczeń dziesiętnych, a następnie posiew metodą zalewową wykorzystując podłoże agarowe MRS. Próbki inkubowano w temperaturze 30 i 37°C, w warunkach względnie beztlenowych, przez 24 – 48 godzin.

#### **6.1.1. Wyodrębnienie czystych kolonii bakterii fermentacji mlekowej**

Po inkubacji wykonano posiewy redukcyjne na podłożu agarowym MRS w celu otrzymania pojedynczych, czystych kultur izolatów. Do posiewów redukcyjnych wybierano kolonie, które wykazywały typowe cechy morfologiczne dla bakterii fermentacji mlekowej. Próbki inkubowano w warunkach względnie beztlenowych przez 24 godziny w temperaturze 30 i 37°C, w zależności od warunków w jakich izolowano bakterie z materiału badawczego.

#### **6.1.2. Namnażanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

Pojedyncze kolonie bakterii, otrzymane z posiewów redukcyjnych, pasażowano na bulionowe podłoże MRS i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 30 i 37°C, w zależności od wymagań temperaturowych danego izolatu. Ostatecznie otrzymano 114 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, które poddano selekcji w oparciu o wybrane właściwości.

#### **6.1.3. Przechowywanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej.**

W celu uniknięcia wtórnego skażenia, jak również potencjalnych mutacji wynikających z częstego przeszczepiania na świeże podłoże, otrzymane izolaty przechowywano w postaci zamrożonej w 80% roztworze glicerolu. W tym celu z 24 godzinnej hodowli pobierano 2 cm<sup>3</sup> zawiesiny bakteryjnej do jałowych probówek eppendorf, a następnie odwirowywano komórki w wirówce mini Spin plus (8000 rpm/min, 5 minut). Supernatant odrzucano a komórki bakteryjne zawieszano w 0,8 cm<sup>3</sup> pożywki MRS. Następnie zawiesinę bakteryjną przenoszono do krioprobówek, dodawano 0,8 cm<sup>3</sup> jałowego, 80% roztworu glicerolu,



mieszano i zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Hodowle izolatów bakterii fermentacji mlekowej do każdego etapu badawczego namnażano z zamrożonych próbek.

## **6.2. Skrining izolatów bakterii fermentacji mlekowej pod względem wybranych właściwości**

W pierwszym etapie badań określono właściwości przeciwdrobnoustrojowe wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej w celu wybrania izolatów o największym zakresie aktywności. Dodatkowo, dla wybranych szczepów, określono profil kwasów organicznych.

### **6.2.1. Oznaczenie aktywności fungistatycznej wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium***

Zdolność do hamowania lub ograniczania wzrostu wybranych grzybów strzępkowych przez wyizolowane bakterie określano przy wykorzystaniu metody dyfuzji studzienkowej. Z dojrzałych hodowli mikroorganizmów wskaźnikowych pobrano grzybnię powierzchniową, zawieszono w jałowej soli fizjologicznej i dokładnie wytrząsano na vortexie. Z tak przygotowanej zawiesiny z zarodnikami grzyba o gęstości około  $10^4$  jtk/cm<sup>3</sup> wykonano posiew metodą zalewową, a następnie, po zestaleniu podłoża, wycinano studzienki używając jałowego korkoboru o średnicy 10 mm. Do studzienek wprowadzano po 0,1 cm<sup>3</sup> 24 godzinnych hodowli bakterii wyizolowanych z materiału badawczego. Próby inkubowano w temperaturze około  $20^{\circ}\text{C}$  przez 7 dni. Każdą próbę przygotowano w trzech równoległych powtórzeniach. Aktywność fungistatyczną badanych izolatów bakterii określano na podstawie średnicy strefy zahamowania wzrostu grzybów strzępkowych lub wyraźnych zmian w wyglądzie grzybni powierzchniowej i wgłębnej. Jako kontrolę zastosowano podłoże bulionowe MRS, na którym hodowano badane bakterie. Dla otrzymanych wyników wyliczono wartość odchylenia standardowego.

### **6.2.2. Oznaczenie aktywności antybakteryjnej wobec wybranych szczepów patogennych**

Właściwości antybakteryjne badanych izolatów oznaczono wobec siedmiu mikroorganizmów patogennych z wykorzystaniem metody dyfuzji studzienkowej. Z 24 godzinnych hodowli mikroorganizmów wskaźnikowych przygotowano zawiesinę w soli fizjologicznej o gęstości optycznej na poziomie 0,5 w skali McFarlanda i wykonano posiew

na płytki Petriego metodą zalewową, stosując odpowiednie podłoże (zgodnie z tabelą 7). Po zestaleniu podłoża, z wykonanych posiewów wycinano studzienki przy użyciu jałowego korkoboru o średnicy 10 mm. Następnie do każdej studzienki wprowadzono 0,1 cm<sup>3</sup> 24 godzinnych hodowli badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Przygotowane próby inkubowano w warunkach optymalnych dla danego mikroorganizmu wskaźnikowego (tabela 7). W przypadku bakterii *Clostridium perfringens* oraz *Campylobacter jejuni*, próby inkubowano w atmosferze beztlenowej w anaerostacie. Każdą próbę wykonano w trzech równoległych powtórzeniach. Aktywność antybakteryjną badanych izolatów określano na podstawie strefy zahamowanego wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych wokół studzienek, uwzględniając średnicę studzienki. Próbę kontrolną stanowiła bulionowa pożywka MRS dodawana w ilości 0,1 cm<sup>3</sup>. Dla otrzymanych wyników obliczono wartość odchylenia standardowego.

### **6.2.3. Określenie ilości wybranych kwasów organicznych wytwarzanych przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej**

Określenie ilości produkowanych kwasów organicznych (mlekowego, octowego oraz propionowego), przez badane izolaty na podłożu MRS, przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Próbki 24 godzinnych hodowli przenoszono w ilości 2 cm<sup>3</sup> do jałowych probówek wirówkowych typu eppendorf i odwirowywano w wirówce Centrifuge 5804R, Eppendorf AG (10 000 rpm/min, 10 minut). Supernatanty zlewano znad osadu i przesączano przez filtry Millex®-LCR 0,22 µm (Millipore) do jałowych probówek wirówkowych typu eppendorf.

Oznaczenie ilości kwasów organicznych przeprowadzono na chromatografii cieczowym 2695 Waters sprzężonym z detektorem refraktometrycznym 2414 Refractive Index (RI) detector (Waters, Milford, MA, USA). Do oznaczeń użyto kolumny Animex HPX-87H 300 x 7,8 mm (BIO-RAD). Eluent stanowił 0,004 M roztwór H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, przy przepływie 0,75 cm<sup>3</sup>/min. Jako standardy zastosowano roztwory kwasów organicznych: mlekowego, octowego i propionowego (stężenie 0,1 µg/µl). Analizę prowadzono w temperaturze 65°C. Poszczególne kwasy organiczne identyfikowano korzystając z metody standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików. Oznaczenia wykonywane zostały w trzech równoległych powtórzeniach.

#### 6.2.4. Oznaczanie wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki

Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki określono przy użyciu metody dyfuzji krążkowej z zastosowaniem komercyjnych krążków antybiotykowych (Torshizi i in., 2008; Petsuriyawong i Khunajakr, 2011; Pérez-Sánchez i in., 2011). Badanie przeprowadzono dla izolatów wyselekcjonowanych na podstawie wcześniejszych oznaczeń (punkty 7.2.1 oraz 7.2.2)

Ze świeżych (24 godzinnych) hodowli izolatów bakterii kwasu mlekowego przygotowano inokulaty w jałowej soli fizjologicznej o gęstości optycznej 1,0 w skali McFarlanda. Zawiesiny bakteryjne rozlano (1 cm<sup>3</sup>) na sterylne płytki Petriego (Ø 9 cm) i wysiano stosując metodę zalewową, wykorzystując podłoże agarowe MRS. Następnie, po zastygnięciu podłoża, nałożono krążki antybiotykowe. Przygotowane próbki poddano 24 godzinnej inkubacji w warunkach względnie beztlenowych w temperaturze 37°C. Oznaczenia wykonano w trzech równoległych powtórzeniach.

Po inkubacji oszacowano oddziaływanie wybranych antybiotyków na wzrost izolatów bakterii fermentacji mlekowej, mierząc średnicę przejaśnień wokół krążków z uwzględnieniem ich wielkości (6 mm). Na podstawie stref zahamowanego wzrostu określono wrażliwość badanych izolatów na wybrane antybiotyki, którą wyrażono w trzystopniowej skali: izolaty wrażliwe (S – ang. *susceptibility*), izolaty średnio wrażliwe (I – ang. *intermediate susceptibility*) oraz izolaty odporne (R – ang. *resistance*). Wartości graniczne (tabela 11), warunkujące wrażliwość lub oporność badanych izolatów, opracowano na podstawie Charteris, Kelly, Morelli i Collins (1998), Vlková, Rada, Popelářová, Trojanová i Killer. (2006) oraz Han i in. (2015), jak również na podstawie analizy otrzymanych wyników.

**Tabela 11. Wartości graniczne określające stopień wrażliwości badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego na poszczególne antybiotyki**

L.p.	Antybiotyk	Skrót	Stężenie [mcg]	Średnica zahamowania wzrostu (mm)		
				Oporny izolat - R	Średnio wrażliwy izolat - I	Wrażliwy izolat - S
1.	ampicylina	AMP	10	≤21,99	22,00-28,99	≥29,00
2.	amoksycylina	AML	25	≤18,99	19,00-20,99	≥21,00
3.	penicilina	P	1,5	≤13,99	14,00-17,99	≥18,00
4.	tetracyklina	TE	30	≤14,99	15,00-17,99	≥18,00
5.	kloksacylina	OB	5	≤13,99	14,00-17,99	≥18,00
6.	neomycyna	N	15	≤13,99	14,00 - 17,99	≥18,00

Źródło: opracowanie własne na podstawie Charteris i in. (1998), Vlková i in. (2006) i Han i in. (2015)

### **6.3. Identyfikacja wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego**

#### **6.3.1. Identyfikacja fenotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

##### **Określenie zdolności do wytwarzania katalazy**

Zdolność wybranych izolatów do wytwarzania enzymu katalazy oszacowano wykorzystując 3% roztwór nadtlenu wodoru. Na szkiełko zegarkowe, z niewielką ilością 3% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nanoszono kilka kropli 24 godzinnej hodowli badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego i obserwowano zachodzące zmiany. Ewentualną obecność (lub brak) enzymu katalazy stwierdzano na podstawie pienienia się roztworu (lub brak widocznego wydzielania tlenu). Jako kontrolę pozytywną zastosowano hodowlę bakterii *Staphylococcus aureus*, którego cechą charakterystyczną jest obecność enzymu katalazy.

##### **Ocena mikroskopowa**

Hodowle wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej rozcieńczono w soli fizjologicznej, a następnie wysiano przy użyciu metody zalewowej w celu otrzymania pojedynczych kolonii z każdej hodowli. Z otrzymanych kolonii bakteryjnych przygotowano preparaty mikroskopowe, które zabarwiono stosując metodę Grama. Kształt, ułożenie oraz barwę komórek izolatów bakterii kwasu mlekowego określono na podstawie obserwacji preparatów przy użyciu mikroskopu Leica DM 1000 LED, przy powiększeniu 1500 razy.

#### **6.3.2. Identyfikacja genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

Identyfikację genetyczną wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego przeprowadzono na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA. Do wykonania pełnej identyfikacji konieczne było wykonanie izolacji materiału genetycznego z izolatów bakteryjnych, a następnie amplifikacja genu 16S rRNA za pomocą PCR oraz sekwencjonowanie i analiza uzyskanych sekwencji.

##### **Izolacja genomowego DNA izolatów**

Izolację genomowego DNA wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego wykonano wykorzystując zestaw **Genomic Mini AX Bacteria+ Spin** (nr. katalogowy 060-100MS) firmy A&A Biotechnology, dedykowany do izolacji DNA bakterii gramdodatnich. Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta wraz z produktem.

Odwirowano 1 cm<sup>3</sup> 24 godzinnych hodowli izolatów bakterii kwasu mlekowego w 2 cm<sup>3</sup> probówkach typu eppendorf przez 5 minut, przy 8000 x g. Supernatant odrzucono, a pozostały osad bakteryjny zawieszono w 100 µl buforu BS, po czym dodano 20 µl lizozymu oraz 5 µl mutanolizyny. Całość wymieszano i inkubowano w temp. 50°C przez 20 minut w termobloku.

Po inkubacji dodano 400 µl buforu lizującego LSU oraz 20 µl roztworu Proteiny K. Całość wymieszano i inkubowano w temp. 50°C 10 minut w termobloku. W trakcie inkubacji próbki kilkakrotnie wortexowano. Po czasie inkubacji, celem całkowitego usunięcia RNA, do próbek dodano 2 µl RNA-zy (10 mg/ml), całość wymieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej.

Po inkubacji próbki intensywnie wortexowano przez 2 minuty (kluczowy etap wydajności izolacji DNA)

Kolejno próbki odwirowano (10 sekund przy 8000 x g), w celu osadzenia na dnie pozostałości niezliwowanego materiału.

Po zwirowaniu próbki naniesiono na kolumny Mini AX Spin znajdujące się w 2 cm<sup>3</sup> probówce i odwirowywano przez 60 sekund przy 8000 x g.

Następnie kolumny Mini AX Spin umieszczono w nowych 2 cm<sup>3</sup> probówkach i nanoszono na ich powierzchnię 600 µl roztworu płuczącego W1, po czym próbki wirowano (60 sekund przy 8000 x g)

Po zwirowaniu kolumny Mini AX Spin ponownie umieszczano w nowych 2 cm<sup>3</sup> probówkach, na powierzchnię naniesiono po 500 µl roztworu płuczącego W2 i zwirowano (60 s przy 8000 x g).

Kolumny Mini AX Spin przeniesiono do nowych probówek (2 cm<sup>3</sup>), zawierających 5 µl buforu zobojętniającego N. Następnie na powierzchni kolumnienek naniesiono 75 µl buforu elucyjnego E i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej.

Po inkubacji próbki zwirowano (60 sekund przy 8000 x g), po czym ponownie naniesiono na kolumny Mini AX Spin po 75 µl buforu elucyjnego E i zwirowano przez 60 sekund przy 8000 x g.

Kolumny Mini AX Spin usunięto i zamknięto probówki z wyizolowanym materiałem genetycznym. Probki DNA przez dalszą analizą przechowywano w temperaturze 4°C, natomiast długookresowo próbki przechowywano w temperaturze -20°C.

#### **Rysunek 6. Etapy izolacji DNA z komórek izolatów bakterii kwasu mlekowego**

Źródło: opracowane własne na podstawie protokołu dołączonego przez producenta (A&A Biotechnology)

#### **Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)**

Amplifikację fragmentu genu 16S rRNA przeprowadzono przy wykorzystaniu starterów 1492r oraz S-D-Bact-0008 (Leser i in., 2002; Pang i in., 2011), które są komplementarne do sekwencji docelowej (tabela 12). Startery rozpuszczano w ultraczystej wodzie zgodnie z zaleceniami producenta.

**Tabela 12. Charakterystyka starterów wykorzystanych do reakcji PCR**

Starter	Sekwencja (5' → 3')	Długość startera (pz)	Wielkość produktu PCR (pz)
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT	19	1500
S-D-Bact-0008	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	

pz – par zasad

Źródło: opracowanie własne na podstawie danych producenta

Dla każdej próbki DNA, wyizolowanego z wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego, przeprowadzono reakcję PCR w celu amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA. Mieszaninę reakcyjną (w ilości 25 µl) przygotowano w jałowych probówkach typu eppendorf o pojemności 200 µl, z wykorzystaniem gotowej mieszanki reakcyjnej **PCR Mix Plus HGC** (A&A Biotechnology). Sporządzając mieszaniny PCR sugerowano się protokołem przygotowania próbek do analizy dołączonym przez producenta:

mieszanina PCR Mix Plus HGC	12,5 µl
starter 1492r	1 µl
starter SD-Bact008	1 µl
matryca (DNA)	1 µl
woda	do 25 µl

Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystano termocykler Biometra. Doświadczenie wykonano bezpośrednio po przygotowaniu mieszanin reakcyjnych. Szczegółowe parametry PCR zostały przedstawione w tabeli 13.

**Tabela 13. Program PCR ustawiony do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA**

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	95°C	3 minuty
Wiązanie starterów	45°C	30 sekund
Elongacja	78°C	2 minuty
Denaturacja	94°C	30 sekund
Wiązanie starterów	45°C	30 sekund
Elongacja	72°C	2 minuty
Denaturacja	95°C	30 sekund
Wiązanie starterów	45°C	30 sekund
Elongacja	72°C	7 minut

} × 30

Źródło: opracowanie własne na podstawie protokołu Genesisius Sp. z o.o.

### **Analiza elektroforetyczna DNA i produktów PCR**

Efektywność izolacji materiału genetycznego oraz amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA oszacowano poprzez elektroforetyczny rozdział otrzymanych produktów. Elektroforezę przeprowadzono w 1 % żelu agarozowym, z domieszką barwnika MIDORI GREEN, w 1× stężonym buforze TBE przy napięciu 5 V/cm przez 45 – 60 minut. Rozdzielone produkty kwasów nukleinowych porównywano z markerem wielkości DNA (Nova 100bp DNA lader – Novazym) o długości w zakresie 100 – 1500 par zasad. Analizowane próbki DNA oraz produkty PCR obserwowano w świetle UV.

#### **6.3.3. Sekwencjonowanie zamplifikowanego fragmentu genu 16S rRNA**

Produkty otrzymane w wyniku reakcji PCR przekazane zostały do Pracowni Techniki Biologii Molekularnej, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w celu ich zsekwencjonowania. Uzyskane sekwencje przeanalizowano w programie Finch TV 1.4.0, a następnie połączono w programie GeneDoc 2.7.000. Finalne sekwencje porównano z bazą danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI) przy użyciu narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*).

#### **6.4. Możliwości praktycznego zastosowania izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

W celu oszacowania możliwych sposobów praktycznego zastosowania wyizolowanych bakterii przeprowadzono badania w czterech kierunkach – ograniczenie wzrostu i produkcji mykotoksyn przez grzyby *Fusarium* na ziarnie pszenicy, wiązanie mykotoksyn fuzaryjnych przez komórki bakteryjne, ograniczenie biodostępności mykotoksyn w symulowanym układzie pokarmowym oraz zastosowanie badanych izolatów jako kultury starterowe w produkcji kiszonek paszowych.

##### **6.4.1. Ograniczenie wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* i wytwarzania przez nie mykotoksyn w warunkach modelowych**

###### **Przygotowanie próbek**

Aktywność wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej w zakresie ograniczenia ilości mykotoksyn fuzaryjnych w uprawach roślinnych, zbadano wykorzystując metodykę opisaną przez Shi i in. (2014) z pewnymi modyfikacjami. Do kolbek stożkowych odważono po 25 g materiału roślinnego (ziarna pszenicy), dodano odrobinę wody destylowanej i wyjałowiono

w autoklawie w 121°C przez 21 minut. Jałowe ziarno inokulowano 5 cm<sup>3</sup> świeżych hodowli bakteryjnych (o gęstości 10 w skali McFarlanda), mieszano i zakażano kilkoma krążkami grzybniami *F. culmorum* i *F. graminearum*. Przygotowane próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 21 dni. Po inkubacji próbki suszono pod dygestorium i homogenizowano.

#### **Ekstrakcja i oznaczanie ergosterolu**

Zhomogenizowany materiał, w ilości 0,1 g, rozpuszczono w 2 cm<sup>3</sup> metanolu, dodano 0,5 cm<sup>3</sup> 2M NaOH i poddano trzykrotnemu mikrofalowaniu (370 W przez 10 sekund). Po ochłodzeniu do próbek dodano 2 cm<sup>3</sup> metanolu i 1 cm<sup>3</sup> 1M HCl. Ergosterol ekstrahowano przy użyciu n-pentanu (3 – 4 cm<sup>3</sup>). Uzyskany ekstrakt (górną fazę roztworu), przenoszono do świeżych fiolek (o pojemności 10 cm<sup>3</sup>) i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Otrzymany ekstrakt rozpuszczono w 1 cm<sup>3</sup> metanolu, przeznaczając do oznaczeń 20 µl roztworu.

Stężenie ergosterolu oznaczano wykorzystując metodę wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Ergosterol rozdzielano na kolumnie Nova Pack C<sub>18</sub> 3,9 × 4 mm przy szybkości przepływu 1 cm<sup>3</sup>/min stosując roztwór metanol:acetonitryl (90:10, v/v) jako fazę ruchomą. Sterol wykrywano wykorzystując aparat Waters 2996 Photodiode Array Detector (Waters Division of Millipore, Milford, MA, USA) ustawionego na 282 nm. Obecność ergosterolu potwierdzano przez porównanie czasu retencji ze standardami zewnętrznymi przy progu wykrywalności 10 ng/g.

#### **Ekstrakcja i oznaczanie zearalenonu**

Materiał roślinny w ilości 5 g homogenizowano przez 3 minuty z dodatkiem 5 cm<sup>3</sup> mieszaniny acetonitryl:woda (90:10, v/v). Zearalenon ekstrahowano na kolumnach Zearala Test (Vicam, Milford, CT, USA) według procedury opisanej przez Goliński i in. (2010). Eluat odparowywano do wysuszenia w temperaturze 40°C w strumieniu azotu. Otrzymany ekstrakt przechowywano w temperaturze -20°C do momentu przeprowadzenia analizy HPLC. Ekstrakty rozpuszczano następnie w 500 cm<sup>3</sup> mieszaniny acetonitryl:metanol:woda (70:20:10, v/v/v), a następnie homogenizowano w łaźni ultradźwiękowej (Ultron, typ U-505, Dywity Poland), filtrowano przez filtry o porowatości 0,2 µm i przenoszono na kolumnę chromatograficzną. Analizy prowadzono wykorzystując chromatograf Waters 2695 (Waters, Milford, CT, USA) z detektorem fluorescencyjnym Waters 2475 Multiλ Fluorescence Detector (λ<sub>ex</sub> = 274 nm, λ<sub>em</sub> = 440 nm) oraz detektorem Waters 2996



Photodiode Array Detector i kolumną Nova Pak C-18 (150 x 3.9 mm). Dane były opracowywane z wykorzystaniem oprogramowania Empower 1 (Waters, Milford, CT, USA). Identyfikacji zearalenonu dokonano na podstawie porównania czasów retencji próbki ze standardem mykotoksyny. Oznaczenia ilościowego dokonano metodą wzorca zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików i zastosowaniem krzywej kalibracyjnej. Detektor Photodiode Array Detector (PDA) wykorzystano do potwierdzenia obecności ZEA na podstawie charakterystycznego widma tego związku. Limit detekcji wynosił 1,0 ng/g.

#### **Ekstrakcja i oznaczanie trichotecenów z grupy B**

Trichoteceny z grupy B ekstrahowano z materiału roślinnego według metodyki opisanej przez Perkowski i in. (2003). Deoksyniwalenol – DON, 3-acetyldeoksyniwalenol – 3-AcDON, 15-acetyldeoksyniwalenol – 15-AcDON, niwalenol – NIV i fusarenon – FUS-X analizowano jako pochodne trimetylosilylowe z użyciem standard zewnętrznego. Pochodne trimetylosilylowe otrzymywano w reakcji ze 100 µl mieszaniny imidazole trimetylosilylu i trimetylochlorosilanu (100:1, v/v) w probówkach o pojemności 10 cm<sup>3</sup> w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Rozdział chromatograficzny i analiza trichotecenów z grupy B była prowadzona z wykorzystaniem chromatografu gazowego (Varian 450-GC) z detektorem masowym (Varian 320-MS). Aparat był wyposażony w autosampler (CP-8400) i kolumnę kapilarną (Varian SLB-5MS, 0.25 mm × 30 m). Próbki o wielkości 1 µl nastrzykiwano do komory dozowania w 280°C bez podziału strumienia, przy temperaturze separatora 290°C. Całkowity czas analizy wynosił 24,47 minut. Analiza trichotecenów była przeprowadzana w trybie MRM (ang. *Multiple Reaction Monitoring*), a czas retencji dla poszczególnych wynosił: 13,16 dla deoksyniwalenolu; 14,35 dla fusarenonu-X; 14,42 dla 3-acetyldeoksyniwalenolu; 14,59 dla 15-acetyldeoksyniwalenolu i 14,72 dla niwalenolu. Szybkość przepływu helu wynosiła 0,7 ml/min. Wyniki uzyskane w trakcie analizy rejestrowano i opracowywano przy pomocy programu Varian MSWorkstation ver. 6.9.2. Limit detekcji mykotoksyn wynosił 1 ng/g.

#### **6.4.2. Określenie wiązania mykotoksyn fuzaryjnych przez komórki bakterii kwasu mlekowego**

Wiązanie toksyn (zearalenonu i deoksyniwalenolu) przez wybrane izolaty bakterii fermentacji mlekowej oszacowano stosując metodę opisaną przez Gwiazdowską (2014) z pewnymi modyfikacjami. Do jałowych probówek wirówkowych przenoszono 24 godziną

hodowle badanych bakterii i odwirowywano komórki (8000 × g, 10 minut). W wariacie uwzględniającym martwe komórki bakteryjne, przed odwirowaniem pożywki hodowle inaktywowano termicznie (100°C przez 10 minut). Supernatant odrzucano, a komórki bakteryjne zawieszano w jałowym buforze PBS i ponownie wirowano (8000 × g, 10 minut), w celu przepłukania komórek z pozostałości pożywki. Roztwór z osadu odrzucano, komórki zawieszano w jałowym buforze PBS, ustalając finalne stężenie 10 w skali McFarlanda. Otrzymane zawiesiny rozdzielono po 1 cm<sup>3</sup> do jałowych probówek typu eppendorf (pojemność 2 cm<sup>3</sup>) i odwirowano komórki bakteryjne (14000 × g, 5 minut), a następnie zawieszano otrzymany osad w roztworze mykotoksyn i próbki poddano inkubacji. W zależności od prowadzonego doświadczenia użyto różne stężenia toksyn, pH środowiska oraz różny czas i temperatura inkubacji – tabela 14. Kontrolę stanowiły próbki bez dodatku komórek bakterii fermentacji mlekowej.

**Tabela 14. Warunki w jakich prowadzono doświadczenie w zależności od założonego wariantu**

Wariant doświadczenia	Czas inkubacji	Temperatura inkubacji	Stężenie toksyny	pH środowiska	Rodzaj komórek
Wpływ czasu inkubacji	15 min 30 min 90 min 24 h	Ok. 25°C	5 µg/cm <sup>3</sup>	7	żywe i martwe
Wpływ temperatury	1 h	4°C 25°C 40°C	5 µg/cm <sup>3</sup>	7	żywe
Wpływ stężenia toksyny	1 h	Ok. 25°C	1 µg/cm <sup>3</sup> 5 µg/cm <sup>3</sup> 10 µg/cm <sup>3</sup>	7	żywe
Wpływ pH środowiska	1 h	Ok. 25°C	5 µg/cm <sup>3</sup>	3 7 9	żywe

Źródło: opracowanie własne na podstawie Gwiazdowska (2014)

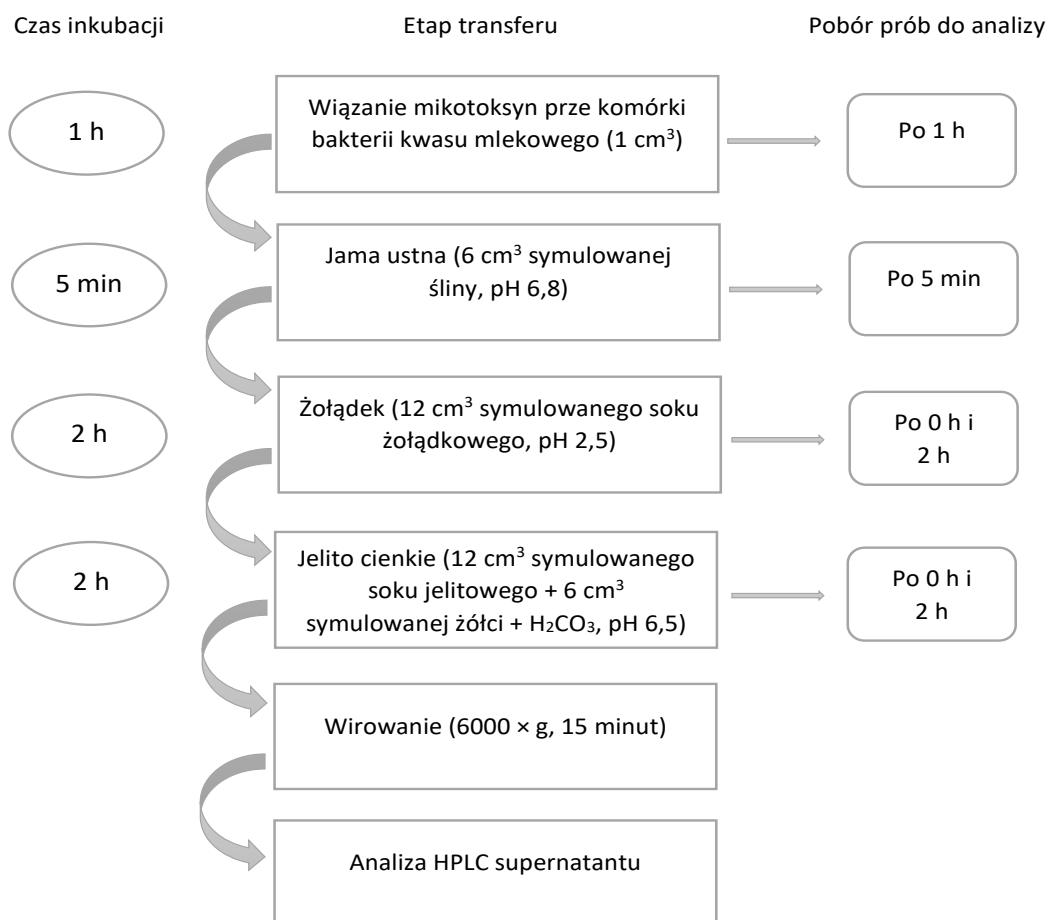
Po inkubacji komórki bakteryjne odwirowywano (14000 × g, 5 minut), a otrzymany supernatant przesączało przez filtry Millex GS 0,22 µm (Millipore Bedford MA, USA). W przefiltrowanym supernatancie oznaczano zawartość mykotoksyn fuzaryjnych metodą HPLC.

Zearalenon oznaczano z wykorzystaniem aparatu Waters 2695 (Waters Company, Milford, MA, USA), wraz z detektorami Multi Fluorescence Detector Waters 2475 i Photodiode Array Detector Waters 2996 oraz kolumną C<sub>18</sub> Nova Pack 3,9 × 150 mm, stosując jako fazę ruchomą roztwór acetonitryl: woda: metanol (46:46:8, v/v/v), przy szybkość przepływu 0,5 cm<sup>3</sup>/min, i objętość dozowania próbki 10 – 20 µl. Próg wykrywalności wynosił 0,3 ng/g.

Deoksynivalenol oznaczano z wykorzystaniem aparatu Waters 2695 (Waters Company, Milford, MA, USA), wraz z detektorem Photodiode Array Detector Waters 2996 oraz kolumną C<sub>18</sub> Nova Pack 3,9 × 300 mm, stosując jako fazę ruchomą roztwór woda: metanol (70:30, v/v), przy szybkość przepływu 0,5 cm<sup>3</sup>/min, i objętość dozowania próbki 10 – 20 µl. Próg wykrywalności wynosił 10 ng/g.

#### **6.4.3. Określenie stabilności kompleksu bakterie-zearalenon w symulowanym układzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych**

Stabilność związanego ZEA przez komórki bakterii fermentacji mlekowej, podczas pasażu przez symulowany układ pokarmowy, określono wykorzystując metodykę opisaną przez Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg i Sips (2005). Do badań wykorzystano izolat *L. plantarum* MLK 304. Zawiesinę komórek bakterii fermentacji mlekowej (o gęstości optycznej 10 w skali McFarlanda) przygotowano tak jak w punkcie 6.4.2. Zawiesinę bakteryjną (w ilości 1 cm<sup>3</sup>) rozdzielono do jałowych probówek wirówkowych typu Falcon (o pojemności 50 cm<sup>3</sup>), zwirowano (8000 × g, 10 minut), a następnie powstały osad zawieszono w roztworze ZEA (5 µg/ml) i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej w celu związania toksyny przez komórki bakteryjne (tworzenie kompleksu bakterie:mykotoksyna). Po inkubacji próbki zwirowano (8000 × g, 10 minut), zebrano roztwór z nad osadu (zawierający niezwiązane toksyny) a powstały kompleks poddano pasażowi przez symulowany układ pokarmowy. Transfer komórek bakterii kwasu mlekowego z zaabsorbowanymi toksynami obejmował jamę ustną, żołądek oraz jelito cienkie, których specyficzne środowisko odtworzono po przez dodawanie kolejnych roztworów symulujących ślinę, sok żołądkowy i sok jelitowy (rysunek 7). Stabilność kompleksu bakterii z ZEA wyrażono jako ilość toksyn, które pozostały związane z komórkami bakterii fermentacji mlekowej po transferze w symulowanym układzie pokarmowym. Stężenie toksyn w poszczególnych frakcjach oznaczano metodą HPLC (punkt 6.4.2).



**Rysunek 7. Schemat transferu bakterii fermentacji mlekowej przez symulowany układ pokarmowy zwierząt monogastrycznych**

Źródło: opracowanie własne na podstawie Versantvoort i in. (2005)

#### **6.4.4. Wykorzystanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej w produkcji kiszonek paszowych**

Możliwość wykorzystania wyizolowanych bakterii kwasu mlekowego jako kultury starterowe do zakiszania pasz, określono po przez wyprodukowanie kisonki z lucerny z zastosowaniem dwóch izolatów LAB (*L. buchneri* MYK 220 oraz *L. plantarum* MLK 304) i jednego szczepu bakterii fermentacji propionowej (*P. acidopropionici* PCM 2434). Doświadczenie wykonano przy współpracy z Katedrą Żywienia Zwierząt i Gospodarki Paszowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

### **Przygotowanie mikroorganizmów do zakiszania**

Bakterie kwasu mlekowego i propionowego namnażano na płynnym podłożu MRS w kolbkach stożkowych o pojemności 300 cm<sup>3</sup> w temperaturze 30°C przez 24 h. Następnie, po ustaleniu gęstości optycznej na poziomie 10 w skali McFarlanda, hodowlę przenoszono do jałowych falkonów o pojemności 50 cm<sup>3</sup>.

### **Przygotowanie kiszonek z lucerny**

Materiał roślinny (lucerna) pochodził z gospodarstwa rolnego z terenu Wielkopolski (okolice Wrześni). Świeży, lekko podsuszony materiał upakowywano w minisilosach z tworzywa sztucznego (pojemność ok. 3 kg), rozprowadzając równomiernie hodowlę bakterii fermentacji mlekowej i propionowej (5 cm<sup>3</sup>/kg lucerny). W doświadczeniu zastosowano 5 różnych wariantów w zakresie wykorzystanych bakterii do zakiszania lucerny (tabela 15). Następnie silosy szczelnie zamykano, odcinano dopływ tlenu i poddano procesowi zakiszania przez 3 miesiące w temperaturze około 25°C. Jako odnośnik wykorzystano dostępny na rynku preparat do zakiszania pasz AgricolSIL (Microferm Ltd, Wielka Brytania) zawierający w składzie *L. plantarum* DSMZ 16627, *P. acidilactici* NCIMB 30005, *L. paracasei* NCBIMB 30151 oraz bakteriofagi hamujące namnażanie bakterii tlenowych. Każdy wariant przygotowano w czterech równoległych powtórzeniach.

**Tabela 15. Opis zastosowanych wariantów podczas zakiszania lucerny**

<b>Wariant</b>	<b>Oznaczenie</b>	<b>Mikroorganizm</b>
<b>Kontrola</b>	K	<i>L. plantarum</i> DSMZ 16627 <i>P. acidilactici</i> NCIMB 30005 <i>L. paracasei</i> NCBIMB 30151
<b>Wariant 1</b>	MYK	<i>L. buchneri</i> MYK 220
<b>Wariant 2</b>	MLK	<i>L. plantarum</i> MLK 304
<b>Wariant 3</b>	PCM	<i>P. acidipropionici</i> PCM 2434
<b>Wariant 4</b>	M	<i>L. buchneri</i> MYK 220 <i>L. plantarum</i> MLK 304 <i>P. acidipropionici</i> PCM 2434

Źródło: opracowanie własne

### **Analiza mikrobiologiczna kiszzonek z lucerny**

Podstawową jakość mikrobiologiczną uzyskanych kiszzonek z lucerny określono wykonując posiewy metodą zalewową z rozcieńczeń dziesiętnych. Do sterylnych woreczków Bag Light 400 odważono 10 g kiszzonek, dodano 90 cm<sup>3</sup> jałowej soli fizjologicznej i homogenizowano przez 3 minuty przy użyciu stomachera Bag Mixer® 400. Z otrzymanych zawiesin wykonano szereg rozcieńczeń dziesiętnych, a następnie wykonano posiewy metodą zalewową. W zależności od kierunku prowadzonych analiz stosowano różne podłoża i warunki inkubacji (punkt. 5.4.4). Po czasie inkubacji wyrosłe kolonie mikroorganizmów liczono przy użyciu licznika kolonii Scan®100. Liczebność poszczególnej grupy mikroorganizmów wyrażano jako logarytm jtk/g kiszzonek z lucerny.

### **Analiza stężenia ZEA i DON w kiszzonekach z lucerny**

W przygotowanych kiszzonekach oznaczono również zawartość deoksyniwalenolu oraz zearalenonu. Ekstrakcję oraz oznaczenie stężenia toksyn w zakiszczonym materiale wykonano identycznie jak punkcie 6.4.1.

### **6.5. Modelowanie właściwości fungistatycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej poprzez optymalizację składu podłoża**

Analizę wzrostu oraz właściwości fungistatycznych wybranych izolatów oszacowano w oparciu o podłoża przygotowane zgodnie z punktem 5.4.3. Badanie przeprowadzono dla 5 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wybranych na podstawie wcześniejszych oznaczeń. Przed pasażowaniem izolatów bakterii kwasu mlekowego na przygotowane podłoża, namnażano je na płynnym podłożu MRS przez 24 h, finalnie doprowadzając hodowle do równej gęstości optycznej (10 w skali McFarlanda).

### **Określenie wpływu opracowanych pożywek na wzrost wybranych izolatów**

Do jałowych probówek typu eppendorf, o pojemności 2 cm<sup>3</sup>, dodano 1 cm<sup>3</sup> poszczególnych pożywek po czym wprowadzono do nich 100 µl hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej i dokładnie wymieszano. Przygotowane inokulaty, w ilości 160 µl, umieszczono na 96 dołkowej płytce titracyjnej i poddano inkubacji w temperaturze 30 i 37°C (w zależności od badanego szczepu). Intensywność wzrostu sprawdzano poprzez pomiar przyrostu absorbancji przy długości fali 600 nm z wykorzystaniem czytnika mikroplitek EPOCH<sup>2</sup> firmy BioTek. Pomiarów wykonano po 0, 2, 4, 6, 12, 24, 30 i 48 h inkubacji. Kontrole

stanowiły czyste pożywki, bez dodatku komórek bakteryjnych. Badanie przeprowadzono w czterech równoległych powtórzeniach.

### **Określenie wpływu opracowanych pożywek na właściwości fungistatyczne wybranych izolatów**

Do jałowych probówek, o pojemności 20 cm<sup>3</sup>, dodano 10 cm<sup>3</sup> poszczególnych pożywek, po czym zaszczerpiono 1000 µl hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej i dokładnie wymieszano. Badane bakterie inkubowano w temperaturze 30 i 37°C (w zależności od badanego szczepu), pobierając 1 cm<sup>3</sup> hodowli do jałowych probówek typu eppendorf (pojemność 1,5 cm<sup>3</sup>) po 24, 48 i 72 h inkubacji. Aktywność fungistatyczną określono wobec dwóch grzybów z rodzaju *Fusarium* (*F. graminearum* i *F. culmorum*) stosując metodę opisaną w punkcie 5.2.1. Badanie przeprowadzono w trzech równoległych powtórzeniach.

### **6.6. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu SPSS Statistics 23 oraz Microsoft Excel®. W celu porównania wartości średnich przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi dla doświadczeń, określano za pomocą testu post-hoc Tukeya. Wszystkie hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności  $p < 0,05$ .

## 7. Wyniki badań i dyskusja

### 7.1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych

Pierwszym etapem niniejszej pracy była izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszonek paszowych (trzech kiszonek z kukurydzy oraz jednej sianokiszonki) poddanych spontanicznej fermentacji, co oznacza, że w procesie fermentacji materiału roślinnego brały udział jedynie mikroorganizmy naturalnie bytujące w danym surowcu. Dobór materiału izolacyjnego nie był przypadkowy, ponieważ założono, że izolaty bakterii fermentacji mlekowej powinny pochodzić ze środowiska, w którym potencjalnie miałyby mieć zastosowanie (ochrona roślin, produkcja kiszonek paszowych). Proces izolacji przeprowadzono zgodnie z punktem 6.1 opisanym w części metodycznej. Wyniki przeprowadzonej izolacji zaprezentowano w tabeli 16 oraz na fotografii 1 i 2. Bakterie fermentacji mlekowej izolowano w ramach poszczególnych serii, uwzględniających zarówno materiał izolacyjny jak i temperaturę inkubacji. W badaniach przyjęto dwie wartości temperatur hodowli izolatów bakterii fermentacji mlekowej: 37°C jako temperaturę wzrostu typową dla wielu gatunków bakterii kwasu mlekowego, jak również 30°C, której przypisuje się duży wpływ na aktywność przeciwgrzybową bakterii fermentacji mlekowej (Sathe, Nawani, Dhakephalkar, i Kapadnis, 2007; Crowley, Mahony i van Sinderen, 2013; Szostan-Fałtyn i Królasik, 2015).

**Tabela 16. Ilość bakterii fermentacji mlekowej w materiale izolacyjnym oraz liczba i warunki inkubacji izolatów w ramach poszczególnych serii**

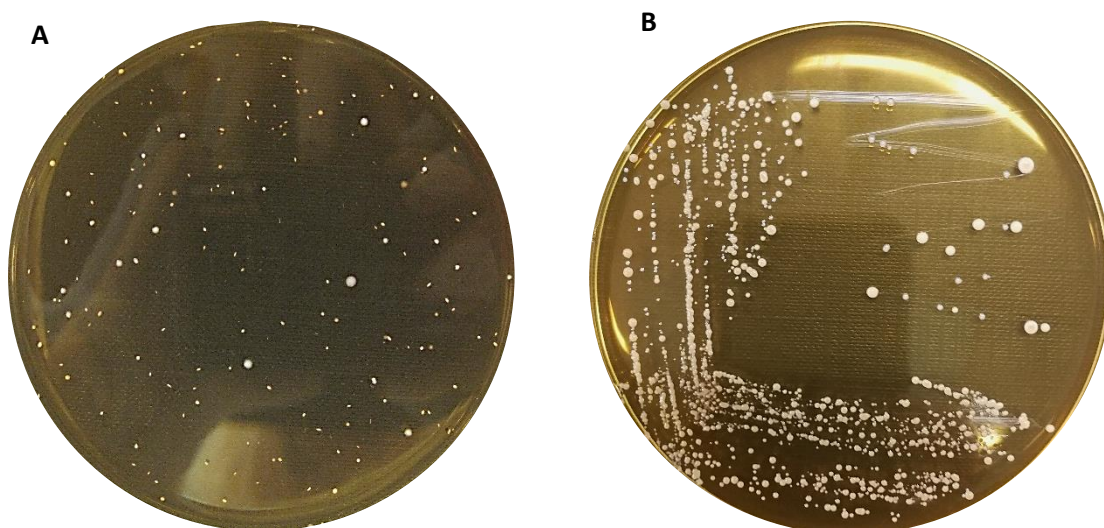
Materiał izolacyjny	Liczba bakterii fermentacji mlekowej na podłożu MRS ( $\log_{10}$ jtk/g)	Seria	Liczba izolatów w serii	Temperatura inkubacji
Sianokiszonka	6,25 <sup>bc</sup> ± 0,05	JSK	15	37°C
		PSK	7	30°C
Kiszonka z kukurydzy I	5,79 <sup>a</sup> ± 0,14	JKK	10	37°C
		PKK	5	30°C
Kiszonka z kukurydzy II	6,43 <sup>c</sup> ± 0,08	AK	31	37°C
		MYK	22	30°C
Kiszonka z kukurydzy III	6,11 <sup>b</sup> ± 0,04	EK	0	37°C
		MLK	24	30°C

\*Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

Źródło: na podstawie badań własnych

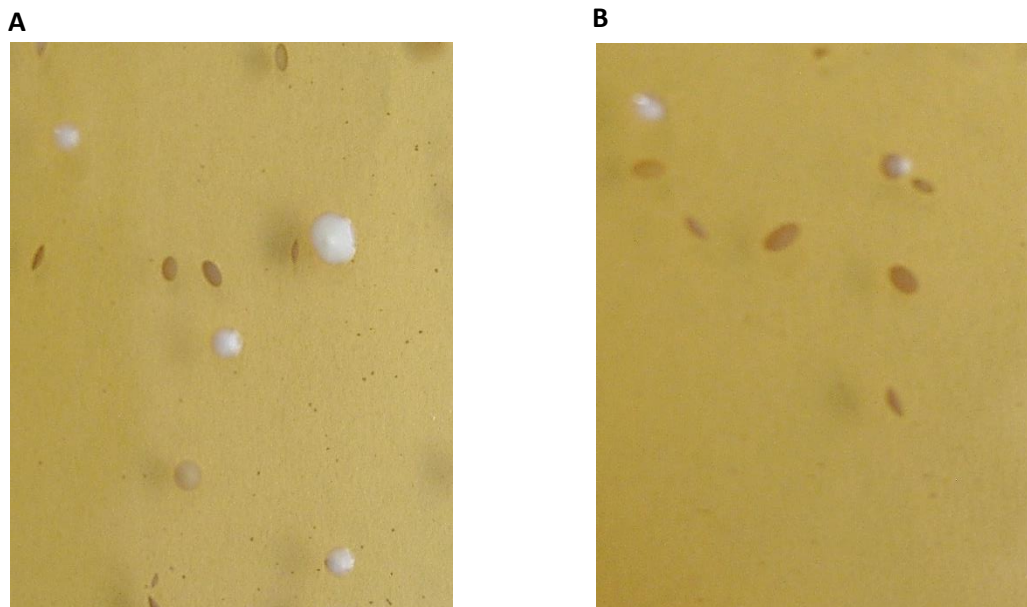


Z analizy ilościowej można zauważyć, że liczba bakterii fermentacji mlekowej kształtowała się na podobnym poziomie,  $10^5$  -  $10^6$  jtk/g, we wszystkich badanych kiszonkach. Największą liczbę bakterii kwasu mlekowego odnotowano w przypadku kiszonki z kukurydzy II (6,43 log jtk/g), natomiast najmniejszą liczbę LAB, na poziomie  $10^5$  jtk/g, odnotowano w przypadku kiszonki z kukurydzy I (5,79 log jtk/g). Kolonie bakteryjne, otrzymane z posiewów ilościowych, charakteryzowały się typowym dla bakterii fermentacji mlekowej wzrostem na stałym podłożu MRS. Zaobserwowano głównie kolonie bezbarwne, białe lub kremowe, o powierzchni matowej lub błyszczącej, przyjmujące kształt okrągły, owalny lub łezkowaty. Kolonie bakteryjne cechowały się wyraźnie wyodrębnionymi gładkimi brzegami, natomiast struktura była śluzowata lub mukoidalna. W celu uzyskania czystych kolonii bakteryjnych, z otrzymanych posiewów ilościowych wykonywano posiewy redukcyjne. Do posiewów redukcyjnych wybierano głównie kolonie o kształcie elipsoidalnym (łezkowatym), rosnące wewnątrz podłoża agarowego, jak również z kolonie, które wyrastały ponad podłoże. Łącznie wyizolowano 114 czystych kultur bakterii kwasu mlekowego: 22 izolaty z sianokiszonki (seria JSK i PSK), 15 izolatów z kiszonki z kukurydzy I (seria JKK i PKK), 53 izolaty z kiszonki z kukurydzy II (seria AK i MYK) oraz 24 izolaty z kiszonki z kukurydzy III (MLK). Izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii JSK, JKK oraz AK hodowano w temperaturze 37°C, natomiast izolaty bakterii mlekowych z pozostałych serii hodowano w temperaturze 30°C.



**Fotografia 1. Posiew ilościowy z kiszonki z kukurydzy II w kierunku bakterii fermentacji mlekowej na podłożu MRS (A), oraz posiew redukcyjny izolatu MLK 304 (B)**

Źródło: fotografie własne



**Fotografia 2. Widok pojedynczych kolonii bakteryjnych na podłożu MRS, otrzymanych z posiewów ilościowych kiszonki z kukurydzy I (A) i kiszonki z kukurydzy III (B)**

Źródło: fotografie własne

Zarówno dane literaturowe jak i badania własne wskazują, że liczebność bakterii fermentacji mlekowej w zakiszanych materiałach roślinnych może się kształtować na różnym poziomie w zależności od rodzaju materiału jak i sposobu przygotowania kiszonki. Przykładowo, Müller (2009) zaobserwowała różną ilość bakterii mlekowych w sianokiszonkach, w zależności od terminu zbioru i typu pastwiska, z którego pobierano materiał do zakiszania. Autorka odnotowała, że największą liczebnością bakterii fermentacji mlekowej (7,15 log jtk/g) charakteryzowały się sianokiszonki z surowca zebranego w okresie sierpniowym, hodowanego na pastwisku, gdzie często wymienia się rodzaj uprawy, najmniejszą zaś w sianokiszonce z surowca zebranego w maju (3,39 log jtk/g) z pastwiska o stałym, długoletnim rodzaju uprawy. Wpływ terminu zbioru na liczebność bakterii fermentacji mlekowej w sianokiszonkach wykazali również Schneck i Müller (2014), stwierdzając najwyższą ilość LAB (6,52 log jtk/g) w sianokiszonce przygotowanej z surowca zebranego w sierpniu w porównaniu z sianokiszonkami przygotowanymi z surowców zebranych w czerwcu i w lipcu (odpowiednio 4,53 i 5,69 log jtk/g). Zróżnicowaną liczebność bakterii kwasu mlekowego, w zależności od rodzaju zakiszane surowca, zaobserwowali również Parvin, Wang, Li i Nishino (2010), analizując zawartość LAB w kiszonce z życicy wielokwiatowej, kukurydzy oraz trawy Rhodos i Guinea. W swoich badaniach wykazali, że największą liczebnością bakterii fermentacji mlekowej cechowała się kiszonka z życicy wielokwiatowej, na poziomie 8,04 log jtk/g,

natomiast najmniejszą liczbę LAB oznaczono w przypadku kiszonki z kukurydzy – 5,24 log jtk/g. Stosunkowo niską liczbę bakterii kwasu mlekowego w kiszonce z kukurydzy, na poziomie  $10^5$  jtk/g, odnotowali także Reich i Kung Jr. (2010) w kiszonce nie poddanej inokulacji, w której stwierdzono 5,68 log jtk/g LAB. Z kolei Driehuls, Oude Elferink i Spoelstra (1999) w kiszonce z kukurydzy, bez dodatku inokulatu bakteryjnego, odnotowali liczebność bakterii fermentacji mlekowej na poziomie 8,3 oraz 9,3 log jtk/g. W badaniach Filya (2003) wyższą liczbę bakterii fermentacji mlekowej (7,2 log jtk/g) odnotowano w kiszonce z kukurydzy, w porównaniu z kiszonką z pszenicy i sorgo (odpowiednio, 6,1 oraz 6,7 log jtk/g. Zróżnicowaną liczbę bakterii fermentacji mlekowej, w zależności od czasu zakiszania, zaobserwowali Driehuis, Oude Elferink i Van Wikselaar (2001) w przygotowanych kiszonkach z trawy, w których odnotowali ilość LAB na poziomie 9,1 log jtk/g (po 90 dniach zakiszania) i 8,5 log jtk/g (po 119 dniach zakiszania). Yuan i in. (2015), w badaniach kiszonki sporządzonej z mieszanki kukurydzy, lucerny i owsa, odnotowali liczebność bakterii fermentacji mlekowej na poziomie 6,95 log jtk/g, natomiast po wystawieniu kiszonki na ekspozycję tlenową (przez 9 dni) liczba bakterii kwasu mlekowego spadła do poziomu 5,09 log jtk/g. Niską liczbę bakterii kwasu mlekowego, na poziomie 4,19 log jtk/g, odnotowali w swoich badaniach Moselhy, Borba i Borba (2015), analizując jakość mikrobiologiczną kiszonki z wianecznika gardnera (*Hedychium gardnerianum*).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki były porównywalne z większością prezentowanych powyżej badań, przy czym można zauważyć, że kształtowały się raczej na średnim poziomie, osiągając maksymalnie 6,43 log jtk/g w kiszonce z kukurydzy. Mogło to wynikać m.in. z rodzaju materiału, metody i czasu zakiszania, jak również braku zastosowania inokulatu.

Czyste kultury bakterii LAB, pozyskane w toku izolacji, wykorzystano do selekcji w oparciu o wybrane właściwości determinujące funkcjonalność badanych izolatów oraz do charakterystyki fenotypowej i identyfikacji genetycznej.

## **7.2. Skrining izolatów bakterii fermentacji mlekowej pod względem wybranych właściwości**

### **7.2.1. Aktywność fungistatyczna bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszzonek paszowych**

Jednym z najistotniejszych czynników branych pod uwagę w procesie selekcji badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej była ich aktywność fungistatyczna. Ocenę właściwości antygrzybowych przeprowadzono względem czterech grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* (*F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* oraz *F. graminearum*), stanowiących jedno z głównych patogenów upraw rolnych, szczególnie w naszych warunkach klimatycznych. Na etapie selekcji przyjęto, iż do dalszych badań zostaną wybrane tylko izolaty, które będą hamowały wzrost co najmniej 3 spośród 4 mikroorganizmów wskaźnikowych. Aktywność fungistatyczną badanych izolatów określono zgodnie z punktem 6.2.1, opisanym w części metodycznej. Wyniki przedstawiono w tabeli 17, jak również na fotografiach 3 – 6 i w załączniku. W celu łatwiejszej interpretacji wyniki podzielono pod względem siły oddziaływania poszczególnych izolatów wobec grzybów wskaźnikowych, przyjmując jako kryterium wielkość strefy zahamowania wzrostu.

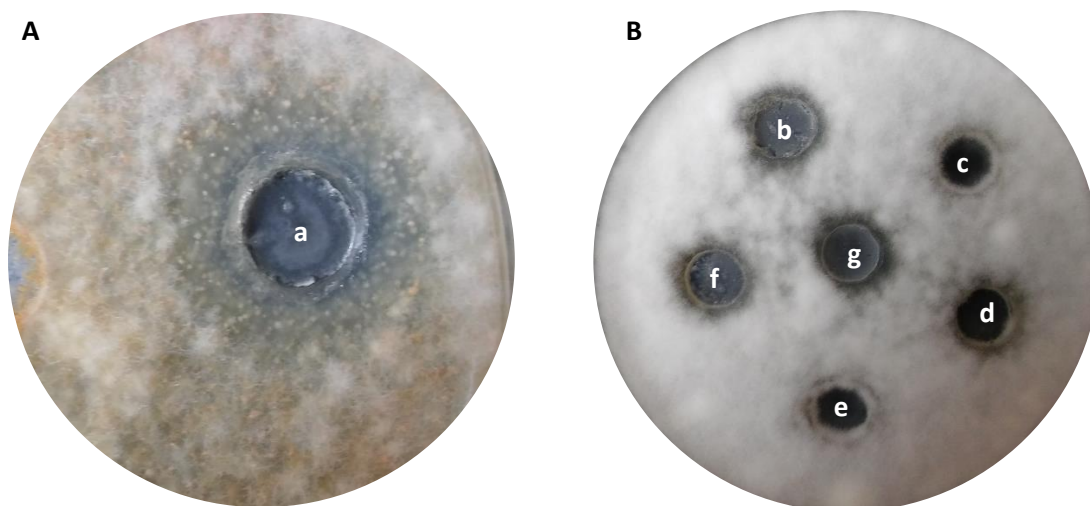
Na podstawie uzyskanych rezultatów można stwierdzić, że aktywność fungistatyczna badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej różniła się w zależności od mikroorganizmu wskaźnikowego, a także od serii izolatów, zbieżnej z ich pochodzeniem oraz warunkami hodowli. Jak można zauważyć, tylko pojedyncze izolaty z poszczególnych serii wykazywały aktywność fungistatyczną w stopniu wysokim, przy czym była ona skierowana tylko w stosunku do gatunków *F. avenaceum* i *F. graminearum*. Najczęściej obserwowano niską aktywność fungistatyczną. W niektórych przypadkach nie odnotowano czystych stref zahamowania wzrostu, ale wyraźny wpływ na morfologię grzybów, co przejawiało się słabszym wzrostem, zmianą barwy grzybni i opóźnieniem zarodnikowania.

**Tabela 17. Aktywność fungistatyczna bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszonek paszowych względem wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium***

Seria	Liczba/procent izolatów z danej serii wykazujących aktywność fungistatyczną wobec badanych grzybów				
	Wysoka aktywność fungistatyczna (≥20,01 mm)	Średnia aktywność fungistatyczna (14,51-20,00 mm)	Niska aktywność fungistatyczna (10,50-14,50 mm)	Wpływ wyłącznie na cechy morfologiczne	Brak aktywności fungistatycznej
<b><i>Fusarium avenaceum</i></b>					
JSK	-	6 40,0%	2 13,3%	3 20,0%	4 26,7%
PSK	-	-	1 14,3%	-	6 85,7%
JKK	-	2 20,0%	6 60,0%	-	2 20,0%
PKK	-	-	5 100,0%	-	-
AK	1 3,2%	11 35,5%	13 41,9%	-	6 19,4%
MYK	-	6 27,3%	10 45,4%	-	6 27,3%
MLK	1 4,2%	4 16,6%	11 45,8%	1 4,2%	7 29,2%
<b><i>Fusarium equiseti</i></b>					
JSK	-	-	10 66,7%	2 13,3%	3 20,0%
PSK	-	-	1 14,3%	1 14,3%	5 71,4%
JKK	-	-	6 60,0%	-	4 40,0%
PKK	-	-	4 80,0%	-	1 20,0%
AK	-	5 16,1%	9 29,0%	4 12,9%	13 42,0%
MYK	-	-	16 72,7%	4 18,2%	2 9,1%
MLK	-	-	22 91,6%	1 4,2%	1 4,2%
<b><i>Fusarium culmorum</i></b>					
JSK	-	-	4 26,7%	4 26,7%	7 46,6%
PSK	-	1 14,3%	-	-	6 85,7%
JKK	-	1 10,0%	6 60,0%	-	3 30,0%
PKK	-	-	1 20,0%	3 60,0%	1 20,0%
AK	-	-	-	3 9,7%	28 90,3%
MYK	-	-	-	17 77,3%	5 22,7%
MLK	-	-	2 8,3%	-	22 91,7%
<b><i>Fusarium graminearum</i></b>					
JSK	-	-	-	12 80,0%	3 20,0%
PSK	-	-	1 14,3%	1 14,3%	5 71,4%
JKK	-	-	4 40,0%	2 20,0%	4 40,0%
PKK	-	-	3 60,0%	-	2 40,0%
AK	-	-	-	2 6,5%	29 93,5%
MYK	2 9,1%	4 18,1%	8 36,4%	-	8 36,4%
MLK	3 12,5%	3 12,5%	4 16,7%	-	14 58,3%

Źródło: na podstawie badań własnych

Analizując właściwości fungistatyczne bakterii wyizolowanych z sianokiszonki można zauważyć, że zdecydowanie wyższą aktywność wykazywały izolaty z serii JSK (hodowane w temperaturze 37°C) w porównaniu z serią PSK (hodowane w temperaturze 30°C). W serii JSK, 11 spośród 15 izolatów charakteryzowało się oddziaływaniem fungistatycznym w stosunku do trzech mikroorganizmów wskaźnikowych. Największa liczba izolatów z tej serii wykazywała zdolność do hamowania wzrostu *F. equiseti*, jednakże siłę oddziaływania należy określić jako niską. Wzrost *F. avenaceum* był hamowany przez jedenaście izolatów, w tym sześć izolatów wykazywało aktywność fungistatyczną w stopniu średnim, jeden izolat w stopniu niskim, natomiast trzy izolaty bakterii fermentacji mlekowej wpłynęły jedynie na cechy morfologiczne *F. avenaceum*. Na wzrost grzyba *F. culmorum* antagonistyczny wpływ miały tylko cztery izolaty (JSK 21, JSK 24, JSK 25 i JSK 36) w stopniu niskim. Najniższą wrażliwością na metabolity izolatów bakterii mlekowej w tej serii charakteryzował się *F. graminearum*, gdzie zaobserwować można było jedynie zmiany cech morfologicznych pod wpływem działania badanych mikroorganizmów. W serii oznaczonej jako PSK, jedynie izolat PSK 201 wykazywał słabe oddziaływanie antagonistyczne względem *F. equiseti*, *F. culmorum* i *F. graminearum*.

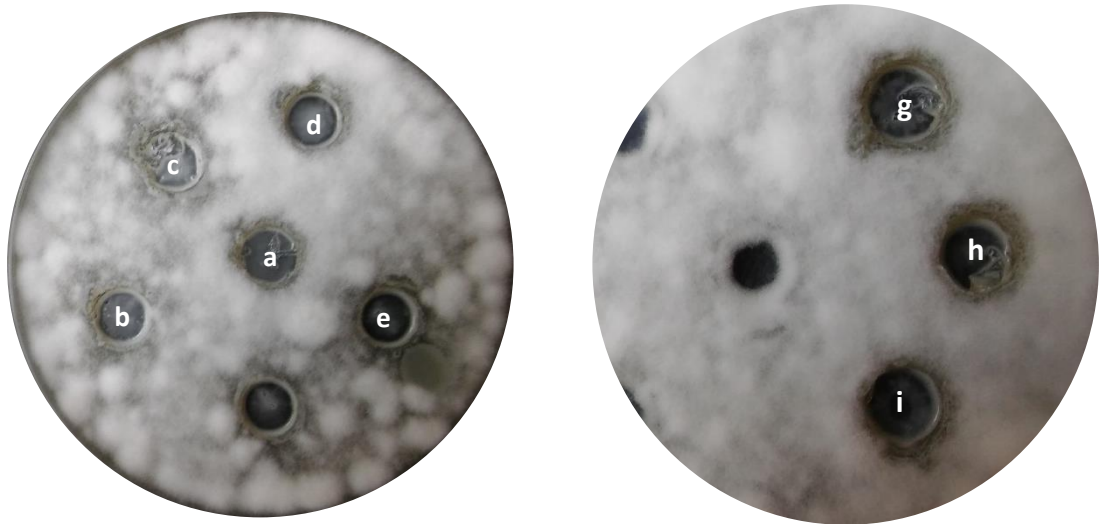


**Fotografia 3. Strefy zahamowania wzrostu *F. avenaceum* (A) oraz *F. equiseti* (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii JSK: a – JSK022, b – JSK030, c – JSK024, d – JSK031, e – JSK027, f – JSK036,**

Źródło: fotografie własne

Analizując aktywność fungistatyczną bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy, zaobserwowano, że zdecydowanie większe spektrum oddziaływania wykazywały bakterie hodowane w temperaturze 30°C, aczkolwiek izolaty z serii JKK (hodowane w temperaturze 37°C) najsilniej hamowały wzrost *F. culmorum*. Spośród izolatów z serii AK tylko jeden, AK 29, wykazywał działanie fungistatyczne względem trzech grzybów z rodzaju *Fusarium*. Izolat ten hamował wzrost *F. equiseti* w stopniu średnim, *F. avenaceum* w stopniu wysokim, natomiast w przypadku *F. graminearum* obserwowano tylko zmiany w morfologii grzybni. Wzrost *F. culmorum* i *F. graminearum* nie został zahamowany przez żaden izolat, w kilku przypadkach obserwowano jedynie zmiany zabarwienia grzybni wgłębnej lub nieznaczną zredukację grzybni powierzchniowej. Zdecydowanie największą wrażliwością na oddziaływanie bakterii fermentacji mlekowej z tej serii charakteryzował się *F. avenaceum*, którego wzrost hamowało w różnym stopniu około 80% badanych izolatów. W stosunku do *F. equiseti* aktywność fungistatyczną wykazało czternaście izolatów z serii AK (w stopniu niskim i średnim), natomiast cztery izolaty wpłynęły jedynie na cechy morfologiczne grzyba.

Izolaty z serii JKK wykazywały najwyższą aktywność antagonistyczną wobec *F. culmorum*. Wzrost tego mikroorganizmu był hamowany w stopniu słabym przez sześć spośród dziesięciu izolatów oraz w stopniu średnim przez izolat JKK011. Wzrost *F. avenaceum* był hamowany przez osiem spośród dziesięciu izolatów, przy czym większość izolatów charakteryzowała się niską aktywnością fungistatyczną, dwa izolaty (JKK 004, JKK 008) hamowały wzrost grzyba na poziomie średnim, a izolaty JKK 002 i JKK 003 nie wpłynęły na jego rozwój. Pozostałe dwa mikroorganizmy wskaźnikowe (*F. equiseti* i *F. graminearum*) cechowały się podobną wrażliwością na oddziaływanie bakterii fermentacji mlekowej z serii JKK. Wzrost obu grzybów był hamowany przez sześć izolatów, jednakże siła oddziaływania uzależniona była od gatunku mikroorganizmu wskaźnikowego i różniła się dla poszczególnych izolatów. W serii PKK cztery spośród pięciu badanych izolatów hamowały bądź wpływały na wzrost co najmniej trzech grzybów wskaźnikowych z rodzaju *Fusarium*. Największą wrażliwość na oddziaływanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej z tej serii wykazywały natomiast grzyby z gatunków *F. avenaceum* oraz *F. equiseti*. Z kolei wzrost *F. culmorum* był hamowany jedynie przez izolat PKK 100.

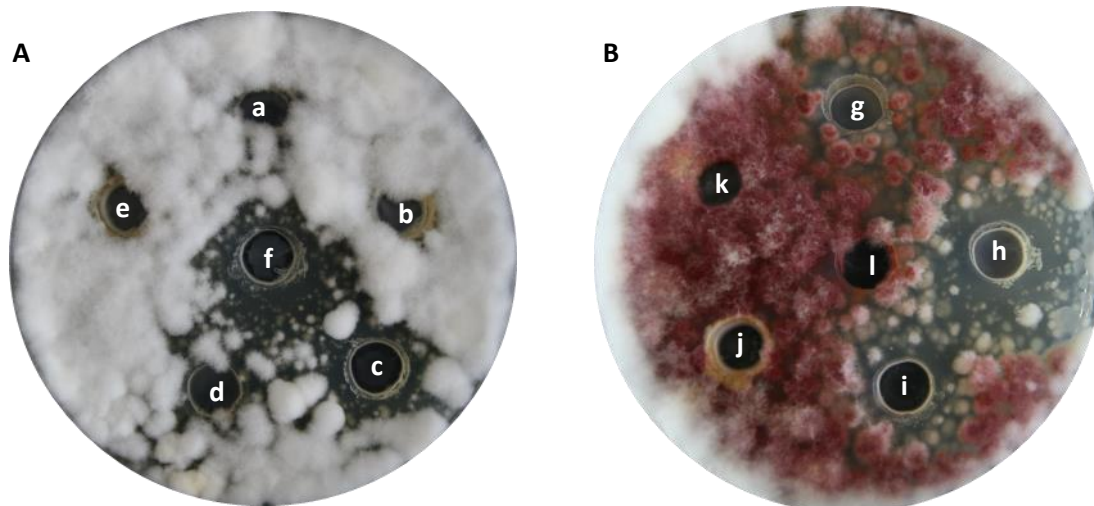


**Fotografia 4.** Strefy zahamowania wzrostu *F. equiseti* przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii JKK oraz PKK: a – JKK001, b – JKK002, c – JKK003, d – JKK005, e – JKK008, f – JKK009, g – PKK100, h – PKK103, i – PKK 104

Źródło: fotografie własne

Spośród wszystkich badanych izolatów zdecydowanie największe spektrum oddziaływania fungistatycznego wykazywały izolaty z serii MYK i MLK. Hamowały bądź wpływały one na wzrost większości mikroorganizmów wskaźnikowych. Jednocześnie, największa liczba izolatów z tych serii wykazywała aktywność fungistatyczną na poziomie średnim i wysokim. Zaobserwowano również dużą wrażliwość *F. graminearum* na działanie badanych izolatów, zwłaszcza z serii MYK. Obie serie izolatów wykazywały, poza kilkoma wyjątkami, aktywność antagonistyczną względem *F. culmorum*, jednakże aktywność ta przejawiała się w dużej mierze wpływem na cechy morfologiczne grzyba. W przypadku serii MYK czternaście spośród dwudziestu dwóch izolatów hamowało wzrost *F. graminearum*, w tym cztery w stopniu średnim, dwa w stopniu wysokim (MYK 204 oraz MYK 206) oraz osiem w stopniu niskim. Stwierdzono także skuteczne hamowanie wzrostu *F. avenaceum* przez 16 izolatów, w tym sześć w stopniu średnim, a 10 izolatów w stopniu niskim. Sześć izolatów nie wykazywało aktywności antagonistycznej względem *F. avenaceum*. Wzrost *F. equiseti* ograniczało w stopniu słabym 16 izolatów, dwa nie wpływały na rozwój grzyba, a cztery izolaty wpłynęły jedynie na jego cechy morfologiczne. W przypadku *F. culmorum* stwierdzono jedynie zmiany w kolorze grzybni wgłębnej i lekko zredukowaną grzybnię powierzchniową na skutek oddziaływania 17 izolatów z serii MYK.

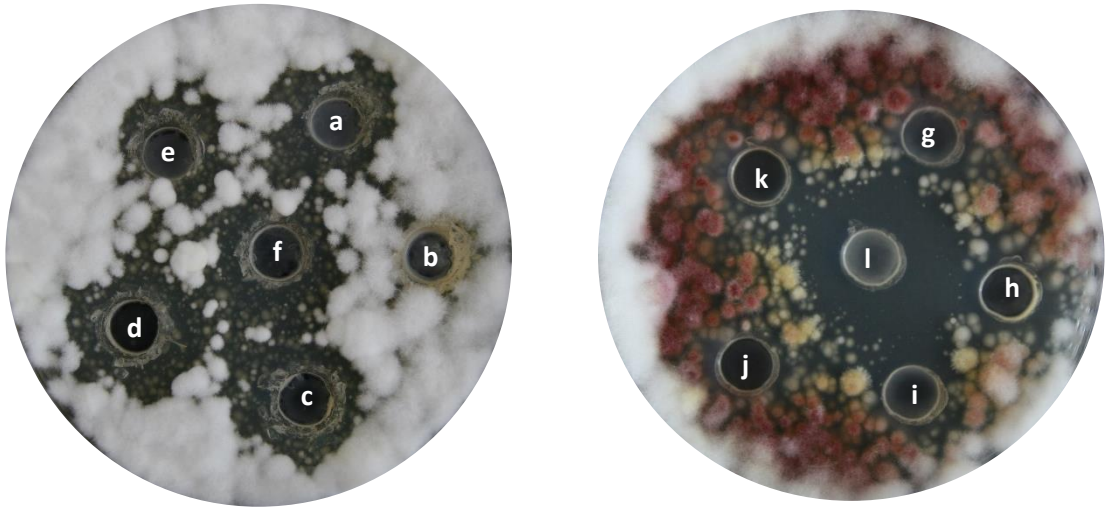




**Fotografia 5. Strefy zahamowania wzrostu *F. avenaceum* (A) i *F. graminearum* (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – MYK213, b – MYK214, c – MYK206, d – MYK201, e – MYK203, f – MYK204, g – MYK220, h – MYK221, i – MYK218, j – MYK219, k – MYK217**

Źródło: fotografie własne

Podobnie, szeroki zakres aktywności fungistatycznej, odnotowano w przypadku izolatów z serii MLK. Wszystkie izolaty z tej serii wpływały na wzrost *F. culmorum*, jednakże tylko w przypadku izolatów MLK 303 i MLK 304 odnotowano strefy zahamowania wzrostu, natomiast pozostałe izolaty wpływały tylko na morfologię grzyba. Średnią wrażliwość na oddziaływanie izolatów z serii MLK wykazał grzyb z gatunku *F. graminearum*, którego wzrost hamowała niemal połowa izolatów. Trzy izolaty, MLK 311, 312 i 318, hamowały wzrost badanego grzyba na wysokim, dwa na średnim, a cztery na niskim poziomie. Analizując oddziaływanie bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK na wzrost *F. avenaceum* można zauważyć, że dominowały izolaty o niskiej aktywności antagonistycznej. W stopniu średnim rozwój grzybni *F. avenaceum* redukowany był przez izolaty MLK 301, 303, 306 i 318, natomiast izolat MLK 304 hamował wzrost grzybni w stopniu wysokim. Omawiany mikroorganizm wskaźnikowy nie był wrażliwy na działanie siedmiu izolatów z serii MLK, a izolat MLK 322 wpłynął jedynie na zmianę zabarwienia grzybni w głębszej *F. avenaceum*. Izolaty bakterii z serii MLK, podobnie jak izolaty bakterii z serii MYK, wykazały największą aktywność antygrzybową względem *F. equiseti*. Grzyb ten nie był wrażliwy jedynie na oddziaływanie izolatu MLK 307, natomiast MLK 312 wpłynął tylko na jego cechy morfologiczne.



**Fotografia 6. Strefy zahamowania wzrostu *F. avenaceum* (A) i *F. graminearum* (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – MLK305, b – MLK307, c – MLK306, d – MLK303, e – MLK302, f – MLK304, g – PKK100, h – PKK103, i – PKK 104, j – MLK316, k – MLK317; MLK318**

Źródło: fotografie własne

Przeprowadzone i omówione powyżej badania stanowiły pierwszy etap doświadczeń, dzięki którym oceniono potencjał wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej w zakresie ich aktywności fungistatycznej. Na podstawie uzyskanych wyników można było wytypować izolaty, których spektrum oddziaływania względem wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* było największe i spełniało założone kryterium aktywności. Łącznie przebadano 114 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, z czego 56 wybrano do dalszych analiz, natomiast 58 izolatów odrzucono (tabela 18).

**Tabela 18. Zestawienie izolatów bakterii fermentacji mlekowej spełniających/niespełniających założonych kryteriów aktywności fungistatycznej dla poszczególnych serii**

	Liczba/procent izolatów z danej serii spełniających założone kryteria aktywności fungistatycznej						
	JKK	PKK	JSK	PSK	AK	MYK	MLK
Liczba/procent izolatów spełniających minimalne kryteria aktywności fungistatycznej	6 60,0%	4 80,0%	11 73,3%	1 14,3%	1 3,2%	15 68,2%	18 75,0%
Liczba/procent izolatów niespełniających minimalnych kryteriów aktywności fungistatycznej	4 40,0%	1 20,0%	4 26,7%	6 85,7%	30 96,8%	7 31,8%	6 25,0%
Łączna liczba/procent izolatów wybranych do dalszych badań	56 49,1%						
Łączna liczba/procent izolatów odrzuconych	58 58,9%						

Źródło: na podstawie badań własnych

Dane w powyższej tabeli wskazują na zależność pomiędzy aktywnością fungistatyczną badanych izolatów a źródłem izolacji i warunkami inkubacji. W przypadku bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszonek z kukurydzy zdecydowanie silniejsze oddziaływanie fungistatyczne wykazywały izolaty hodowane w temperaturze 30°C. Było to widoczne zwłaszcza w przypadku izolatów z serii AK, MYK i MLK, pochodzących z tego samego źródła. W odniesieniu do tych serii odnotowano duże różnice w zakresie aktywności fungistatycznej względem grzybów *Fusarium* w zależności od warunków, w jakich namnażano wyizolowane bakterie. W serii AK, obejmującej izolaty bakterii hodowane w temperaturze 37°C, tylko jeden izolat został zakwalifikowany do dalszych oznaczeń, a trzydzieści pozostałych zostało odrzuconych. W grupie izolatów hodowanych w temperaturze 30°C (seria MYK i MLK) procent bakterii, spełniających ustalone wcześniej założenia, wyniósł odpowiednio 68,2 oraz 75%. W przypadku kiszonki z kukurydzy, z której wyizolowano bakterie w ramach serii JKK i PKK, również odnotowano lepsze rezultaty dla bakterii hodowanych w temperaturze 30°C. Warto podkreślić, że seria PKK obejmowała 80% izolatów wybranych do dalszych badań. Z kolei w przypadku izolatów pochodzących z sianokiszonki (serie JSK i PSK) zdecydowanie szerszy zakres oddziaływania wobec testowanych grzybów, wykazywały bakterie hodowane w 37°C. Z grupy tej 73,3% izolatów wybrano do dalszych badań. Wśród bakterii wyizolowanych w ramach serii PSK, tylko jeden izolat charakteryzował się pożądaną aktywnością fungistatyczną, co stanowiło 14,3% izolatów z tej serii (85,7% izolatów odrzuconych).

Aktywność fungistatyczna bakterii fermentacji mlekowej względem różnych gatunków grzybów strzępkowych jest powszechnie znana i od wielu lat stanowi obiekt badań naukowych. Jednakże, właściwości przeciwdrobnoustrojowe bakterii fermentacji mlekowej, w tym również antagonizm wobec grzybów, należą do cech szczepozależnych, i wynikać mogą ze zróżnicowanych interakcji, jakie zachodzą pomiędzy bakteriami a grzybami strzępkowymi (Klewicka i Lipińska, 2016). Dlatego też prowadzone są liczne badania naukowe z zakresu poszukiwania nowych szczepów zdolnych do ograniczania rozwoju grzybów pleśniowych, przydatnych do zastosowania w warunkach produkcyjnych czy polowych. Wielu autorów, w pracach badawczych oraz przeglądowych, podkreśla szerokie spektrum oddziaływania bakterii fermentacji mlekowej wobec grzybów strzępkowych, w tym również wobec gatunków toksynotwórczych. Biorąc pod uwagę bezpieczeństwo zdrowotne oraz jakość żywności i pasz, spośród licznej grupy grzybów strzępkowych, najistotniejsza jest wrażliwość takich gatunków jak *Fusarium*, *Aspergillus*,

*Penicillium* czy *Alternaria* na bakterie fermentacji mlekowej. Należy jednak podkreślić, że inhibicyjne oddziaływanie bakterii fermentacji mlekowej stwierdzono między innymi także dla grzybów strzępkowych z rodzaju *Cladosporium*, *Monilia*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Cochliobolus*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* czy *Pythium*. Do najlepiej przebadanych pod względem aktywności fungistatycznej bakterii fermentacji mlekowej należą bakterie z rodzajów: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* oraz *Enterococcus*. Szeroki zakres badań tej grupy mikroorganizmów jest podyktowany głównie ich powszechnym udziałem w produkcji żywności i pasz. Jednakże, w zależności od konkretnego gatunku i szczepu, jak również w zależności od mikroorganizmu wskaźnikowego, dane literaturowe przedstawiają zróżnicowane oddziaływanie antagonistyczne bakterii mlekowych wobec grzybów strzępkowych (Magnusson, 2003; Schürer i Magnusson, 2005; Daliè, Deschamps i Richard-Forget, 2010; Crowley i.in., 2013; Oliveira, Zannini i Arendt 2014; Klewicka i Lipińska 2016).

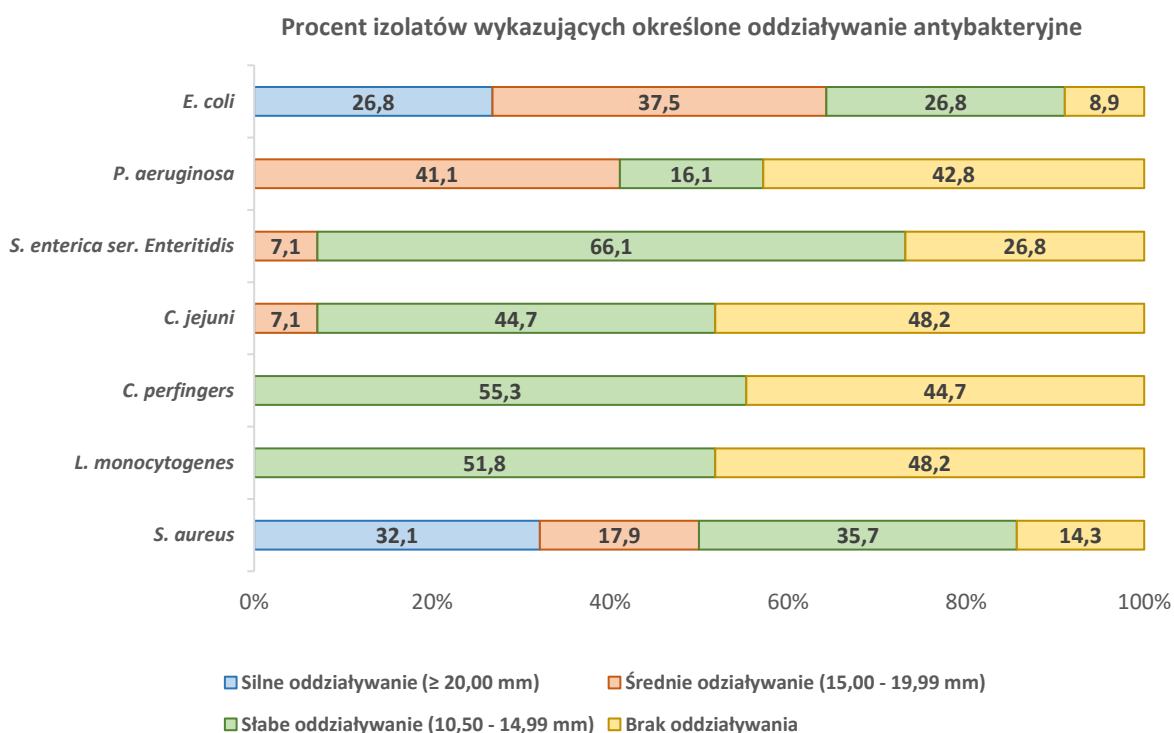
Coraz częściej można w literaturze znaleźć dane w zakresie antagonistycznego oddziaływania bakterii LAB w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*. Kluczyńska (2013) przebadła 45 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy, względem czterech grzybów z rodzaju *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* i *F. oxysporum*. Najsilniejsze działanie stwierdzono wobec grzybów: *F. avenaceum* oraz *F. oxysporum*, czego efektem były strefy zahamowania wzrostu sięgające od 11,50 do 16,00 mm. W niniejszej pracy również największą wrażliwość, na podobnym poziomie, wykazywał szczep *F. avenaceum*. Podobną wrażliwość na działanie bakterii fermentacji mlekowej w prezentowanej pracy wykazywał również *F. equiseti*. Kluczyńska 2013 w przypadku grzyba *F. culmorum* autorka zaobserwowała jedynie zmiany morfologiczne grzybni, nie odnotowała natomiast żadnego wpływu na wzrost *F. graminearum*. W prezentowanej pracy oba wspomniane wyżej grzyby strzępkowe również wykazywały najmniejszą wrażliwość na oddziaływanie badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Jednakże niektóre izolaty LAB wykazywały działanie fungistatyczne na wysokim poziomie w stosunku do tych mikroorganizmów wskaźnikowych, co było szczególnie widoczne w odniesieniu do *F. graminearum*, którego wzrost był silnie ograniczany przez niektóre bakterie hodowane w 30°C. Podobne rezultaty przedstawili Gwiazdowski, Kluczyńska i Gwiazdowska (2013), analizując wpływ bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonek paszowych, na wzrost siedmiu gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium*. Autorzy odnotowali najwyższą wrażliwość na oddziaływanie bakterii LAB w stosunku do *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* oraz *F. langsethiae*

(według przyjętych w niniejszej pracy kryteriów było to hamowanie wzrostu grzybni na poziomie niskim i średnim), natomiast gatunki: *F. culmorum* i *F. graminearum* okazały się mało lub w ogóle niewrażliwe. Warto jednak podkreślić, iż zarówno Kluczyńska (2013) jak i Gwiazdowski, Kluczyńska i Gwiazdowska (2013) hodowali izolaty bakterii fermentacji mlekowej wyłącznie w temperaturze 37°C. W prezentowanej pracy bakterie LAB hodowano dodatkowo w temperaturze 30°C, co mogło wpływać ich właściwości fungistatyczne. Hamowanie wzrostu *Fusarium graminearum* przez bakterie z grupy LAB wykazali w swojej pracy również Dogi i in. (2013). Autorzy przebadali dwa szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: *L. rhamnosus* RC007 i *L. plantarum* RC009, wyizolowane z kiszonki z kukurydzy. We wspomnianym opracowaniu oba szczepy znacząco wpływały na wzrost *F. graminearum* Z3636, różniąc się siłą oddziaływania, w zależności od warunków, w jakich prowadzono doświadczenie. Dodatkowo autorzy wykazali działanie fungistatyczne badanych szczepów względem wytwarzającego aflatoksyny szczepu *A. parasiticus* NRRL2999. Z kolei Cizeikiene, Juodeikiene, Paskevicius i Bartkiene (2013) wykazali aktywność fungistatyczną pięciu szczepów bakterii fermentacji mlekowej (*L. sakei* KTU05-6, *P. acidilactici* KTU05-7, *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9 oraz KTU05-10), wyizolowanych z zakwasu ryżowego poddanego spontanicznej fermentacji, względem jedenastu grzybów strzępkowych, w tym dwóch z rodzaju *Fusarium* (*F. culmorum* L-2 i *F. solani* 4-SA). W swojej pracy analizowali wpływ supernatantów otrzymanych z hodowli badanych bakterii bez zmiany pH jak również po neutralizacji pH do poziomu 6,5. W przypadku *F. culmorum* L-2 dla wszystkich badanych szczepów bakterii mlekowych odnotowane zostało bardzo wysokie zahamowanie wzrostu grzybni, przy jednoczesnym braku oddziaływania na wzrost grzyba *F. solani*. W stosunku do pozostałych mikroorganizmów wskaźnikowych, takich jak *A. niger* MD-029 czy *P. chrysogenum* 48-L, autorzy odnotowali jedynie spowolnione tworzenie zarodników lub brak jakiegokolwiek oddziaływania. Aktywność fungistatyczną bakterii fermentacji mlekowej względem *F. graminearum* zaobserwowali również w swoich badaniach Franco, Garcia, Hirooka, Ono i dos Santos (2011). W swojej pracy przebadali sześć szczepów *Lactobacillus plantarum*, wyizolowanych między innymi z ziarna, otrębów i kiełków pszenicy oraz mąki pszennej, jak również *L. pentosus* SI i *L. paracasei* sp. *paracasei* K VI (wyizolowane kolejno z zakwasu i ziaren kefirowych). Autorzy odnotowali zahamowanie wzrostu *F. graminearum* IAPAR 2218 przez badane izolaty bakterii mlekowych na poziomie słabym (do 15 mm), średnim (16 – 30 mm) i wysokim (31 – 45 mm). W prezentowanej pracy podobne rezultaty,

w zakresie hamowania wzrostu *F. graminearum*, uzyskano dla niektórych izolatów z serii MYK (wzrost grzybni zahamowany w zakresie 11,50 – 27,00 mm) oraz MLK (wzrost grzybni zahamowany w zakresie od 11,00 do 29,00 mm). Bakterie fermentacji mlekowej pochodzące z materiału roślinnego, w tym takie szczepy jak *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. delbruecki* i *L. casei*, w zakresie aktywności fungistatycznej przebadali także Lipińska i in. (2016). Badane przez autorów bakterie hamowały wzrost grzybni *F. lanecium* (strefy zahamowania wzrostu od 5 do 16 mm odnotowano między innymi w przypadku *L. brevis* 0944 i 0980, *L. plantarum* 0982, *L. pentosus* 0979 oraz *L. casei* 1020). Stwierdzono również antagonistyczne oddziaływanie badanych szczepów LAB wobec grzybów: *A. niger* 0433, *A. alternata* 0409, *A. brassicicola* 0412 czy *M. hiemalis* 0519. Bardzo wysoki stopień inhibicji wzrostu *F. graminearum* przez bakterie kwasu mlekowego wykazali Gerez, Torres, Font de Valdez i Rollán (2013), badając izolaty pochodzące między innymi z kiszonek, kapusty, groszku, soku jabłkowego, mięsa czy produktów mlecznych, jak również szczepy pochodzące ze światowej kolekcji. W zaprezentowanych przez nich wynikach aż 96% badanych szczepów hamowało wzrost *F. graminearum* CH 103 na poziomie 80 – 100%. W przypadku *Penicillium* sp. CH 102 autorzy również uzyskali wysoki stopień inhibicji (80 – 100%) przez większość analizowanych szczepów bakterii mlekowych, natomiast wzrost *A. niger* CH 101 hamowany był w mniejszym stopniu. Aktywność antygrzybową bakterii fermentacji mlekowej, pochodzących z jogurtu i mleka, wykazali w swoich badaniach Hamed i in (2011), którzy zaobserwowali umiarkowany lub słaby wpływ badanych bakterii na wzrost *F. oxysporum*. Właściwości fungistatyczne bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec *F. oxysporum*, przedstawione zostały również w pracy Dhamale, Sonawane, Jaybhaye i Chand (2015).

### 7.2.2. Aktywność antybakteryjna izolatów bakterii fermentacji mlekowej

Dodatkowym kryterium selekcji badanych izolatów, zastosowanym w niniejszej pracy było określenie ich aktywności antybakteryjnej. Z jednej strony parametr ten umożliwiał dalszą selekcję, ale jednocześnie stanowił dodatkową zaletę badanych izolatów, istotną z punktu widzenia potencjalnej komercjalizacji oraz możliwości konkurowania badanych bakterii z dostępnymi na rynku preparatami. W tym etapie 56 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wybranych w oparciu o ich właściwości fungistatyczne, przebadano pod kątem właściwości antybakteryjnych wobec wybranych patogenów (tabela 7). Oznaczenie oddziaływania przeciwbakteryjnego wykonano metodą dyfuzji studzienkowej zgodnie z punktem 6.2.2 opisanym w części metodycznej. Aktywność antagonistyczną badanych izolatów względem mikroorganizmów wskaźnikowych podzielono na trzy stopnie oddziaływania: silny, średni oraz słaby. Zebrane wyniki przedstawiono na wykresie 2.



Wykres 2. Aktywność antybakteryjna badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej w zależności od siły oddziaływania

Źródło: na podstawie badań własnych

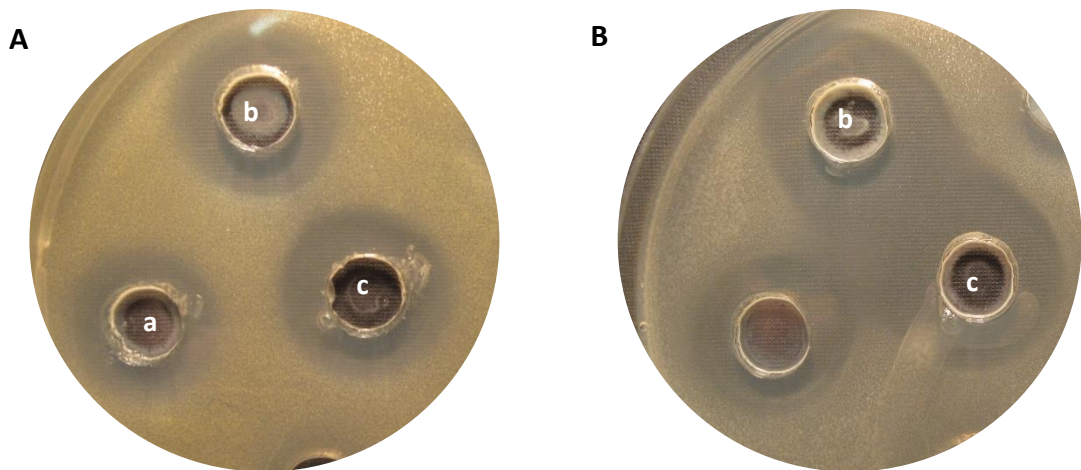
Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że aktywność antybakteryjna badanych izolatów różniła się w zależności od mikroorganizmu wskaźnikowego jak i izolatu bakterii fermentacji mlekowej. Zdecydowanie największą wrażliwością na działanie

izolatów charakteryzowały się bakterie: *S. aureus* oraz *E. coli*. Tylko w przypadku tych dwóch mikroorganizmów wskaźnikowych badane izolaty wykazały silne oddziaływanie antagonistyczne ( $\geq 20,00$  mm strefa zahamowanego wzrostu). W tym zakresie wzrost bakterii *S. aureus* był hamowany przez 32,1% izolatów, natomiast rozwój bakterii *E. coli* przez 26,8% izolatów. Jednocześnie, najmniejsza liczba izolatów bakterii fermentacji mlekowej cechowała się brakiem oddziaływania antagonistycznego wobec *E. coli* i *S. aureus* – kolejno 8,9 i 14,3%. Pozostałe izolaty hamowały wzrost *S. aureus* i *E. coli* w stopniu średnim (15,00 – 18,99 mm) i słabym (10,50 – 14,99 mm), przy czym szczep *E. coli* cechował się większą wrażliwością, ponieważ większy procent izolatów hamował wzrost tej bakterii w stopniu średnim. Najmniejszą wrażliwość na działanie badanych izolatów wykazały bakterie: *C. jejuni*, *C. perfringens* oraz *L. monocytogenes*. W stosunku do tych trzech mikroorganizmów odnotowano największy procent izolatów bakterii fermentacji mlekowej, nie wykazujących żadnej aktywności antybakteryjnej (44,7% dla *C. perfringens* oraz 48,2% dla *C. jejuni* i *L. monocytogenes*), podczas gdy pozostałe izolaty hamowały wzrost tych mikroorganizmów w stopniu słabym. Znaczna część izolatów, aż 42,8%, nie wykazywała aktywności antybakteryjnej również względem *P. aeruginosa*, niemal 60% izolatów hamowało natomiast wzrost tego mikroorganizmu w stopniu słabym i średnim. Wzrost bakterii *Salmonella enterica* ser. Enteritidis był hamowany w stopniu słabym przez ponad 60% izolatów bakterii fermentacji mlekowej, podczas gdy 26,8% badanych bakterii nie wykazywała żadnego oddziaływania wobec tego mikroorganizmu, 7,1% izolatów hamowało jej wzrost w stopniu średnim.



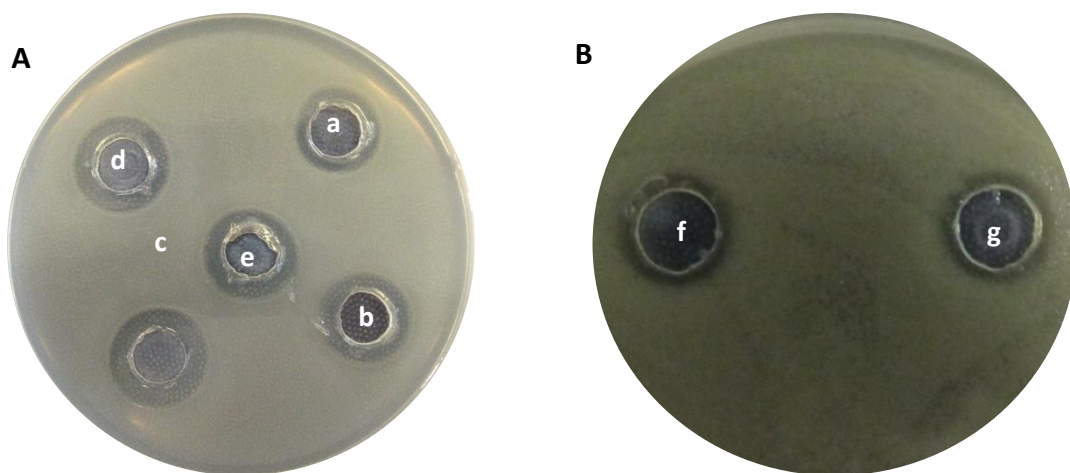
Fotografia 7. Strefy zahamowania wzrostu *S. enterica* ser. Enteritidis przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej: a – MYK 210, b – MLK 315, c – MLK 320, d – MLK 316, e – MLK 322, f – MLK 313 i g – MLK 324





Fotografia 8. Strefy zahamowania wzrostu *S. aureus* (A) i *E. coli* (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – 304, b – 305 i c – 306

Źródło: fotografie własne



Fotografia 9. Strefy zahamowania wzrostu *P. aeruginosa* (A) i *C. jejuni* (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – 021, b – 22 i c – 023, d - 024, e - 025 i seri JKK: f - 009, g - 010

Źródło: fotografie własne

Przeprowadzone doświadczenie pozwoliło na kolejną selekcję izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Na tym etapie badań założono, że do następnego etapu badań zostaną wybrane izolaty, które wykazują aktywność antagonistyczną względem wszystkich wykorzystanych mikroorganizmów wskaźnikowych. Przyjmując wyżej wspomniane kryterium selekcji, wybrano 27 izolatów bakterii mlekowych, które cechowały się najszerszym spektrum oddziaływania antybakteryjnego (tabele 19 i 20).

Tabela 19. Zakres aktywności antybakteryjnej wybranych izolatów z sianokiszonki

Izolat	Mikroorganizmy wskaźnikowe względem których stwierdzono oddziaływanie w stopniu:		
	Silnym (średnica strefy ≥20,00 mm)	Średnim (średnica strefy 15,00 – 19,99 mm)	Słabym (średnica strefy 10,50 – 14,99 mm)
JSK 021	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>E. coli</i>
JSK 022	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>E. coli</i>
JSK 025	<i>S. aureus</i>	<i>C. jejuni</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>S. enterica ser. Enteritidis</i>
JSK 026	<i>S. aureus</i>	<i>C. jejuni</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>S. enterica ser. Enteritidis</i>
JSK 028	<i>S. aureus</i>	<i>C. jejuni</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>S. enterica ser. Enteritidis</i>
JSK 029	<i>S. aureus</i>	<i>C. jejuni</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>S. enterica ser. Enteritidis</i>
JSK 030	-	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>E. coli</i>
JSK 031	-	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
JSK 036	-	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
JSK 037	-	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
JSK 038	-	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
PSK 201	-	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> <i>Enteritidis</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>

Źródło: na podstawie badań własnych

Spośród bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z sianokiszonki (tabela 19), najszerszym zakresem aktywności antybakteryjnej cechowały się izolaty JSK 025, 026, 028 oraz 029, które hamowały wzrost *S. aureus* w stopniu silnym, natomiast w stopniu średnim hamowały wzrost *C. jejuni*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, a także wykazywały słabe oddziaływanie wobec *L. monocytogenes*, *C. perfringens* i *S. enterica ser. Enteritidis*. Silną aktywność antagonistyczną wobec *S. aureus* wykazywały izolaty JSK 021 i 022, jednakże wzrost pozostałych mikroorganizmów wskaźnikowych był hamowany w stopniu słabym za wyjątkiem *P. aeruginosa*, wobec którego stwierdzono oddziaływanie na poziomie

średnim. przez te izolaty. Najśłabszą aktywność antagonistyczną wykazały izolaty JSK 038 i PSK 201, które wykazywały oddziaływanie w stopniu średnim tylko w stosunku do jednego mikroorganizmu wskaźnikowego, podczas gdy wzrost pozostałych patogenów był hamowany w stopniu słabym. Izolaty JSK 030, 031, 036 i 037 hamowały wzrost dwóch lub trzech mikroorganizmów patogennych w stopniu średnim, a pozostałe w stopniu słabym. Warto podkreślić, iż w przypadku izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki najsilniej hamowanym mikroorganizmem był szczep *S. aureus*. Bakterie *P. aeruginosa* i *E. coli*, jak również *C. jejuni*, wykazywały mniejszą wrażliwość na działanie izolatów LAB. Z kolei najmniejszą wrażliwością charakteryzowały się bakterie *Salmonella enterica ser. Enteritidis*, *L. monocytogenes* oraz *C. perfingens*.

Analizując zakres aktywności antybakteryjnej wybranych bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy (tabela 20) można zaobserwować, że większość izolatów wykazywała działanie antagonistyczne w stopniu silnym wobec bakterii *S. aureus* i/lub *E. coli*. Średnie wielkości stref zahamowania wzrostu obserwowano najczęściej w stosunku do bakterii: *P. aeruginosa* i *S. Enteritidis*. Bakterie: *L. monocytogenes* i *C. perfingens* ponownie okazały się najmniej wrażliwe na oddziaływanie badanych izolatów, a wzrost *C. jejuni* hamowany był jedynie w stopniu słabym. Porównując przebadane izolaty bakterii fermentacji mlekowej, można zauważyć, że najsilniejsze właściwości antybakteryjne wykazały izolaty MLK 305, 306, 310, 312 oraz 320, które w stopniu silnym i średnim hamowały wzrost dwóch mikroorganizmów wskaźnikowych, natomiast wzrost trzech bakterii był hamowany w stopniu słabym. Z kolei najśłabsze działanie przeciwbakteryjne demonstrował izolat, PKK 100, który wykazywał jedynie słabe oddziaływanie wobec testowanych mikroorganizmów wskaźnikowych.

Tabela 20. Zakres aktywności antybakteryjnej wybranych izolatów z kiszonki z kukurydzy

Izolat	Mikroorganizmy wskaźnikowe względem których stwierdzono oddziaływanie w stopniu:		
	Silnym (średnica strefy ≥20,00 mm)	Średnim (średnica strefy 15,00 – 19,99 mm)	Słabym (średnica strefy 10,50 – 14,99 mm)
JKK 006	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>E. coli</i>
JKK 009	<i>S. aureus</i>	-	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>E. coli</i>
PKK 100	-	-	<i>S. aureus</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
MYK 210	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
MYK 220	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
MLK 304	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>P. aeruginosa</i>
MLK 305	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i>
MLK 306	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	-	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>C. jejuni</i>
MLK 310	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i>
MLK 312	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i>
MLK 313	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
MLK 315	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis
MLK 316	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis
MLK 320	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i>
MLK 322	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica ser.</i> Enteritidis <i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i>
MLK 324	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. perfringens</i> <i>C. jejuni</i> <i>S. enterica ser.</i> Enteritidis

Źródło: na podstawie badań własnych

Aktywność antybakteryjna bakterii fermentacji mlekowej jest dobrze znana i szeroko opisana w literaturze. Niemniej jednak, podobnie jak właściwości fungistatyczne, cecha ta jest w dużej mierze szczepozależna, dlatego też ciągle poszukiwane są nowe szczepy o szerokiej aktywności biologicznej. Przykładowo, Olofsson i in. (2014) określali w swoich

badaniach aktywność przeciwdrobnoustrojową bakterii mlekowych izolowanych z przewodów pokarmowych pszczół miodnych. Autorzy przebadali 12 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (między innymi *L. kunkeei* Fhon2, *L. melliventris* Hma8 i *L. apis* Hma11) oraz cztery szczepy z rodzaju *Bifidobacterium* (np. *B. coryneforme* Bma6). W swojej pracy wykazali, iż badane szczepy bakterii mlekowych posiadają właściwości antagonistyczne względem takich patogenów jak *S. aureus* CR01, *P. aeruginosa* LE08, *E. coli* V517, *Klebsiella aerogenes* ClmpR czy *Serratia marcescens* NJ19 5c, a strefy zahamowania wzrostu badanych bakterii chorobotwórczych wynosiły od 8 – 49,00 mm w zależności od szczepu bakterii mlekowych jak i od mikroorganizmu wskaźnikowego. Z kolei Patel i in. (2013) stwierdzili, że bakterie *L. plantarum* AD29, *L. fermentum* A12, *Pediococcus parvulus* A11 i *Weissella cibaria* 142, wyizolowane z warzyw i produktów fermentowanych wykazywały oddziaływanie antagonistyczne względem *E. coli* ESBL, *Salmonella typhimurium* CCUG 11732, *Yersinia enterocolitica* CCUG 31004, *C. jejuni* ATCC 33560, *S. aureus* MRSA i *E. faecalis* CCUG 9997. W zależności od testowanego szczepu bakterii mlekowych zahamowanie wzrostu tych patogenów kształtowało się na poziomie od 40 do ponad 80%. Właściwości antibakteryjne bakterii fermentacji mlekowej badali również Leite i in. (2015). W swojej pracy autorzy wykazali aktywność antagonistyczną bakterii mlekowych izolowanych z ziaren kefirowych (między innymi *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *L. paracasei* oraz *Leuconostoc mesenteroides*) wobec takich patogenów jak *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* ser. *Enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 i *L. monocytogenes* ATCC 15313. We wspomnianej pracy największą wrażliwość na badane izolaty bakterii mlekowych wykazały bakterie *E. coli* (podobnie jak w niniejszej pracy) oraz *L. monocytogenes*, natomiast najmniej wrażliwy okazał się szczep *S. aureus*. Oguntoyinbo i Narbad (2015) stwierdzili działanie antibakteryjne szczepu *L. plantarum* ULAG24, wyizolowanego z fermentowanych produktów zbożowych, względem *S. enterica* LT2, wiążąc aktywność antagonistyczną z wytwarzanymi testowany szczep bakteriocynami. Również Ramos, Thorsen, Schwan i Jespersen (2013) przebadali kilka szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, izolowanych z fermentowanych produktów spożywczych (m.in. z kakao i kiełbasy), pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Autorzy stwierdzili aktywność antibakterijną *L. plantarum* CH3, *L. fermentum* CH58 i *L. brevis* SaU105 względem *L. monocytogenes* w zakresie 1 – 2 mm, natomiast strefy zahamowania wzrostu bakterii *S. aureus* wyniosły 1 – 2 mm dla *L. fermentum* i ponad 4 mm dla *L. brevis*. Z kolei szczep *L. plantarum* nie wykazywał działania antagonistycznego względem *S. aureus*.

Ciekawe doświadczenie przedstawione zostało również w pracy Pieniz, Andreazza, Anghinoni, Camargo i Brandelli (2015), gdzie pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej sprawdzony został szczep *Enterococcus durans* LAB18s, wyizolowany z tradycyjnego brazylijskiego sera. Badając hodowlę wspomnianego szczepu, autorzy stwierdzili właściwości antagonistyczne względem m.in. *E. coli* (7,2 mm), *P. aeruginosa* (7,5 mm) i *Aeromonas hydrophila* (7,8 mm), natomiast w stosunku do bakterii *S. aureus*, *S. Enteritidis* oraz *Bacillus cereus* nie zaobserwowali aktywności antybakteryjnej. Jednakże, stosując wewnątrzkomórkowy ekstrakt z *E. durans* LAB18s, autorzy uzyskali efekt inhibicyjny wobec wszystkich wspomnianych powyżej patogenów. Działanie antybakteryjne stwierdzono również dla kultur starterowych (*L. delbreucki* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*) względem *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. aureus* w zakresie od 22,1 do 30,1 mm w zależności od badanego szczepu i mikroorganizmu wskaźnikowego (Lafta, Jarallah i Darwash, 2014). Porównując uzyskane w prezentowanej pracy rezultaty warto podkreślić, że bakterie *S. aureus*, obok *E. coli* i *P. aeruginosa*, wykazały największą wrażliwość, na oddziaływanie badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Tym samym, stanowi to ich cenną właściwość, przydatną w komponowaniu preparatów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Z analizy literatury można stwierdzić, że działanie antybakteryjne bakterii fermentacji mlekowej różni się w zależności od szczepu, jak również od drobnoustroju patogennego. Zróżnicowana wrażliwość bakterii chorobotwórczych, niepożądanych w żywności i paszach, na działanie bakterii fermentacji mlekowej jest często podkreślana przez wielu autorów. Przykładowo, Kizerwetter-Swida i Binek (2005) wskazali większą aktywność antagonistyczną bakterii mlekowych w stosunku do bakterii gramdodatnich (np. *C. perfingens* i *S. aureus*) niż gramujemnych, jak *Salmonella* sp. czy *E. coli*. W niniejszej pracy stwierdzono największą wrażliwość gramdodatniego szczepu *S. aureus* na działanie badanych izolatów, jednakże podobną wrażliwość wykazywały gramujemne bakterie *P. aeruginosa* i *E. coli*. Z kolei Jin, Ho, Abdullah, Ali i Jalaludin (1996), jak również Taheri i in. (2009) w swoich pracach odnotowali większą efektywność bakterii fermentacji mlekowej w zakresie hamowania wzrostu *Salmonella* sp. niż w przypadku bakterii *E. coli*. W prezentowanej pracy bakterie *E. coli* cechowały się natomiast zdecydowanie wyższą wrażliwością na działanie badanych izolatów w porównaniu z *S. enteritica* ser. *Enteritidis*, której wzrost w większości przypadków hamowany była w stopniu słabym.

Magnusson, Ström, Roos, Sjögren, i Schnürer (2003) wskazali trzy mechanizmy, które mogą być powiązane z aktywnością przeciwdrobnoustrojową bakterii fermentacji mlekowej. Pierwszy mechanizm związany jest z konkurencją o składniki pokarmowe, drugi mechanizm dotyczy profilu oraz stężenia produkowanych kwasów organicznych, natomiast trzeci mechanizm powiązany jest z szeroką gamą produkowanych przez LAB związków, które wykazują oddziaływanie antagonistyczne wobec mikroorganizmów. Konkurencja o przestrzeń życiową i składniki odżywcze jest jednym z podstawowych mechanizmów, którym charakteryzują się wszystkie mikroorganizmy, należy jednak podkreślić, iż zjawisko to jest bliżej scharakteryzowane i opisane dla grzybów strzępkowych lub drożdży, niż dla bakterii (Grzegorzczak i in., 2015; Gwiazdowski, 2016). Niemniej jednak, bakterie fermentacji mlekowej, wykorzystując wspomniany mechanizm konkurencji, mogą skutecznie ograniczyć mikroorganizmom patogennym rozwój w surowcach roślinnych lub produktach (Oliveira i in., 2014). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii kwasu mlekowego wynika przede wszystkim z ich zdolności do syntezowania szerokiej gamy antagonistycznych metabolitów, wśród których można wymienić między innymi kwasy organiczne (mlekowy, octowy, propionowy, mrówkowy, fenylomlekowy, hydroksylfenylomlekowy) oraz związki o działaniu antagonistycznym, takie jak dwutlenek węgla, etanol, kwasy tłuszczowe, diacetyl, acetoina, fenylomleczan, cykliczne dipeptydy, nadtlenuk wodoru, reuteryna, bakteriocyny czy inne produkty białkowe (Amanatidou, Smid i Gorris, 2001; Schürer i Magnusson, 2005, Muhialdin, Hassan i Sadon, 2011a; Reis, Paula, Casarotti i Penna, 2012; Pawłowska, Zannini, Coffey i Arendt, 2012; Oliveira i in., 2014).

Do najlepiej poznanych związków o charakterze przeciwgrzybowym, produkowanych przez bakterie fermentacji mlekowej, należą kwasy organiczne. Związki te są końcowym produktem fermentacji węglowodorów, które wytwarzane są w różnych stężeniach przez bakterie kwasu mlekowego. W największym stężeniu produkowany jest kwas mlekowy oraz octowy, stanowiąc metabolity pierwszorzędowe. Niektóre gatunki bakterii fermentacji mlekowej są zdolne do wytwarzania w trakcie procesów fermentacyjnych również innych kwasów organicznych (propionowy, salicylowy, mrówkowy, heksanowy, bursztynowy, 3-fenyl- i 4-hydroksyfenylomlekowy), które zalicza się do metabolitów wtórnych (drugorzędowych) (Magnusson, 2003; Mu, Yang, Jia, Zhang i Jiang., 2010; Belguesmia i in., 2014; Klewicka i Lipińska, 2016). Większość bakterii fermentacji mlekowej należy do grupy bakterii homofermentatywnych, produkując głównie kwas mlekowy, natomiast bakterie z grupy heterofermentatywnych (jak ob. *Lactobacillus buchneri* i *L. brevis*), wytwarzają

większe stężenia kwasu octowego oraz w śladowych ilościach, kwas propionowy (Schürer i Magnusson 2005; Zielińska i in. 2006; Wróbel 2012). Aktywność biologiczna kwasów organicznych związana jest z obniżaniem pH środowiska, w jakim są obecne, wykazując oddziaływanie antagonistyczne względem wielu mikroorganizmów (Eklund, 1989). Działanie przeciwdrobnoustrojowe kwasów organicznych polega na dyfuzji niezdysoncjowanych form kwasu o wyższej hydrofobowości, przez błonę komórkową docelowego mikroorganizmu i w efekcie, po zdysocjowaniu wewnątrz komórki oraz uwolnieniu jonów wodorowych, zredukowaniu pH cytoplazmy i zahamowaniu aktywności metabolicznej komórek (Piard i Desmauzeaud, 1991; Magnusson, 2003; Schürer i Magnusson, 2005; Daliè, Deschamps i Richard-Forget, 2010). Oprócz obniżenia pH wewnątrz komórki, kwasy organiczne mogą również wpłynąć na zmniejszenie lub zneutralizowanie potencjału elektrochemicznego błony komórkowej, zwiększając jej przepuszczalność, a tym samym prowadząc do zahamowania wzrostu mikroorganizmu lub jego obumierania (Eklund, 1989; Batish, Roy, Lail i Grower, 1997; Schürer i Magnusson, 2005; Daliè, Deschamps i Richard-Forget, 2010; Klewicka i Lipińska, 2016). Kwas octowy oraz propionowy wykazują ponadto zdolność do inhibicji wiązania aminokwasów w komórkach mikroorganizmów, na które działają (Freese, Sheu i Galliers, 1973; Eklund, 1989; Magnusson, 2003). Warto również wspomnieć, iż wyższą aktywność fungistatyczną przypisuje się kwasom: octowemu i propionowemu, ze względu na wyższy (w stosunku do kwasu mlekowego) stopień dysocjacji wewnątrz komórki (Batish i in., 1997; Dang, Vermeulen, Ragaert i Devlieghere, 2009; Crowley i in., 2013). Jest to związane z wyższą wartością współczynnika pKa kwasu octowego i propionowego, które wynoszą kolejno 4,76 i 4,87 (pKa kwasu mlekowego wynosi 3,86) (Piard i Desmauzeaud, 1991; Lind, Jonsson i Schnurer, 2005). Należy jednak pamiętać, że działanie antagonistyczne kwasu octowego i propionowego często zależy od pH środowiska, które wcześniej jest obniżane przez kwas mlekowy (Freese i in., 1973; Eklund, 1989; Schürer i Magnusson, 2005). Kolejnym przykładem kwasu organicznego, któremu przypisuje się wysoką aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową, jest kwas 3-fenylomlekowy (PLA) (Crowley i in., 2013; Klewicka i Lipińska, 2016). Produkcja PLA przez bakterie fermentacji mlekowej po raz pierwszy została opisana przez Lavermicocca i in. (2000), którzy stwierdzili obecność PLA, jak również jego pochodnej – kwasu 4-hydroksyfenylomlekowego (OH-PLA), w supernatancie bakterii *L. plantarum* 21B. Jak wynika z danych literaturowych, wiele szczepów bakterii mlekowych, między innymi *L. coryniformis*, *L. casei*, *L. reuteri*,



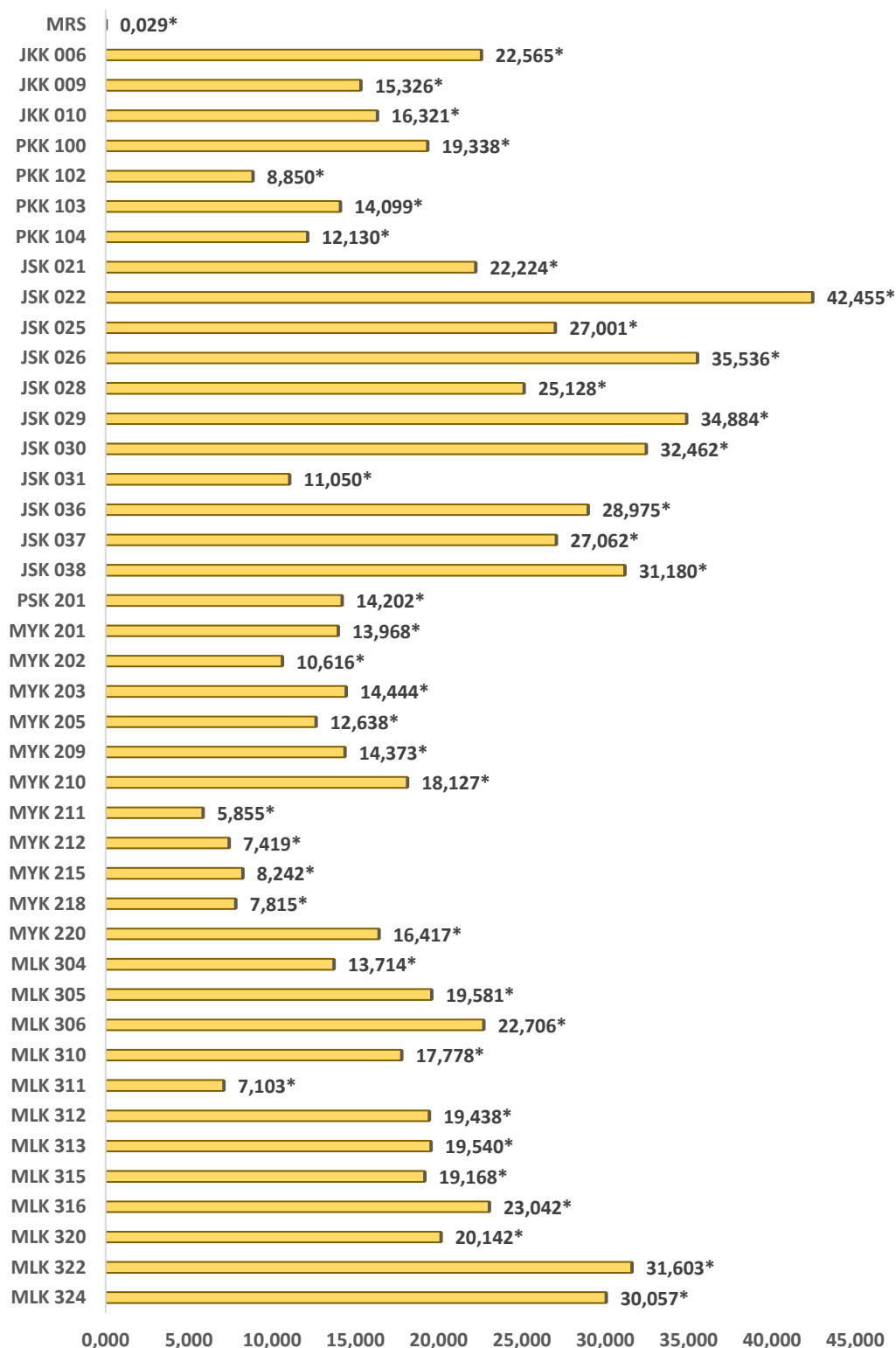
*L. rhamnosus*, *L. fermentum* czy *L. sakei*, jest zdolna do produkcji PLA jako wtórnego metabolitu fermentacji cukrów (Schürer i Magnusson, 2005; Mu i in., 2012; Crowley i.in., 2013; Klewicka i Lipińska, 2016). PLA wykazuje działanie bakteriobójcze, zarówno wobec bakterii gramdodatnich jak i gramujemnych, takich jak *L. monocytogenes*, *S. aureus* czy *E. coli* (Dieuleveux, Lemarinier i Gueguen, 1998), jak również wykazuje szerokie spektrum oddziaływania antagonistycznego względem grzybów strzępkowych (Crowley i.in., 2013; Klewicka i Lipińska 2016). Kwas ten charakteryzuje się aktywnością fungistatyczną względem takich grzybów jak *Aspergillus niger* FTDC3227 (Lavermicocca i in., 2000), *Penicillium verrucosum* i *P. citrinum* (Lavermicocca, Valerio i Visconti, 2003), *A. fumigatus* i *P. camemberti* (Prema, Smila, Palavesam i Immanuel, 2010), *Colletotrichum gleosporoides*, *A. flavus*, *B. cinerea*, *P. expansum* (Cortès-Zavaleta, López-Malo, Hernández-Mendoza i García 2014), jak również *F. oxysporum* (Wang, 2013). Bakterie fermentacji mlekowej wytwarzają również wiele innych kwasów organicznych o działaniu antygrzybowym. Przykładowo Ryan i in. (2011) wyodrębnili dziewięć kwasów karboksylowych, w tym kwas cynamonowy, salicylowy i D-glukuronowy, z hodowli *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280, które charakteryzowały się właściwościami fungistatycznymi. Broberg, Jacobsson, Ström, i Schnürer (2007) oznaczyli szeroką gamę kwasów karboksylowych o właściwościach przeciwgrzybowych w silosach inokulowanych bakteriami *L. plantarum* MiLAB 14 i *L. plantarum* MiLAB 393. Oprócz takich kwasów jak PLA czy OH-PLA, wykryto również obecność kwasu benzoesowego, waniliowego, ferulowego, kawowego, azealinowego czy p-kumarowego. Z kolei Guo i in. (2012), analizując antygrzybowe metabolity produkowane przez *L. reuteri*, oprócz kwasu mlekowego zidentyfikowali również bardziej złożone kwasy organiczne, takie jak (S)-(-)-2-hydroksyizokaprynowy, hydrocynamonowy, 4-hydroksybezoesowy czy DL-P-hydroksyfenylomlekowy. Wielu autorów podkreśla, iż antagonizm bakterii fermentacji mlekowej wynika z synergicznego działania różnych kwasów, jak również innych produkowanych związków antygrzybowych (Magnusson, 2003; Schürer i Magnusson, 2005; Daliè, Deschamps i Richard-Forget, 2010; Crowley i.in., 2013; Aunsbjerg i in., 2015; Klewicka i Lipińska, 2016). Przykładowo minimalne stężenie hamujące (ang. Minimal Inhibitory Concentration – MIC) dla PLA względem grzybów *Aspergillus* spp. i *Penicillium* sp. wynosi 180 mM, przy czym produkowane stężenie tego kwasu przez LAB oscyluje w granicach od 0,1 do 0,5 mM. Również kwas mlekowy i octowy są wytwarzane w znacznie mniejszych stężeniach (kolejno 44,8 – 76,8 mM i 1,2 – 7,5 mM), niż wartości MIC tych kwasów (kolejno >500 mM oraz 83 – 125 mM), co wskazuje, że pojedynczo związki

te nie powinny oddziaływać antagonistycznie wobec grzybów strzępkowych (Ndagano, Lamoureux, Dortu, Vandermoten i Thonart, 2011; Aunsbjerg i in., 2015). Synergizm pomiędzy różnymi kwasami organicznymi można również wyjaśnić na podstawie badań przeprowadzonych przez Belguesmia i in. (2014). Badając aktywność fungistatyczną różnych mieszanin kwasów organicznych, w skład których wchodziły kwas octowy, heksanowy, mlekowy, L(-)-frnylomlekowy, bursztynowy i 2-pirolidyno-5-karboksylowy, produkowanych przez *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1NP, wykazali, że aktywność fungistatyczna wszystkich mieszanin była determinowana obecnością kwasu heksanowego.

### **7.2.3. Określenie zawartości wybranych kwasów organicznych produkowanych przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej**

Ze względu na istotną rolę kwasów organicznych w antagonizmie bakterii fermentacji mlekowej, również w niniejszej pracy określono ilość ważniejszych kwasów syntezowanych przez badane izolaty. W doświadczeniu określono stężenie kwasu mlekowego, octowego oraz propionowego, wytwarzanych przez 56 izolatów bakterii mlekowych (wybranych na podstawie badań z punktu 7.2.1) hodowanych na płynnym podłożu MRS przez 24 h. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń przedstawiono na wykresach 3 i 4 (wyniki dla 43 izolatów). Jak można zauważyć, dominującym produktem metabolizmu badanych izolatów był kwas mlekowy, którego stężenie wahało się między 5,855 a 42,456 mg/cm<sup>3</sup>. Można jednocześnie zaobserwować, że stężenie kwasu mlekowego w płynie pochodzącym różniło się w zależności od badanego izolatu. W największej ilości (powyżej 25 mg/ml) kwas mlekowy syntezowany był przez jedenaście izolatów bakterii fermentacji mlekowej, należących do serii JSK (9 izolatów) i MLK (2 izolaty). Najwyższe stężenie kwasu mlekowego odnotowano w hodowlach bakterii wyizolowanych z sianokiszonki, które inkubowano w temperaturze 37°C (seria JSK). W tej grupie bakterii, w hodowlach 9 izolatów stężenie kwasu mlekowego wynosiło od 25,13 do aż 42,46 mg/cm<sup>3</sup>. Trzydzieści izolatów wytwarzało kwas mlekowy w ilości od 12 do 25 mg/cm<sup>3</sup>, z czego dziesięć izolatów należało do serii MLK, dziewięć izolatów z serii MYK, trzy izolaty z serii PKK pięć izolatów z serii JKK (12,898 – 22,566 mg/ml) oraz po jednym izolacie z serii AK, JSK i PSK. Z kolei pozostałe piętnaście izolatów z różnych serii wytwarzało niewielką ilość kwasu mlekowego (do 12 mg/ml).

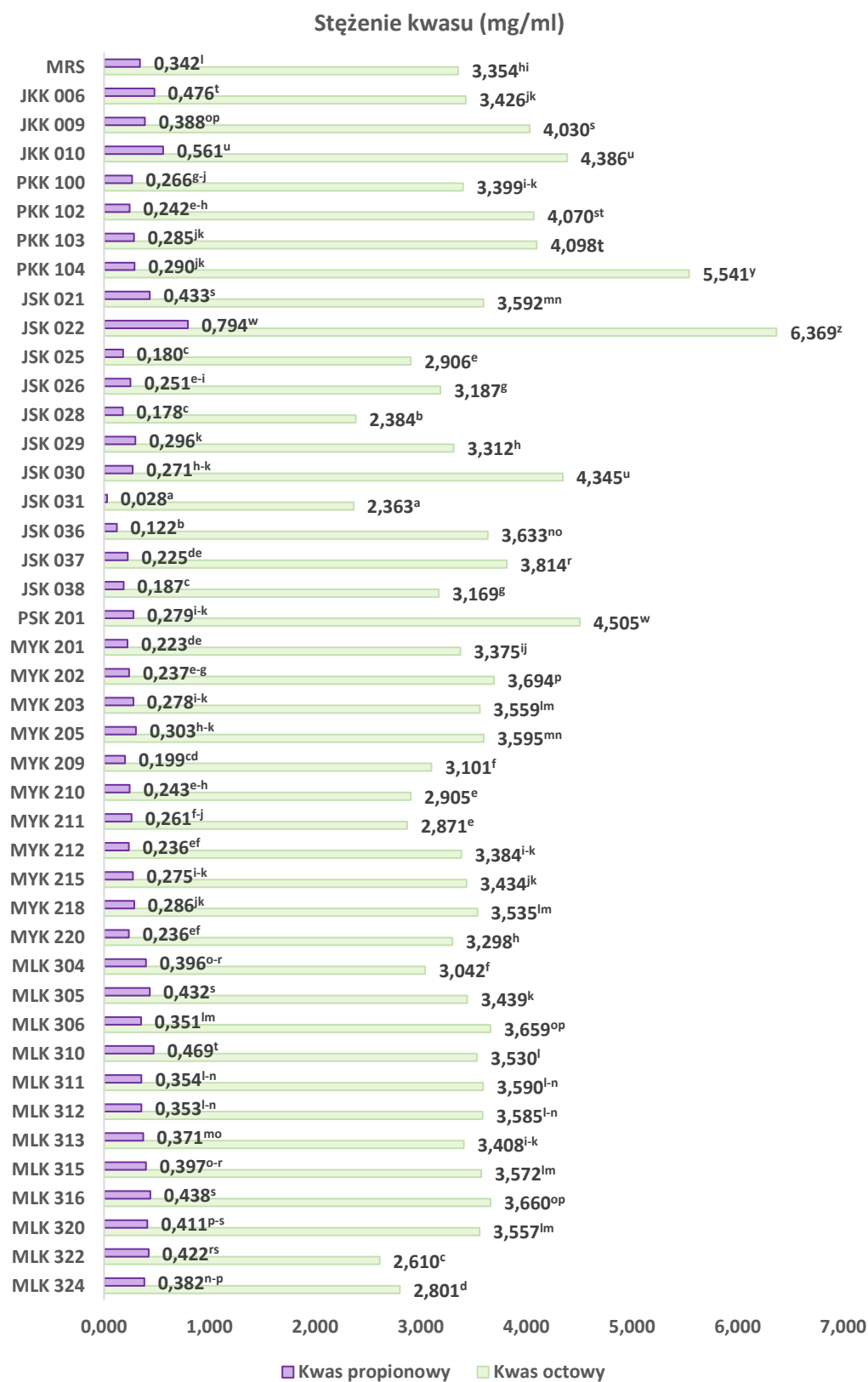
### Stężenie kwasu mlekowego (mg/ml)



\*średnie oznaczone gwiazdką różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 3. Zawartość kwasu mlekowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kiszzonek paszowych**

Źródło: na podstawie badań własnych



\*średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych kwasów różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 4. Zawartość kwasu octowego i propionowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kiszzonek paszowych**

Źródło: na podstawie badań własnych

Analizując zawartość kwasu octowego i propionowego w płynach pochodzących z hodowli badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej, należy podkreślić, iż kwasy te produkowane były w znacznie mniejszych ilościach niż kwas mlekowy. W największym stężeniu kwas octowy syntezowany był przez izolaty PKK 104 oraz JSK 022, gdzie ilość tego kwasu w płynie pochodzącym z hodowli wynosiła kolejno 5,541 i 6,369 mg/cm<sup>3</sup>. Izolaty JKK 009 i 010, PKK 102 i 103, JSK 030 oraz PSK 201, wytwarzały kwas octowy w stężeniu powyżej 4 mg/ml (w zakresie od 4,030 do 4,505 mg/ml). Natomiast większość izolatów wytwarzała kwas octowy w ilości poniżej 4 mg/cm<sup>3</sup>. W przypadku wszystkich badanych izolatów odnotowano niskie stężenia kwasu propionowego w płynach pochodzących z hodowli, przy czym izolat JSK 022 wytwarzał zdecydowanie największą ilość tego kwasu (0,794 mg/ml) w porównaniu z pozostałymi badanymi izolatami bakterii fermentacji mlekowej.

Jak wynika z przedstawionych danych, różnice w ilości produkowanych kwasów organicznych zależały głównie od izolatu, jak również mogły być związane z pochodzeniem czy warunkami hodowli bakterii. Potwierdzają to badania innych autorów. Przykładowo, Peyer i in. (2016) w swoich badaniach analizowali stężenie produkowanego kwasu mlekowego i octowego (oraz innych metabolitów) przez trzy szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (*L. brevis* L1105 i R2Δ oraz *L. plantarum* FST1.7) na podłożu MRS. Autorzy odnotowali różne stężenia oznaczanych kwasów organicznych w zależności od badanego szczepu, jak również zaobserwowali, że poszczególne szczepy syntezują różne ilości kwasu octowego i mlekowego w zależności od czasu czy temperatury inkubacji. Podobnie Marchwińska (2016) w swojej pracy wykazała, że bakterie fermentacji mlekowej, izolowane z treści jelitowych trzody chlewnej i drobiu, produkowały kwas mlekowy i octowy w różnych stężeniach, w zależności od badanego izolatu. Podobnie jak w niniejszej pracy, autorka stwierdziła, iż dominującym produktem metabolizmu izolatów bakterii mlekowych był kwas mlekowy, a kwas octowy i propionowy produkowane były w śladowych ilościach, co stanowiło zarazem potwierdzenie przynależności badanych mikroorganizmów do grupy LAB. Özcelik, Kuley i Özogul (2016) przebadali różne gatunki bakterii fermentacji mlekowej pod kątem wytwarzania kwasów organicznych (mlekowego, octowego, propionowego i bursztynowego) w rybnych bulionach (między innymi z sardeli i pstrąga) oraz bulionie MRS, odnotowując, że proporcje i stężenia poszczególnych kwasów organicznych w hodowlach bakterijnych były uzależnione od gatunku mikroorganizmu, jak również od rodzaju podłoża. Zalán, Hudáček, Štětina, Chumchalová i Halász (2010) również potwierdzili różnice w stężeniu produkowanych kwasów organicznych (takich jak mlekowy, octowy i

bursztynowy) w zależności od szczepu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Analizując zależność pomiędzy stężeniem kwasów organicznych, wytwarzanych przez badane izolaty bakterii fermentacji mlekowej, a ich właściwościami fungistatycznymi i antybakteryjnymi, można zauważyć, że kwasy organiczne odgrywają znaczącą rolę wspomagającą aktywność antagonistyczną bakterii mlekowych. Wynika to ze wspomnianego wcześniej synergistycznego oddziaływania różnych związków aktywnych, w tym kwasów organicznych, syntezowanych przez bakterie fermentacji mlekowej.

Kolejną wartą uwagi grupą związków wytwarzanych przez bakterie mlekowe, o charakterze przeciwdrobnoustrojowym oraz polepszającym właściwości sensoryczne produktów fermentowanych, są kwasy tłuszczowe oraz hydroksylowane kwasy tłuszczowe (Magnusson, 2003; Klewicka i Lipińska, 2016). Już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku zaobserwowane zostały właściwości przeciwdrobnoustrojowe kwasów tłuszczowych, a stopień ich aktywności antagonistycznej powiązany został z długością łańcucha węglowego (Woolford, 1975). Generalnie właściwości antybakteryjne i antygrzybowe kwasów organicznych wzrastają wraz z długością łańcucha węglowego, jednakże, ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie, alifatyczne kwasy powyżej 10 lub 11 atomów węgla w łańcuchu nie wykazują już dużej efektywności w porównaniu z innymi związkami o charakterze przeciwdrobnoustrojowym (Baird-Parker, 1980). Można jednak znaleźć w literaturze doniesienia o wysokiej aktywności biologicznej kwasów tłuszczowych, posiadających ponad 10 atomów węgla w łańcuchu. Przykładowo, Kabra (1983) wykazał, że kwasy tłuszczowe posiadające 12 – 16 atomów węgla, charakteryzowały się wyższą efektywnością przeciwdrobnoustrojową, wykazując jednocześnie właściwości podobne do detergentów. Podobnie Sjögren, Magnusson, Broberg, Schnürer i Kenne (2003) przypisali najwyższą aktywność fungistatyczną hydroksylovanemu kwasowi tłuszczowemu, którego łańcuch główny zbudowany był z 12 atomów węgla. Autorzy wyizolowali łącznie cztery hydroksylowane kwasy tłuszczowe (3-OB.-hydroksydekanowy, 3-hydroksy-5cis-dodekanowy, 3-OB.-hydroksydodekanowy oraz 3-OB.-hydroksytetradekanowy) z hodowli bakterii *L. plantarum* MiLAB 14, charakteryzujące się aktywnością fungistatyczną, dla których minimalne stężenie hamujące (MIC) wynosiło od 10 do 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Z kolei Bergsson, Arnfinnsson, Steingrímsson i Thormar, (2001) działając na komórki *Candida albicans* 10 mM związkami kwasów tłuszczowych wykazali, że jedynie kwas kaprynowy i laurynowy (kolejno 10 i 12 atomów węgla) charakteryzowały się skutecznym działaniem inhibicyjnym. Hydroksylowane kwasy tłuszczowe, takie jak kwas 3-hydroksydekanowy i 2-

2-hydroksy-4-metylopentanowy, w większym stężeniu, oznaczano wraz z innymi związkami o charakterze przeciugrzybowym, w kiszonkach inokulowanych *L. plantarum* MiLAB 393 oraz *L. plantarum* MiLAB 14 (Broberg i in., 2007). Ndagano i in. (2011) wykazali działanie antagonistyczne kwasu 2-hydroksy-4-metylopentanowego, pochodzącego ze skoncentrowanych supernatantów *L. plantarum* VE56 oraz *W. paramesenteroides* LC11, wobec grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, jako efekt synergicznego oddziaływania z innymi metabolitami. Brosnan, Coffey, Arendt i Furey (2012) zidentyfikowali sześć kwasów tłuszczowych, w tym 3-hydroksydekanowy i DL-β-hydroksymirystynowy, w supernatantach niektórych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, wykazujących właściwości fungistatyczne, natomiast Guo i in. (2012) wykazali zastosowanie trzech kwasów tłuszczowych, syntezowanych przez *L. reuteri* ee1p, w zwalczaniu dermatofitów. Z doniesień literaturowych wynika, że kluczową rolę w aktywności fungistatycznej kwasów tłuszczowych odgrywa struktura tych związków. Zakłada się, że najbardziej efektywne są kwasy tłuszczowe zawierające jedną grupę hydroksylową oraz jedno wiązanie podwójne w łańcuchu węglowym (Black, Zannini, Curtis i Gänzle, 2013; Crowley i in., 2013). Przykładowo, Black i in. (2013) w swoich badaniach nad aktywnością przeciugrzybową bakterii *L. sanfranciscensis* i *L. hammesii* wykazali, iż wartość MIC wytwarzanych przez te szczepy kwasów tłuszczowych, z dwiema i trzema grupami hydroksylowanymi wynosiła powyżej 20 g/l, a kwasów monohydroksylowych, wytwarzanych przez *L. hammesii*, wyniosła 0,1 g/l (wobec *P. roqueforti*) oraz 0,7 g/l (wobec *A. niger*). Dokładny mechanizm działania kwasów tłuszczowych, w zakresie inhibicji grzybów strzępkowych, nie jest jeszcze w pełni poznany (Crowley i in., 2013). Avis i Belanger (2001), badając kwas cis-9-heptadekanowy, produkowany przez *Pseudomyza flocculosa*, zaproponowali możliwy sposób interakcji kwasów tłuszczowych z komórkami grzybów. Zakłada się, że kwasy tłuszczowe wykazujące właściwości fungistatyczne, powodują zmniejszenie integralności błony komórkowej grzybów poprzez rozwarstwienie jej warstwy lipidowej. Zwiększona płynność i przepuszczalność błony komórkowej mogą skutkować niekontrolowanym uwalnianiem białek i elektrolitów, co ostatecznie prowadzi do rozpadu komórki grzybowej (Avis i Belanger 2001).

Następną grupę związków o charakterze przeciudrobnoustrojowym, produkowanych przez bakterie fermentacji mlekowej, stanowią związki białkowe takie jak bakteriocyny, peptydy oraz cykliczne dipeptydy (Schürer i Magnusson, 2005; Daliè, Deschamps i Richard-Forget, 2010; Crowley i in., 2013; Klewicka i Lipińska, 2016). Na charakter białkowy

przeciwdrobnoustrojowych metabolitów produkowanych przez niektóre bakterie kwasu mlekowego, wskazuje zanik aktywności po zadziałaniu enzymów proteolitycznych (Crowley i in., 2013). Magnusson i Schnürer (2001) wyizolowali z hodowli *L. coryniformis* subs. *coryniformis* Si3 niskocząsteczkowe białka wykazujące działanie fungistatyczne względem kilku grzybów strzępkowych i drożdży. Z kolei Coda i in. (2008) zidentyfikowali 5 związków peptydowych w zakwasie fermentowanym przez *L. brevis* AM7, które wpływały na wzrost *P. roqueforti* DPPMAF1 w stężeniu 3,5 0 8,2 mg/cm<sup>3</sup>. Niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej są również zdolne do syntezy cyklicznych dipeptydów, które cechują się właściwościami fungistatycznymi. Przykładowo, Ström i in. (2002) wyizolowali dwa cykliczne dipeptydy (cyklo(Phe-Pro) i cyklo(Phe-OH-Pro) z supernatantu hodowli *L. plantarum* MiLAB 393. Warto wspomnieć, iż cykliczne dipeptydy wykazują mniejszą aktywność fungistatyczną, w porównaniu do m.in. hydroksylowanych kwasów tłuszczowych (Schnürer i Magnusso, 2005). Zdecydowanie najszerzej opisaną grupą związków produkowanych przez bakterie kwasu mlekowego o charakterze białkowym, wykazujących działanie przeciwdrobnoustrojowe, są bakteriocyny. Związki te wykazują silne działanie antagonistyczne wobec bakterii, w tym bakterii patogennych, w małym stopniu hamują rozwój grzybów. Bakteriocyny produkowane są przez bakterie fermentacji mlekowej są najlepiej opisane w literaturze, głównie ze względu na fakt, iż większość tych związków produkowanych jest przez szczepy izolowane z żywności i tak jak producenci, w większości uważane są za związki bezpieczne, możliwe do zastosowania w przemyśle spożywczym (Woraprayote i in., 2016). Ważną rolę w antagonizmie bakterii fermentacji mlekowej względem grzybów strzępkowych odgrywają również związki niskocząsteczkowe takie jak m.in. dwutlenek wodoru, reuteryna czy diacetyl (Schnürer i Magnusson, 2005; Dalié, Deschamps i Richard-Forget, 2010; Crowley i in., 2013).

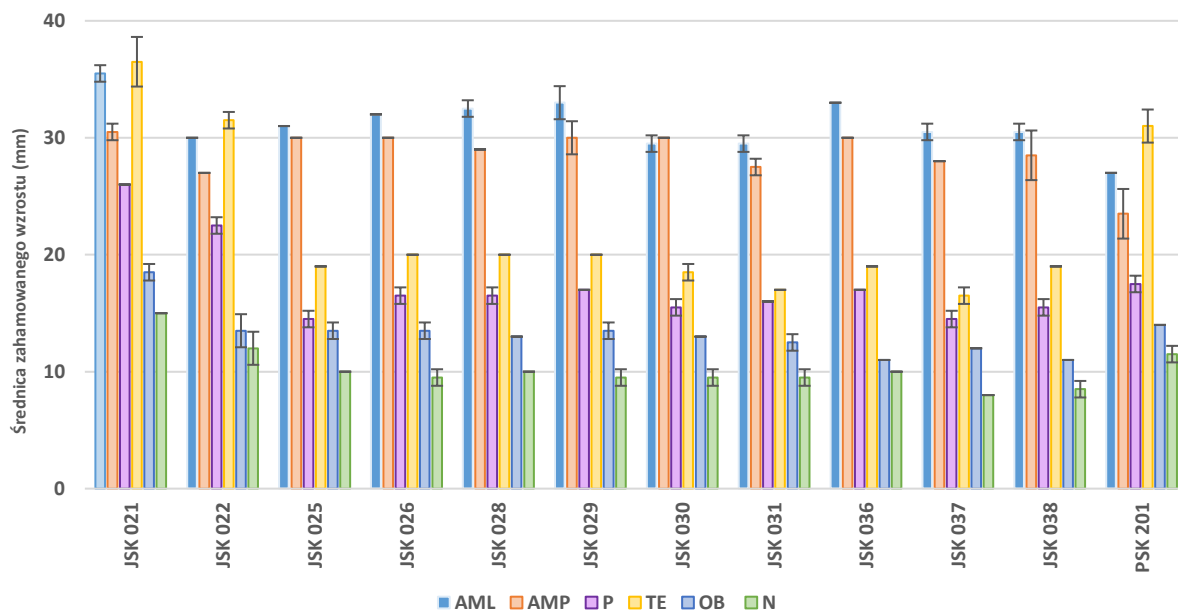
#### **7.2.4. Określenie wrażliwości izolatów bakterii fermentacji mlekowej na wybrane antybiotyki**

Jednym z kluczowych wyróżników jakościowych, zarówno żywności jak i pasz, jest ich bezpieczeństwo zdrowotne. Jako jedno z kryteriów bezpieczeństwa bakterii fermentacji mlekowej, potencjalnie użytecznych w przemyśle spożywczym czy rolniczym, można przyjąć ich wrażliwość na antybiotyki. Prowadzenie badań w tym kierunku może skutecznie zminimalizować ryzyko przenoszenia genu oporności na antybiotyki, z bakterii kwasu mlekowego na inne mikroorganizmy, w tym również patogeny, co w konsekwencji będzie



się przekładało na wyższy stopień bezpieczeństwa produktów. W niniejszej pracy przeprowadzono wstępną ocenę bezpieczeństwa badanych izolatów, poprzez określenie wrażliwości na wybrane antybiotyki 27 izolatów bakterii fermentacji mlekowej, które wybrano w oparciu o ich właściwości antybakteryjne. Dobór antybiotyków oparto na podstawie przeglądu dostępnych na rynku leków dla zwierząt hodowlanych. Badanie przeprowadzono przy użyciu metody dyfuzji krążkowej, natomiast stopień wrażliwości na antybiotyki wyrażono w skali trzy stopniowej, przyjmując podział na izolaty wrażliwe (S), średniowrażliwe (I) oraz odporne (R), w zależności od średnicy zahamowania wzrostu badanych izolatów. W doświadczeniu przyjęto założenie, że do dalszych badań zostaną wybrane izolaty, które będą wykazywały wrażliwość w stopniu wysokim lub średnim na co najmniej 5 spośród testowanych antybiotyków. Opis antybiotyków, zakres wrażliwości jak również metodykę przeprowadzonego doświadczenia opisano w punktach 5.5 oraz 6.2.4 niniejszej pracy. Wyniki z doświadczenia przedstawiono na wykresach 5 i 6 oraz w tabelach 21 i 22.

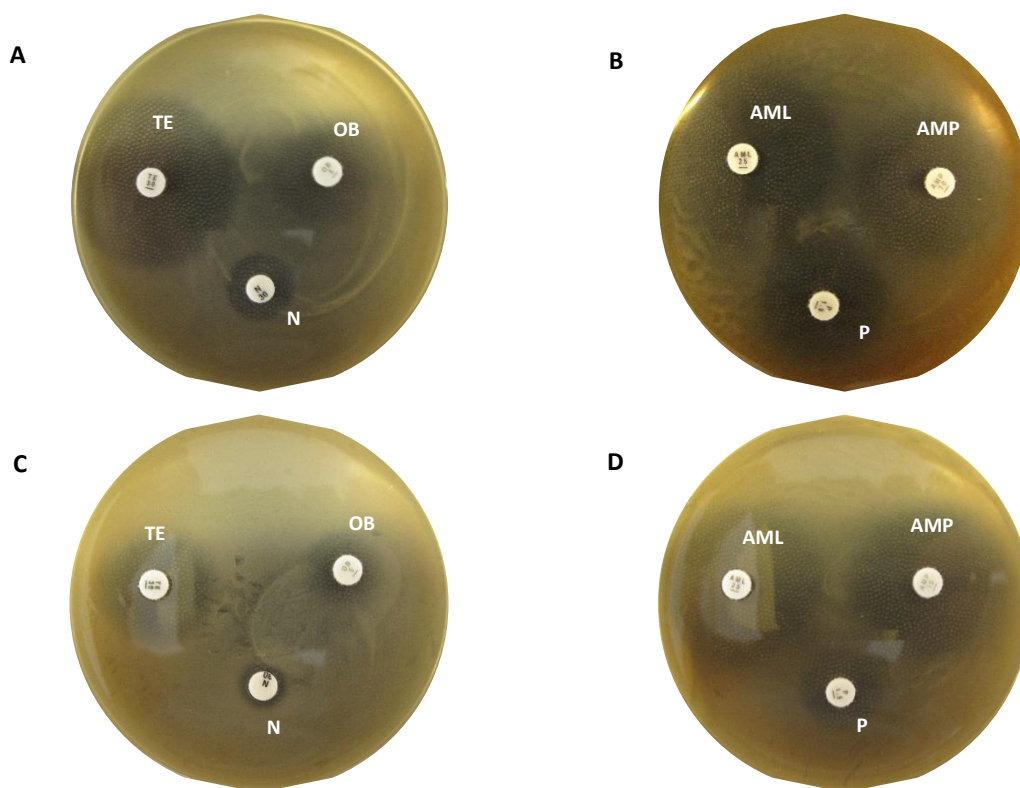
Analizując otrzymane wyniki można zaobserwować, iż stopień zahamowania wzrostu bakterii fermentacji mlekowej uzależniony był zarówno od antybiotyku, jak i badanego izolatu. Zdecydowanie najsilniejsze oddziaływanie hamujące wzrost badanych izolatów wykazywały: amoksycylina, ampicylina i tetracyklina, gdzie stopień aktywności przeciwbakteryjnej wynosił kolejno 28,00 – 41,50 mm, 22,00 – 40,00 mm oraz 16,50 – 36,50 mm. Średnią siłę oddziaływania antybakteryjnego odnotowano w przypadku penicyliny (14,50 – 26,50 mm zahamowanego wzrostu), natomiast najsłabsze oddziaływanie na badane izolaty bakterii fermentacji mlekowej wykazały kloksacylina (11,00 – 20,50 mm) oraz neomycyna (6,00 – 15,00 mm zahamowanego wzrostu). Biorąc pod uwagę oddziaływanie antybiotyków na poszczególne izolaty można zaobserwować, że spośród bakterii wyizolowanych z sianokiszonki najwyższą wrażliwość wykazał izolat JSK 021, natomiast spośród bakterii otrzymanych z kiszzonek z kukurydzy, największą wrażliwością charakteryzował się izolat MLK 304.



\*AML – amoksylicyna, AMP – ampicylina, P – penicylina, TE – tetracyklina, OB – kloksacylina, N – neomycyna

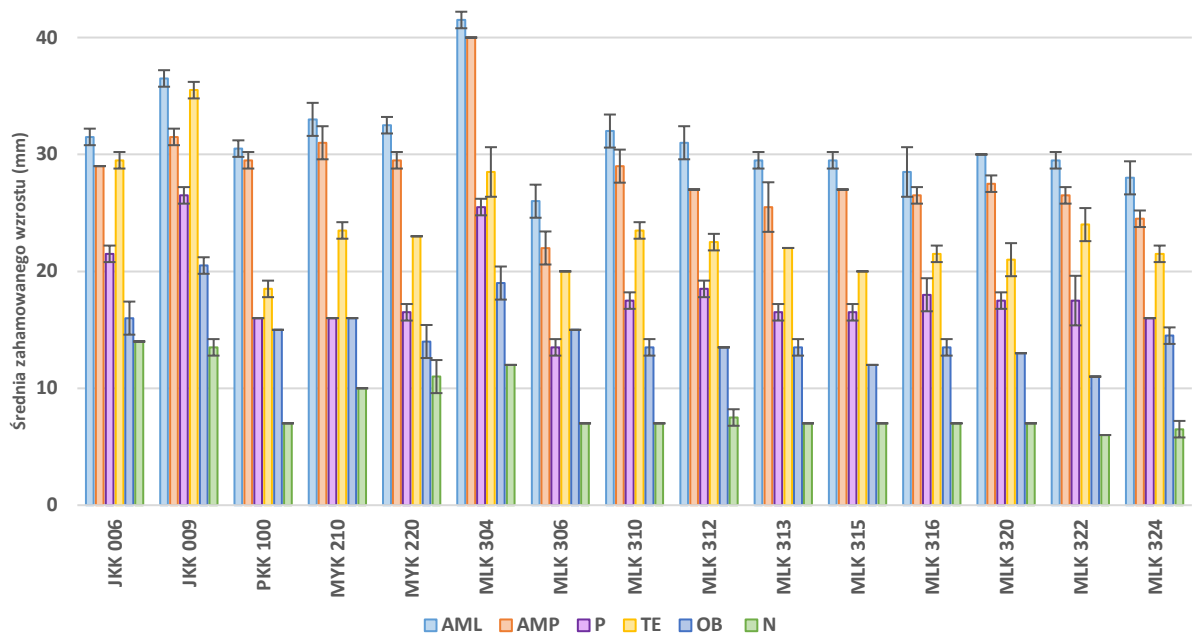
**Wykres 5. Średnica zahamowania wzrostu izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki przez wybrane antybiotyki**

Źródło: na podstawie badań własnych



**Fotografia 10. Strefy zahamowania wzrostu izolatów JSK 021 (A-B), JSK 038 (C) i JSK 029 (D) przez wybrane antybiotyki: AML – amoksylicyna, AMP – ampicylina, P – penicylina, TE – tetracyklina, OB – kloksacylina, N – neomycyna**

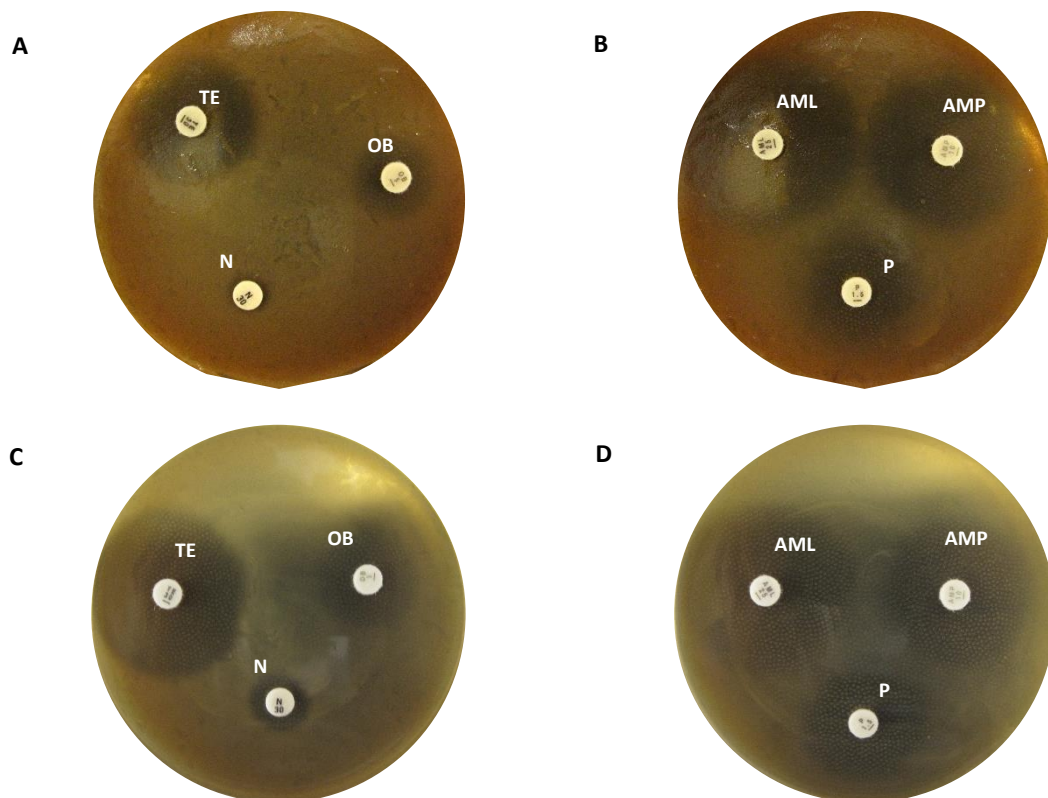
Źródło: fotografie własne



\*AML – amoksycylina, AMP – ampicylina, P – penicylina, TE – tetracyklina, OB – kloksacylina, N – neomycyna

**Wykres 6. Średnica zahamowania wzrostu izolatów bakterii fermentacji mlekowej z kiszonki z kukurydzy przez wybrane antybiotyki**

Źródło: na podstawie badań własnych



**Fotografia 11. Strefy zahamowania wzrostu izolatów MYK 220 021 (A-B) i JJK 009 (C-D) przez wybrane antybiotyki: AML – amoksycylina, AMP – ampicylina, P – penicylina, TE – tetracyklina, OB – kloksacylina, N – neomycyna**

Źródło: fotografie własne

Na podstawie wielkości średnicy zahamowania wzrostu określone zostały wartości graniczne warunkujące oporność lub wrażliwość badanego szczepu bakterii fermentacji mlekowej. Warto podkreślić, iż wszelkiego rodzaju rekomendacje związane z oznaczaniem lekooporności drobnoustrojów, przygotowywane przez takie organizacje jak EFSA, NCCLS (ang. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*), CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standard Institute*), czy Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości - EUCAST (ang. *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*), dotyczą głównie mikroorganizmów patogennych, stwarzających ryzyko dla zdrowia publicznego. Dla bakterii kwasu mlekowego nie ma ściśle określonych standardów w zakresie badań nad antybiotykoopornością, a dostępne dane literaturowe różnie interpretują wartości graniczne dla poszczególnych antybiotyków. Niektórzy autorzy, tworząc antybiogramy dla badanych szczepów bakterii kwasu mlekowego, określają ich oporność lub wrażliwość na podstawie kryteriów stworzonych przykładowo przez CLSI (Han i in., 2015) czy NCCLS (Patel i Parikh, 2016), lub przyjmują stałe wartości graniczne dla wszystkich wykorzystywanych antybiotyków (Vlková i in., 2006; Liasi i in., 2009). Kryteria wrażliwości na antybiotyki badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej w niniejszej pracy (opisane w punkcie 6.2.4) stworzone zostały w oparciu o dane literaturowe, jak również na podstawie analizy wyników z przeprowadzonego doświadczenia.

**Tabela 21. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki na wybrane antybiotyki**

Izolat	Stopień wrażliwości izolatów LAB z sianokiszonki na wybrane antybiotyki					
	Amoksycylina	Ampicylina	Penicylina	Tetracyklina	Kloksacylina	Neomycyna
JSK 021	S	S	S	S	S	I
JSK 022	S	I	S	S	R	R
JSK 025	S	S	I	S	R	R
JSK 026	S	S	I	S	R	R
JSK 028	S	S	I	S	R	R
JSK 029	S	S	I	S	R	R
JSK 030	S	S	I	S	R	R
JSK 031	S	I	I	I	R	R
JSK 036	S	S	I	S	R	R
JSK 037	S	I	I	I	R	R
JSK 038	S	I	I	S	R	R
PSK 201	S	I	I	S	I	R

\* S – izolaty wrażliwe, I – izolaty średniowrażliwe, R – izolaty odporne

Źródło: na podstawie badań własnych

Dane z powyższej tabeli potwierdzają, iż stopień wrażliwości badanych bakterii kwasu mlekowego na wybrane antybiotyki uzależniony był zarówno od izolatu bakteryjnego jak i antybiotyku. Należy jednak podkreślić, iż w niektórych przypadkach, pomimo stosunkowo dużej strefy zahamowanego wzrostu, stwierdzono średnią wrażliwość lub oporność izolatu na określony antybiotyk (w zależności od przyjętych kryteriów wrażliwości). Spośród 12 izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki wszystkie cechowały się wrażliwością na amoksycylinę. W przypadku ampicyliny 7 izolatów wykazywało wrażliwość w stopniu wysokim, natomiast 5 izolatów w stopniu średnim. Na tetracyklinę średnią wrażliwość wykazały izolaty JSK 031 i JSK 037, pozostałe zaś wykazały wysoką wrażliwość na ten antybiotyk. Wrażliwość badanych izolatów LAB z sianokiszonki na penicylinę kształtowała się na poziomie średnim, za wyjątkiem dwóch izolatów (JSK 021 oraz JSK 022), które cechowały się wysoką wrażliwością na ten antybiotyk. Na kloksacylinę wysoką wrażliwością cechował się izolat JSK 021, a izolat PSK 201 wykazał średnią wrażliwość. W przypadku neomycyny tylko jeden izolat (JSK 021) wykazywał wrażliwość w stopniu średnim. Pozostałe izolaty z sianokiszonki wykazały oporność na działanie zarówno kloksacyliny i neomycyny.

**Tabela 22. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej z kiszonki z kukurydzy na wybrane antybiotyki**

Izolat	Stopień wrażliwości izolatów LAB z sianokiszonki na wybrane antybiotyki					
	Amoksycylina	Ampicylina	Penicylina	Tetracyklina	Kloksacylina	Neomycyna
JKK 006	S	S	S	S	I	I
JKK 009	S	S	S	S	S	R
PKK 100	S	S	I	S	I	R
MYK 210	S	S	I	S	I	R
MYK 220	S	S	I	S	I	R
MLK 304	S	S	S	S	S	R
MLK 306	S	I	I	S	I	R
MLK 310	S	S	I	S	R	R
MLK 312	S	I	S	S	R	R
MLK 313	S	I	I	S	R	R
MLK 315	S	I	I	S	R	R
MLK 316	S	I	S	S	R	R
MLK 320	S	I	I	S	R	R
MLK 322	S	I	I	S	R	R
MLK 324	S	I	I	S	I	R

\* S – izolaty wrażliwe, I – izolaty średniowrażliwe, R – izolaty odporne

Źródło: na podstawie badań własnych

Podobne rezultaty otrzymano dla izolatów bakterii kwasu mlekowego z kiszzonek z kukurydzy. Spośród 15 izolatów wszystkie wykazały wysoką wrażliwość na amoksycylinę oraz tetracyklinę. Wysoką wrażliwością na ampicylinę cechowało się 7 izolatów, natomiast 8 izolatów wykazało wrażliwość w stopniu średnim. W przypadku neomycyny, podobnie jak w przypadku izolatów z sianokiszoncek, tylko jeden izolat (JKK 006) wykazał średnią wrażliwość. Pozostałe izolaty cechowały się opornością na ten antybiotyk. Odmienne kształtowała się wrażliwość badanych izolatów na działanie kloksacyliny, gdzie tylko 7 izolatów okazało się opornych. Średnią wrażliwością na kloksacylinę cechowało się 6 izolatów, natomiast dwa izolaty (JKK 009 oraz MLK 304) wykazały wysoką wrażliwość. Podsumowując, tylko 10 spośród 27 badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego wykazało wrażliwość lub średnią wrażliwość na co najmniej 5 antybiotyków. Pozostałe 17 izolatów cechowało się opornością zarówno na neomycynę jak i kloksacylinę. Największe spektrum wrażliwości wykazały izolaty JSK 021 oraz JKK 006, w przypadku których nie obserwowano oporności na testowane antybiotyki.

Obecnie wielu autorów w badaniach dotyczących różnych właściwości bakterii fermentacji mlekowej, określa również ich wrażliwość na antybiotyki. Przykładowo, Patel i Parikh (2016) określili wrażliwość trzech szczepów bakterii kwasu mlekowego, izolowanych z produktów mlecznych, wobec 12 antybiotyków, między innymi neomycynę, penicylinę i amoksycylinę. Większość badanych izolatów wykazywała wysoką lub średnią wrażliwość na amoksycylinę i penicylinę, natomiast na neomycynę wrażliwość wykazał jeden szczep. Z kolei Shao i in. (2015), badając 32 izolaty bakterii fermentacji mlekowej pochodzące z fermentowanego mleka oraz kapusty kiszzonej wykazali, że wszystkie badane szczepy wykazały wrażliwość na ampicylinę, erytromycynę oraz na tetracyklinę (z wyjątkiem izolatu IMAU60108). Podobne rezultaty w odniesieniu do ampicyliny i tetracykliny, zaobserwowano w niniejszej pracy, nieco inne obserwacje jednak dotyczyły neomycyny. Shao i in. (2015) stwierdzili brak wrażliwości jedynie dla 4 izolatów, podczas gdy w prezentowanej pracy niemal wszystkie izolaty, za wyjątkiem jednego, były odporne na ten antybiotyk. Wysoką wrażliwość na ampicylinę, penicylinę i tetracyklinę, natomiast niską na neomycynę, tak jak w prezentowanej pracy, zaobserwowano również dla trzech szczepów (*L. paracasei* LA02, *L. plantarum* LA22 i *L. casei* LA17) pochodzących z fermentowanych produktów rybnych (Liasi i in., 2009). Badania wrażliwości bakterii kwasu mlekowego na antybiotyki prowadzone są również dla izolatów pochodzących z kiszzonek paszowych. Przykładowo, Zielińska, Fabiszewska i Stefańska (2015) przebadali

wpływ antybiotyków na wzrost bakterii *L. plantarum* K KKP/593/p, *L. plantarum* C KKP/788/p oraz *L. buchneri* KKP 907p pochodzących kolejno z kiszonki z surowych ziemniaków, z kukurydzy oraz z trawy łąkowej. Autorki w swojej pracy wykazały, że wszystkie trzy szczepy wykazywały wrażliwość na badane antybiotyki (w tym na ampicylinę i tetracyklinę). Jedynie w przypadku tetracykliny, dla szczepu *L. buchneri* KKP 907p, wartość MIC przekraczała przyjęte wartości graniczne.

Antybiotyki, na przestrzeni dziesięcioleci, zyskały status jednych z najskuteczniejszych substancji w leczeniu zakażeń bakteryjnych ludzi i zwierząt, odgrywając tym samym istotną rolę w poprawie ludzkiego zdrowia i życia (Fraqueza, 2015). Jednakże, już pod koniec lat trzydziestych ubiegłego wieku zgłaszano występowanie mechanizmów oporności na sulfonamidy u niektórych bakterii, co zaczęło podważać możliwości terapeutyczne substancji antybiotykowych (Davies i Davies, 2010). W dzisiejszych czasach, zjawisko antybiotykooporności mikroorganizmów, w tym przede wszystkim patogennych bakterii, jest jednym z głównych problemów i zagrożeń dla bezpieczeństwa zdrowotnego ludzi w ujęciu globalnym (WHO, 2014). W konsekwencji stale wzrastają koszty i czas leczenia różnego rodzaju zakażeń, wywołanych przez patogeny wykazujące lekooporność, co spowodowane jest zmniejszającą się skutecznością dostępnych obecnie substancji przeciwdrobnoustrojowych (WHO, 2014; Fraqueza, 2015). Antybiotyki znalazły także zastosowanie w hodowli zwierząt jako środki zapobiegawcze i zwalczające infekcje bakteryjne, jednakże, przez wiele lat, stosowano je również jako stymulatory wzrostu zwierząt. Jeszcze w latach 90 – tych ubiegłego wieku w Unii Europejskiej, około 15% całkowitego spożycia antybiotyków wykorzystywane było jako stymulatory wzrostu, natomiast w Stanach Zjednoczonych z 50% antybiotyków przeznaczanych na rolnictwo, około 80% wykorzystywano w profilaktyce i stymulowaniu wzrostu zwierząt hodowlanych (Barbosa i Levy, 2000). Doprowadziło to do rozprzestrzeniania się zjawiska antybiotykooporności patogenów, związanych z hodowlą zwierząt, co stwarza bezpośrednie ryzyko dla zdrowia i bezpieczeństwa konsumentów. Reakcją na niekontrolowane stosowanie antybiotyków było wprowadzenie w 2006 roku w Unii Europejskiej, a 2011 w Korei Południowej, całkowitego zakazu stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu. Niemniej jednak, stosowanie niektórych antybiotyków nadal jest dozwolone m.in. w USA, w Australii czy krajach Azjatyckich.

Omawiając zjawisko oporności drobnoustrojów na antybiotyki, należy wyróżnić dwa podstawowe mechanizmy warunkujące oporność komórek bakteryjnych na substancje

aktywne, a mianowicie oporność naturalna oraz nabyta. Bakterie mogą wykazywać oba mechanizmy nabywania oporności na antybiotyki, warto jednak wspomnieć, że przewaga rodzaju oporności uzależniona jest od takich czynników jak gatunek bakterii, rodzaj antybiotyku, docelowe miejsce działania substancji aktywnej oraz od miejsca wytwarzania mechanizmów obronnych (plazmidy, chromosomy) (Sharma, Tomar, Goswami, Sangwan, i Singh, 2014). Przez naturalną oporność bakterii na antybiotyki rozumie się wrodzoną zdolność danego szczepu, rodzaju czy gatunku, do przetrwania w obecności czynnika przeciwdrobnoustrojowego (Mathur i Singh, 2005). Można w tym wypadku wymienić cztery mechanizmy warunkujące odporność wrodzoną bakterii na antybiotyki: enzymatyczna inaktywacja lub modyfikacja substancji aktywnej, zdolność do zmniejszania przepuszczalności lub zwiększenie czynnego wyptywu leku przez powierzchnię komórki (w tym redukcja stężenia leku), zmiana miejsca docelowego działania antybiotyku oraz wewnątrzkomórkowe transformacje metaboliczne bakterii (uniemożliwienie prawidłowego działania antybiotyku) (Kumar i Schweizer, 2005; Sharma i in., 2014). Drugi rodzaj oporności bakterii na antybiotyki, oporność nabyta, wynika z dwóch głównych mechanizmów – horyzontalnego transferu genów oraz mutacji genomu bakteryjnego (Mathur i Singh, 2005; Ammor, Flórez i Mayo, 2007). Warto podkreślić, że o ile oporności naturalnej, jak i oporności wynikającej ze spontanicznej mutacji, przypisuje się niewielką rolę w rozprzestrzenianiu się lekooporności wśród bakterii (Mazur, 2002; Janiec i Krupińska, 2002; Albert i in., 2005; Howden, Johnson, Ward, Stinear i Davies, 2006), o tyle horyzontalny transfer genów uważa się za główną przyczynę tego zjawiska (Sharma i in., 2014; Fraqueza, 2015). Jest to związane z faktem, iż rozprzestrzenianie się genów oporności, poprzez horyzontalny transfer genów, może odbywać się nie tylko w obrębie danego gatunku, ale i na inne gatunki, które występują w danym środowisku (Madhavan i Sowmiya, 2011). W tym rodzaju oporności również można wskazać główne mechanizmy, które determinują nabycie przez bakterie odporności na daną substancję przeciwdrobnoustrojową. Według danych literaturowych, przyjmuje się, że transdukcja oraz transformacja nie odgrywają istotnej roli w przekazywaniu genu oporności na antybiotyki (Ammor i Mayo, 2007). Jako główny mechanizm nabywania oporności na leki wśród bakterii, wymienia się transfer genów drogą koniugacji (Mathur i Singh, 2005), zwłaszcza jeżeli informacja kodująca zdolność do wytworzenia mechanizmów obronnych zlokalizowana jest na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy czy transpozony (van Reenen i Dicks, 2011; Devirgiliis, Zinno i Perozzi, 2013).



Za główny szlak rozprzestrzeniania się lekooporności wśród drobnoustrojów uważa się łańcuch pokarmowy (Singer i in., 2003; Fraqueza, 2015), dlatego też, coraz większą uwagę poświęca się problemowi antybiotykoodporności bakterii fermentacji mlekowej, powszechnie stosowanych w produkcji żywności fermentowanej (Devirgiliis i in., 2013; Sharma i in., 2014), a u których wyróżnia się występowanie oporności zarówno naturalnej, jak i nabytej (Sharma i in., 2014). Ważnym aspektem jest więc weryfikacja bakterii kwasu mlekowego w zakresie potencjalnego nabywania i przekazywania przez nie genów oporności na antybiotyki (Kastner i in., 2006).

Bakterie fermentacji mlekowej mają dość szeroko rozwinięte mechanizmy naturalnej i nabytej oporności na różnego rodzaju antybiotyki (Sharma i in., 2014; Fraqueza, 2015). Jedną z najczęściej występujących oporności bakterii kwasu mlekowego jest oporność na wankomycynę (Coppola i in., 2005; Pérez-Sánchez i in., 2011). Brak wrażliwości bakterii kwasu mlekowego na wankomycynę jest często podkreślany w opracowaniach naukowych związanych z wpływem antybiotyków na tę grupę bakterii (Charteris i in., 1998; Blandino, Milazzo i Fazio, 2008). Temmerman, Pot, Huys i Swings (2003), badając wrażliwość na antybiotyki bakterii fermentacji mlekowej (między innymi z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Bifidobacterium*) wykazał, iż wiele szczepów cechowała oporność na wankomycynę oraz kanamycynę, z kolei dużą wrażliwość badane szczepy wykazywały względem chloramfenikolu, erytromycyny i tetracykliny. Ciekawe obserwacje poczynili również w swoich badaniach D'Aimmo, Modesto i Biavati (2007), badając wpływ antybiotyków na rozwój bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* oraz *Streptococcus*, izolowanych z produktów mlecznych i farmaceutyków. Autorzy wskazali, że badane izolaty cechowały się wrażliwością na takie antybiotyki jak ampicylina, penicylina G, klindamycyna, erytromycyna czy bacitracyna, przy czym wykazywały oporność względem kanamycyny, polimyksyny B, kwasu nalidyksowego czy cykloseryny. Zauważono również, iż wrażliwość między innymi na chloramfenikol, tetracyklinę, wankomycynę, gentamycynę, linkomycynę czy streptomycynę była zróżnicowana i uzależniona od szczepu (D'Aimmo i in., 2007). Takie obserwacje dowodzą, iż cecha oporności na różne substancje przeciwdrobnoustrojowe jest szczepozależna. Różnice w zakresie antybiotykoodporności bakterii kwasu mlekowego wynikać mogą także z różnych wartości granicznych (określających wrażliwość na dany antybiotyk) przyjmowanych w pracach badawczych. Tego typu rozbieżności zaobserwowali Hummel, Hertel, Holzapfel i Franz (2007), badając wrażliwość na antybiotyki bakterii fermentacji mlekowej, będących kulturami starterowymi

do produkcji żywności fermentowanej oraz kilka szczepów zakwalifikowanych jako probiotyki. W swojej pracy odnotowali, że większa ilość szczepów, stosowanych jako startery do produkcji serów i jogurtów, była niewrażliwa na gentamycynę, streptomycynę i ciproflaksacynę, w przypadku określania ich oporności na podstawie wartości granicznych wskazanych przez instytucje badawcze (SCAN, FEDAP), niż w przypadku wartości granicznych zaproponowanych przez innych autorów. Jednakże, odnośnie penicyliny G, ampicyliny, tetracykliny, chloramfenikolu i erytromycyny, autorzy zaobserwowali podobną (wysoką) wrażliwość badanych bakterii kwasu mlekowego, bez względu na przyjęte kryteria. Hummel i in. (2007), podkreślili także różnice oporności badanych bakterii w zależności od ich rodzaju i szczepu, obserwując większą odporność, na badane antybiotyki, bakterii stosowanych jako startery w produkcji fermentowanego mięsa i jako probiotyki (niezależnie od przyjętych kryteriów oceny wrażliwości).

Coraz częściej, w przypadku badań nad antybiotykoopornością bakterii fermentacji mlekowej, dużą rolę odgrywają prace związane z miejscem nabywania przez dany szczep odporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe. Warto przypomnieć, że oporność na dany antybiotyk, kodowana chromosomalnie, nie ulega przenoszeniu na inne mikroorganizmy (Gueimonde, Sánchez, Reyes-Gavilán i Margolles. 2013). Dlatego istotne jest oszacowanie występowania ewentualnych genów oporności na częściach ruchomych genomu bakteryjnego (plazmidy czy transpozony). Przykładowo, Kastner i in. (2006), wykryli gen oporności na tetracyklinę (tet(W)) w plazmidach dwóch szczepów *L. reuterii* SD 2112, pochodzących z dwóch różnych źródeł. Dla tego samego szczepu autorzy stwierdzili również obecność genu *lnu(A)*, warunkującego odporność na linkozamid.

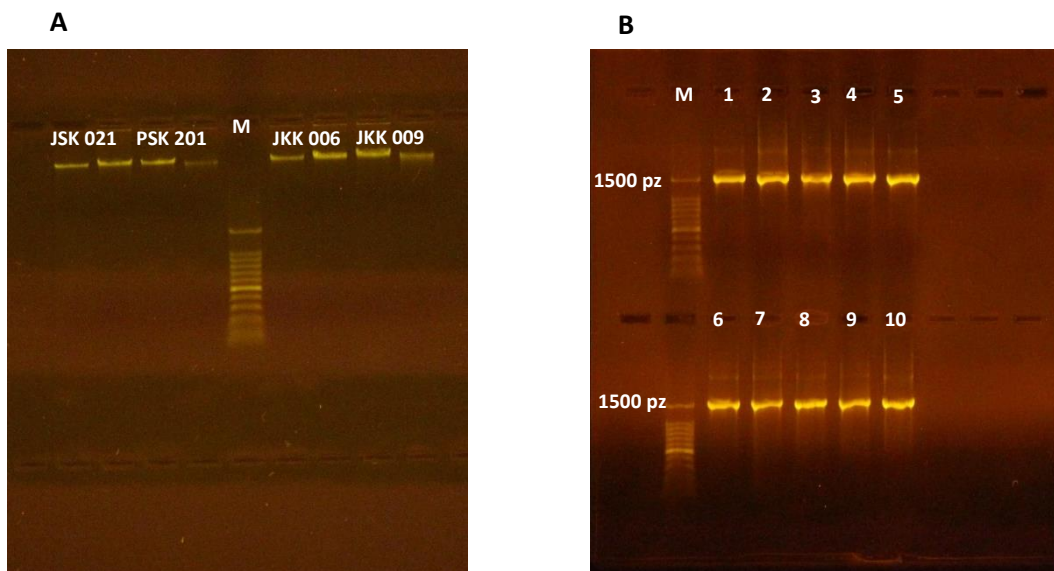
Podsumowując, badanie wrażliwości na antybiotyki bakterii fermentacji mlekowej jest istotnym elementem warunkującym bezpieczeństwo stosowania tej grupy bakterii w produkcji żywności i pasz (EFSA, 2012). Na podstawie przeprowadzonych badań, spośród 27 izolatów wytypowano 10, które cechowały się wysoką lub średnią wrażliwością na co najmniej 5 z 6 wykorzystanych antybiotyków. Warto podkreślić, iż przeprowadzony antybiogram w niniejszej pracy jest stosunkowo niewielki (stworzony na potrzeby skринingowe). W celu ewentualnej komercjalizacji otrzymanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej, konieczne będzie rozszerzenie badań o kolejne antybiotyki, co znacznie ułatwi prawidłowe określenie bezpieczeństwa wyselekcjonowanych izolatów.

### **7.3. Identyfikacja fenotypowa i genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

Dziesięć izolatów bakterii fermentacji mlekowej, wybranych na podstawie wcześniejszych oznaczeń, poddano charakterystyce fenotypowej w oparciu o analizę mikroskopową oraz zdolność do wytwarzania katalazy, a następnie poddano je identyfikacji genetycznej. Wymienione oznaczenia wykonano zgodnie z punktami 6.3.1, 6.3.2 i 6.3.3, opisanymi w części metodycznej. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 23 i 24.

Analiza mikroskopowa preparatów wybranych bakterii kwasu mlekowego, barwionych przy użyciu metody Grama, wykazała, że wszystkie badane izolaty stanowiły gramdodatnie pałeczki. We wszystkich przypadkach zaobserwowano krótkie i dłuższe formy pałeczek, tworzące charakterystyczne układy (łańcuszki, palisady), jak również nieregularne formy (Y oraz V). Wybrane izolaty bakterii fermentacji mlekowej cechował również brak zdolności do wytwarzania enzymu katalazy, co stwierdzono na podstawie obserwacji wpływu hodowli bakteryjnej na roztwór nadtlenu wodoru na szkiełku zegarkowym. Niezdolność do syntezy enzymu katalazy jest cechą charakterystyczną dla bakterii fermentacji mlekowej.

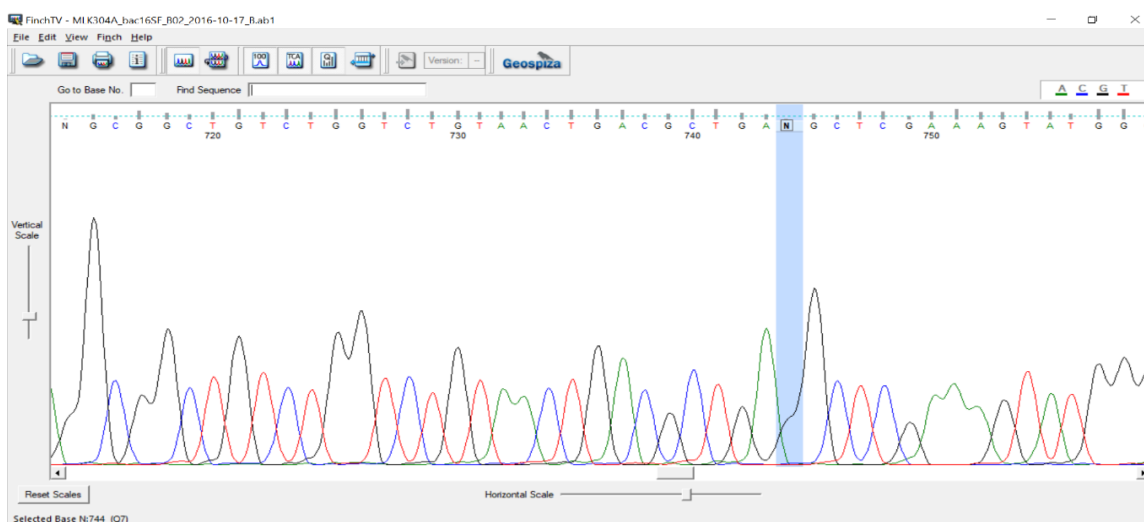
Identyfikację genetyczną wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego przeprowadzono na podstawie sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA. Izolację genomowego DNA z komórek wybranych izolatów przeprowadzono zgodnie z punktem 6.3.2, opisanym w części metodycznej, a następnie oceniono skuteczność przeprowadzonej izolacji za pomocą elektroforezy (punkt 6.3.2). Na podstawie analizy elektroforegramu (fotografia 12), potwierdzono obecność genomowego DNA we wszystkich próbkach uzyskanych z komórek wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej. Następnym etapem identyfikacji wybranych izolatów było przeprowadzenie PCR w celu powielenia fragmentu genu podjednostki rybosomalnej 16S rRNA. Reakcję łańcuchowej polimerazy przeprowadzono zgodnie z punktem 6.3.2., opisanym w części metodycznej. Obecność zamplifikowanego genu 16S rRNA, po zakończeniu PCR, potwierdzano na podstawie rozdziału elektroforetycznego. Z obserwacji elektroforegramu (fotografia 12) można było zauważyć wyraźne prążki powielonego fragmentu DNA, o długości 1500 pz, co potwierdzało obecność zamplifikowanego genu kodującego 16S rRNA.



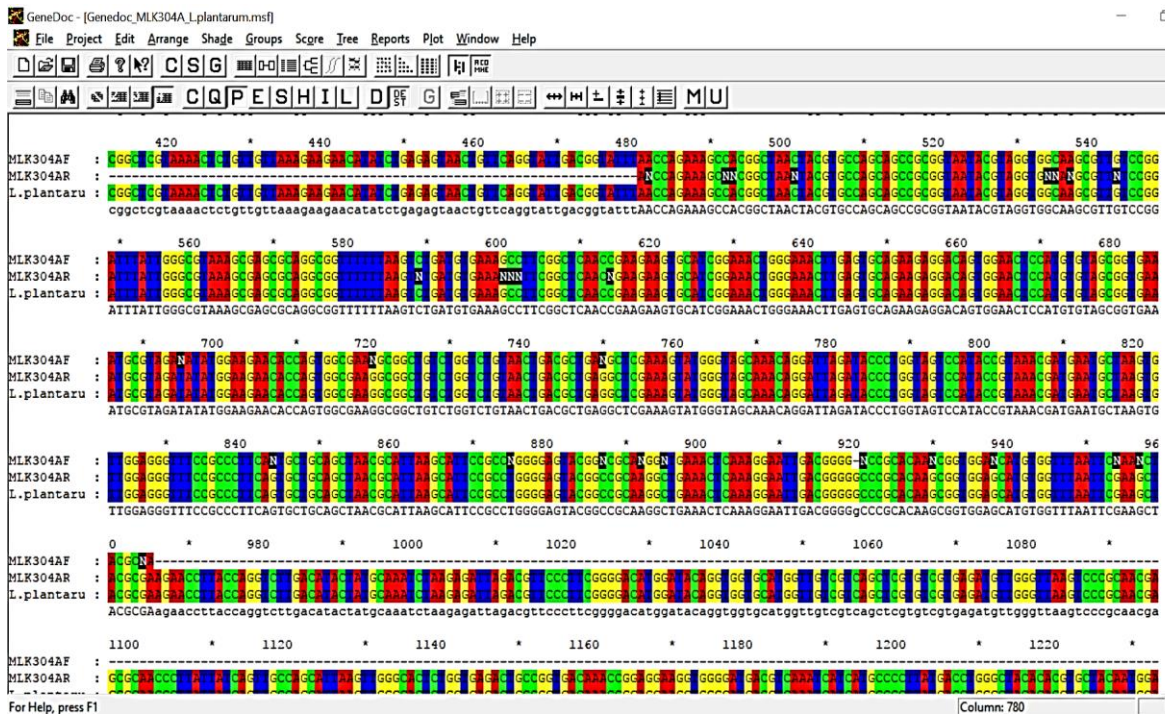
**Fotografia 12.** Obraz rozdziłu elektroforetycznego A: genomowego DNA, gdzie M – marker wielkości DNA, oraz B: produktów PCR o długości 1500 pz, gdzie M – marker wielkości, 1 – 10 – izolaty bakterii fermentacji mlekowej (kolejno JKS 021, PSK 201, JKK 006, JKK 009, PKK, PKK 100, MYK 210, MYK 220, MLK 304, MLK 306 i MLK 324

Źródło: fotografie własne

Uzyskane w wyniku PCR powielone fragmenty genu kodującego 16S rRNA, przekazano następnie do sekwencjonowania, które wykonane zostało przez Pracownię Techniki Biologii Molekularnej, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Otrzymane sekwencje przeanalizowano w programie Finch TV 1.4.0 a następnie poprawione sekwencje łączono przy użyciu programu GeneDoc 2.7.000 (przykładowe analizy przedstawiono na fotografiach 13 i 14). Połączone sekwencje zostały porównane z bazą danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI) przy użyciu narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*).



**Fotografia 13.** Analiza sekwencji zamplifikowanego genu 16S rRNA w programie FinchTV 1.4.0

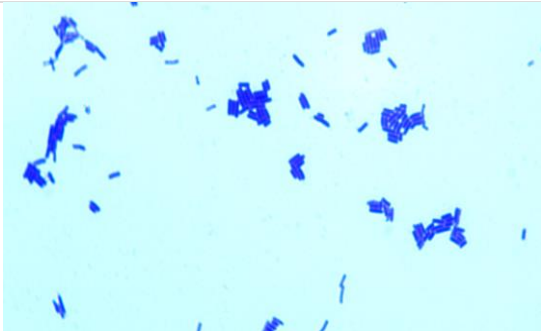
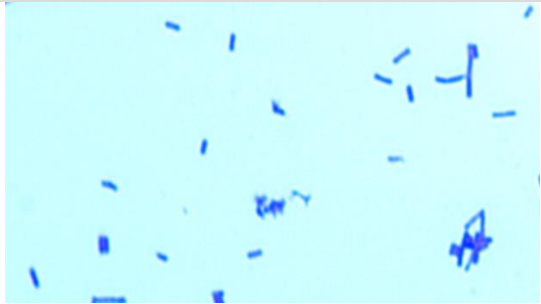
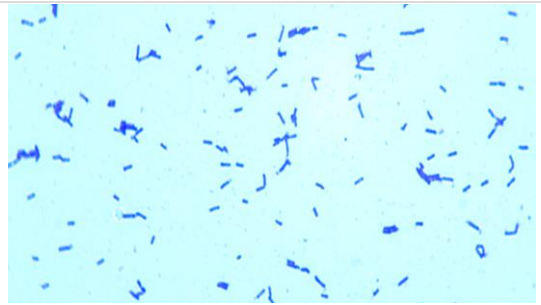
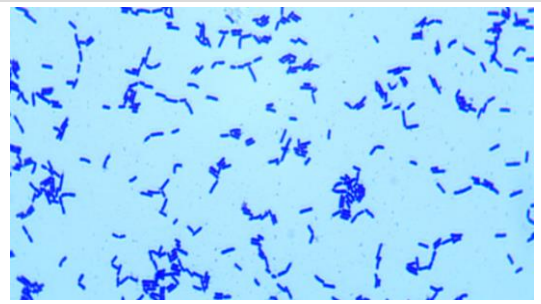
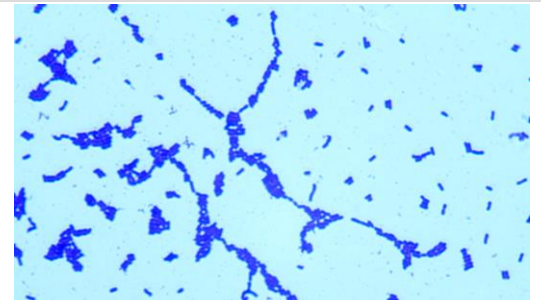


Fotografia 14. Analiza sekwencji z amplifikowanego genu 16S rRNA w programie GeneDoc 2.7.000

Źródło: fotografie własne

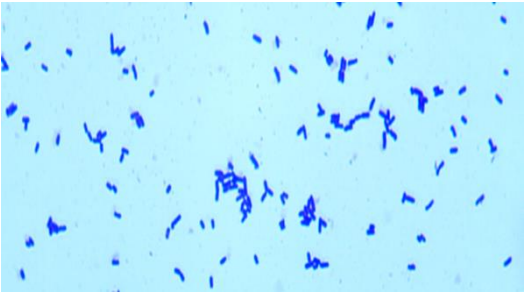
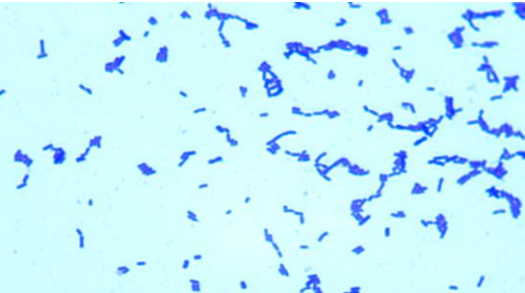
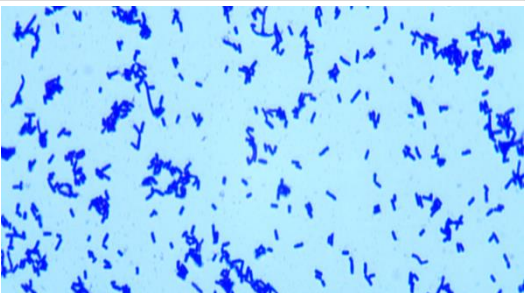
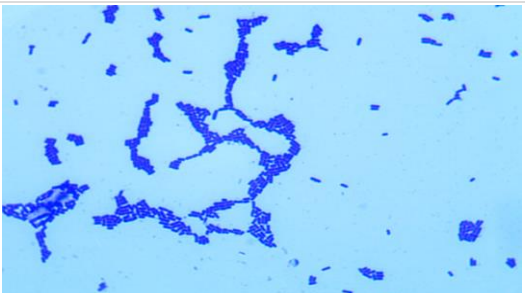
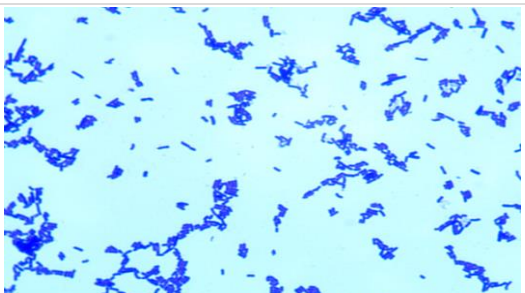
Na podstawie wykonanej analizy porównawczej określono dokładną przynależność gatunkową i rodzajową wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego, przy stopniu pokrycia otrzymanych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w bazie danych, na poziomie 98 – 100%. Po wykonaniu identyfikacji genetycznej stwierdzono, iż wybrane izolaty bakterii fermentacji mlekowej stanowiły bakterie z rodzaju *Lactobacillus*: *L. buchneri* (JSK 021, MYK 220 i MLK 324), *L. paracasei* (JKK 006 i JKK 009), *L. plantarum* (MYK 210, MLK 304 i 306), *L. pentosus* (PKK 100 i PSK 201). Charakterystykę wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przedstawiono w tabeli 23 z uwzględnieniem ich morfologii. Spośród dziesięciu wybranych szczepów, po trzy izolaty należały do gatunku *L. plantarum* i *L. buchneri*, natomiast po dwa do gatunków *L. pentosus* oraz *L. paracasei*.

**Tabela 23. Charakterystyka fenotypowa i genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki i kiszonki z kukurydzy I**

Charakterystyka	Opis	Obraz mikroskopowy
<b>JSK 021</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo, w parach lub w palisadach	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>PSK 201</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo lub w parach, tworzą układy V i Y	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>JKK 006</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce spłaszczone, występujące pojedynczo lub w krótkich łańcuszkach, tworzą liczne układy V	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>JKK 009</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce spłaszczone, występujące pojedynczo lub w krótkich łańcuszkach, tworzą liczne układy V	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>PKK 100</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuszkach, tworzą układy V i Y	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	

Źródło: na podstawie badań własnych

**Tabela 24. Charakterystyka fenotypowa i genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej z kiszonki z kukurydzy II i III**

Charakterystyka	Opis	Obraz mikroskopowy
<b>MYK 210</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo lub tworzące krótkie łańcuszki	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>MYK 220</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo lub w parach, tworzą krótkie łańcuszki	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>MLK 304</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo, w parach lub w krótkich łańcuszkach, tworzą układy V i Y	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>MLK 306</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo, w parach lub palisadach, tworzą krótkie łańcuszki i układy V	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	
<b>MLK 324</b>		
<b>Morfologia</b>	gramdodatnie pałeczki, krótkie, końce zaokrąglone, występujące pojedynczo, w parach lub palisadach, tworzą krótkie łańcuszki	
<b>Test na obecność katalazy</b>	ujemny	
<b>Gatunek</b>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	
<b>Procent identyfikacji</b>	99	

Źródło: na podstawie badań własnych

Zidentyfikowane w niniejszej pracy gatunki bakterii o właściwościach antygrzybowych często są izolowane z surowców lub produktów pochodzenia roślinnego. Podobne rezultaty uzyskali inni autorzy. Crowley i.in., (2013) w swojej pracy również zaobserwowali dominację *L. plantarum*, jako najliczniejszej grupy bakterii kwasu mlekowego, charakteryzujących się wysoką aktywnością fungistatyczną, natomiast mniejszą grupę stanowiły bakterie z rodzaju *Weissella confusa* i *P. pentosaceus*. Sathe i in. (2007), badając bakterie fermentacji mlekowej pochodzących ze świeżych ważyw, zidentyfikowali szczepy takie jak *L. plantarum*, *L. paracollinoides*, *P. pentosaceus* oraz *W. paramesenteroides*. Bardzo różnorodną gatunkowo grupę bakterii kwasu mlekowego, zidentyfikowali w swoich badaniach Ennahar, Cai i Fujita (2003). Analizując przynależność genetyczną LAB wyizolowanych z kiszonki ryżowej, stwierdzili obecność bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Enterococcus* oraz *Leuconostoc*. Ni, Wang, Cai i Pang. (2015) wykazali, że izolowane bakterie z kiszonki z pszenicy, w dużej mierze zdominowane były (w 66,7%) przez heterofermentatywne bakterie takie jak *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria* i *Lactobacillus buchneri*. Oprócz wspomnianych szczepów autorzy zidentyfikowali również szczepy LAB takie jak *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* oraz *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*. Przewagę różnorodnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej, w zależności od źródła izolacji, zaprezentowali w swoich badaniach Pang i in. (2012). Analizując przynależność gatunkową LAB izolowanych ze świeżych roślin paszowych wykazali, że w przypadku kukurydzy dominowały bakterie *Weissella paramesentroides*, w lucernie *Leuconostoc pseudomesentroides*, w koniczynie *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, natomiast w sparcecie dominowały bakterie z rodzaju *L. paraplantarum* i *L. brevis*. Bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*, obok bakterii innych gatunków, zostały zidentyfikowane w świeżych i zakiszanych materiałach z kukurydzy, lucerny i życicy włoskiej, w badaniach zaprezentowanych przez Ni i in. (2017). Z dostępnych danych literaturowych wynika, że zarówno świeże materiały roślinne, jak i kiszonki, są zasiedlane przez zróżnicowane gatunki bakterii fermentacji mlekowej. W zależności od prowadzonych doświadczeń, można zaobserwować duże zróżnicowanie gatunkowe, w przypadku zwykłej identyfikacji izolowanych bakterii, lub węższą grupę określonych gatunków, w przypadku identyfikacji bakterii o określonych właściwościach, co zostało również zaobserwowane w niniejszej pracy.



#### **7.4. Określenie możliwości praktycznego zastosowania wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

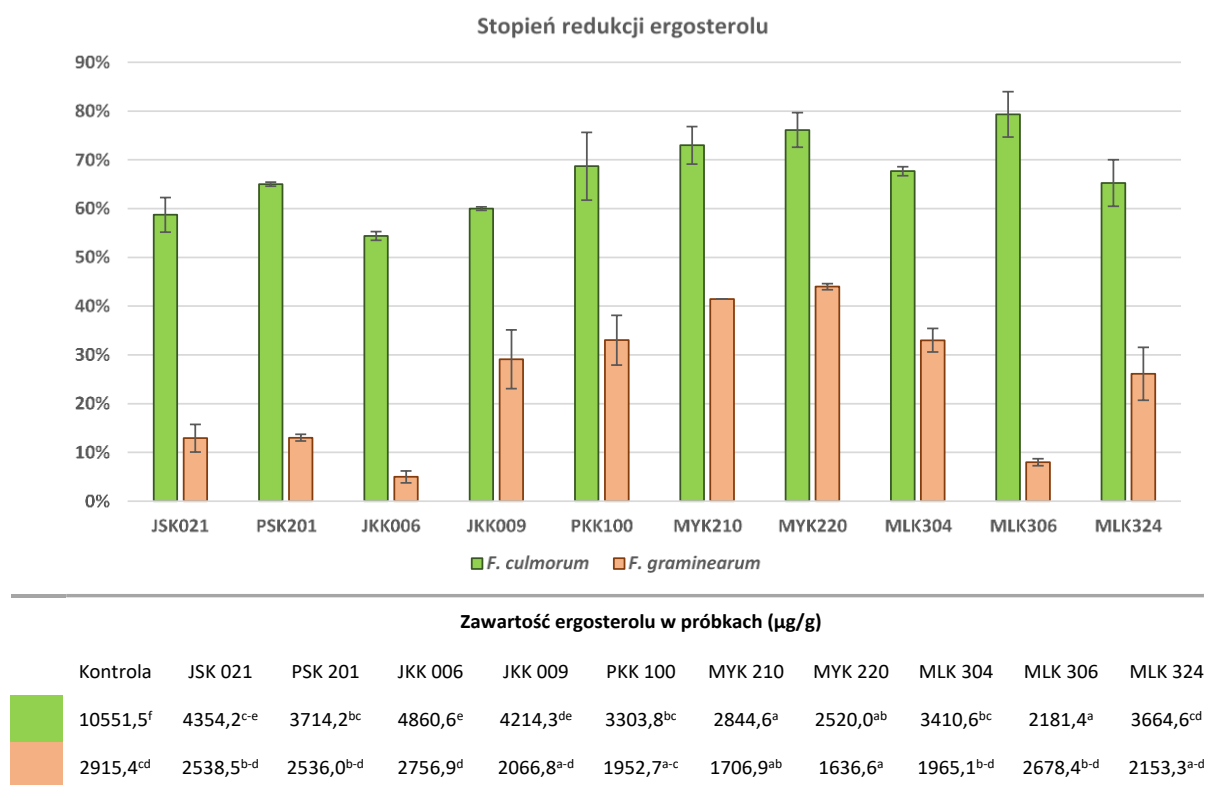
Kolejnym etapem badań było określenie możliwości praktycznego zastosowania wyizolowanych bakterii, prowadzących do ograniczenia występowania mykotoksyn fuzaryjnych w żywności i paszach. Ten etap został podzielony na cztery części (punkt 6.4), w których uwzględniono następujące badania: ograniczenie wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* i kontaminacji wytwarzanych przez nie toksyn w warunkach modelowych, wiązanie toksyn fuzaryjnych przez wybrane izolaty w warunkach *in vitro* oraz w symulowanym układzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych oraz wykorzystanie wyizolowanych bakterii do produkcji kiszonek paszowych. Głównym celem tego etapu badań było wytypowanie możliwie najwięcej ścieżek zastosowania wyizolowanych bakterii w agrotechnice i żywieniu zwierząt, włączając je tym samym w strategię ograniczenia migracji mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym.

##### **7.4.1. Ograniczenie wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* i wytwarzania przez nie mykotoksyn w ziarnie pszenicy**

Jednym z założonych sposobów praktycznego wykorzystania wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej jest biologiczna ochrona roślin uprawnych. Ze względu na zdolność wyselekcjonowanych bakterii do hamowania wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* w warunkach *in vitro*, przebadano 10 zidentyfikowanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pod względem ich zdolności do ograniczania wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* i wytwarzania mykotoksyn, w warunkach modelowych. Doświadczenie zakładało inokulację ziaren pszenicy hodowlą bakteryjną, a następnie zakażenie zaprawionego ziarna zarodnikami grzybów strzępkowych w warunkach kontrolowanych. W badaniach wykorzystano dwa grzyby z rodzaju *Fusarium* (*F.graminearum* i *F. culmorum*), które stanowią najczęstszy czynnik patogenny roślin uprawnych w naszej strefie klimatycznej. Szczegóły techniczne doświadczenia przedstawiono w punkcie 6.4.1 w części metodycznej.

Hamowanie wzrostu grzybów *Fusarium* w zakażonym ziarnie pszenicy, przez badane bakterie, określano na podstawie redukcji stężenia ergosterolu (wykres 7). Z otrzymanych danych wynika, że ograniczenie wzrostu grzybów strzępkowych w ziarnie pszenicy uzależnione było zarówno od rodzaju grzyba, jak i od szczepu bakterii fermentacji mlekowej. Zdecydowanie wyższy stopień redukcji ergosterolu (54 – 79%) zaobserwowano

w przypadku *F. culmorum* dla wszystkich izolatów bakteryjnych. Dla próbek zakazonych *F. graminearum* stwierdzono redukcje ergosterolu w zakresie od 5 do 44%.



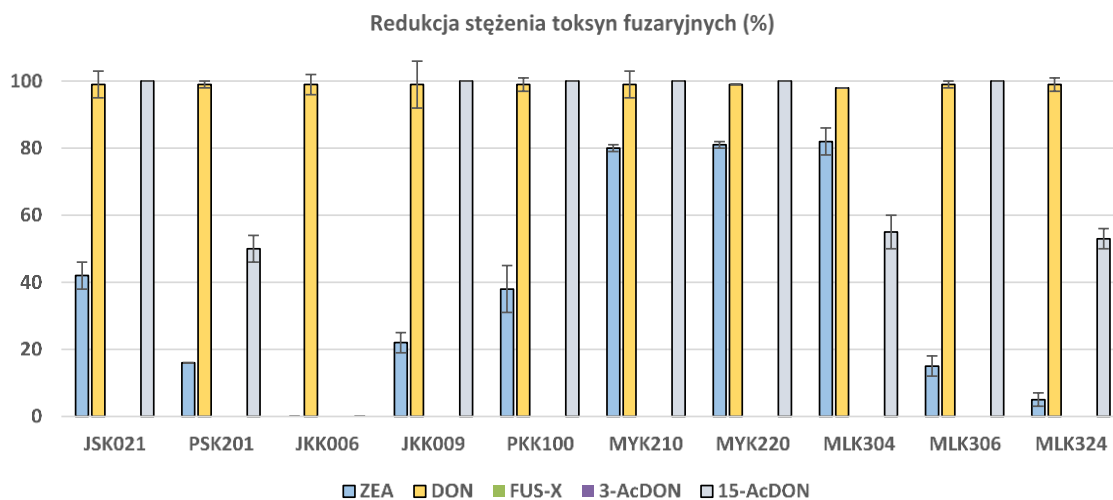
\*Średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 7. Procentowa redukcja ergosterolu w ziarnie pszenicy przez wyselekcjonowane bakterie z rodzaju *Lactobacillus***

Źródło: na podstawie badań własnych

Analizując aktywność fungistatyczną poszczególnych szczepów bakteryjnych można zauważyć, że wzrost *F. culmorum* najsilniej hamowany był w przypadku *L. plantarum* MYK 306, *L. buchneri* MYK 220 oraz *L. plantarum* MYK 210, dla których stopień redukcji ergosterolu wyniósł kolejno 79, 76 i 73%. Ponad 60%-tą redukcję ergosterolu stwierdzono w przypadku *L. pentosus* PKK 100 i PSK 201, *L. buchneri* MLK 324, *L. plantarum* MLK 304 oraz *L. paracasei* JKK 009, natomiast dla *L. buchneri* JSK 021 oraz *L. paracasei* JKK 006 stopień redukcji ergosterolu wyniósł kolejno 59 i 54%. W przypadku *F. graminearum*, najsilniejszą aktywnością fungistatyczną (ponad 40%-tą redukcją ergosterolu) charakteryzowały się *L. buchneri* MYK 220 i *L. plantarum* MYK 210. Najslabszą aktywność w zakresie hamowania wzrostu *F. graminearum*, wykazał *L. paracasei* JKK 006 (5%) oraz *L. plantarum* MLK 306 (8%), natomiast pozostałe szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* cechowały się zdolnością do redukcji ergosterolu w zakresie od 13 do 33%. Warto

podkreślić, iż same grzyby strzępkowe wykazywały różnice w rozwoju na ziarnie pszenicy. Zdecydowanie bardziej ekspansywny wzrost można było zaobserwować w przypadku *F. graminearum* (2915,36 µg/g ergosterolu) niż *F. culmorum* (10551,40 µg/g ergosterolu).



Toksyna	Zawartość toksyn w próbkach										
	Kontrola	JSK 021	PSK 201	JKK 006	JKK 009	PKK 100	MYK 210	MYK 220	MLK 304	MLK 306	MLK324
µg/g	410,49 <sup>e</sup>	240,02 <sup>bc</sup>	346,39 <sup>c-e</sup>	940,33 <sup>f</sup>	320,61 <sup>c-e</sup>	255,17 <sup>b-d</sup>	83,91 <sup>a</sup>	76,46 <sup>ab</sup>	73,61 <sup>a</sup>	349,48 <sup>c-e</sup>	390,00 <sup>de</sup>
ng/g	199,46 <sup>b</sup>	1,64 <sup>a</sup>	1,59 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	1,72 <sup>a</sup>	1,77 <sup>a</sup>	1,35 <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	1,79 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a</sup>	1,34 <sup>a</sup>
ng/g	1,10 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a-c</sup>	1,38 <sup>a-c</sup>	1,35 <sup>a-c</sup>	1,31 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>a</sup>	1,15 <sup>a</sup>	1,7 <sup>b</sup>	1,75 <sup>c</sup>	1,18 <sup>a</sup>
ng/g	1,149 <sup>a</sup>	1,28 <sup>ab</sup>	1,43 <sup>ab</sup>	1,59 <sup>ab</sup>	1,40 <sup>ab</sup>	1,53 <sup>ab</sup>	1,15 <sup>ab</sup>	1,45 <sup>ab</sup>	1,68 <sup>b</sup>	1,61 <sup>ab</sup>	1,37 <sup>ab</sup>
ng/g	0,95 <sup>c</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,47 <sup>b</sup>	1,32 <sup>d</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,44 <sup>b</sup>

\*ZEA – zearalenon, DON – deoksyniwalenol, FUS-X – fuzarenon X, 3-AcDON – 3-acetylodeksyniwalenol, 15-AcDON – 15-acetylodeksyniwalenol

\*średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych toksyn różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 8. Procentowa redukcja toksyn fuzaryjnych przez wyselekcjonowane bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w ziarnie pszenicy zakażonym *F. graminearum***

Źródło: na podstawie badań własnych

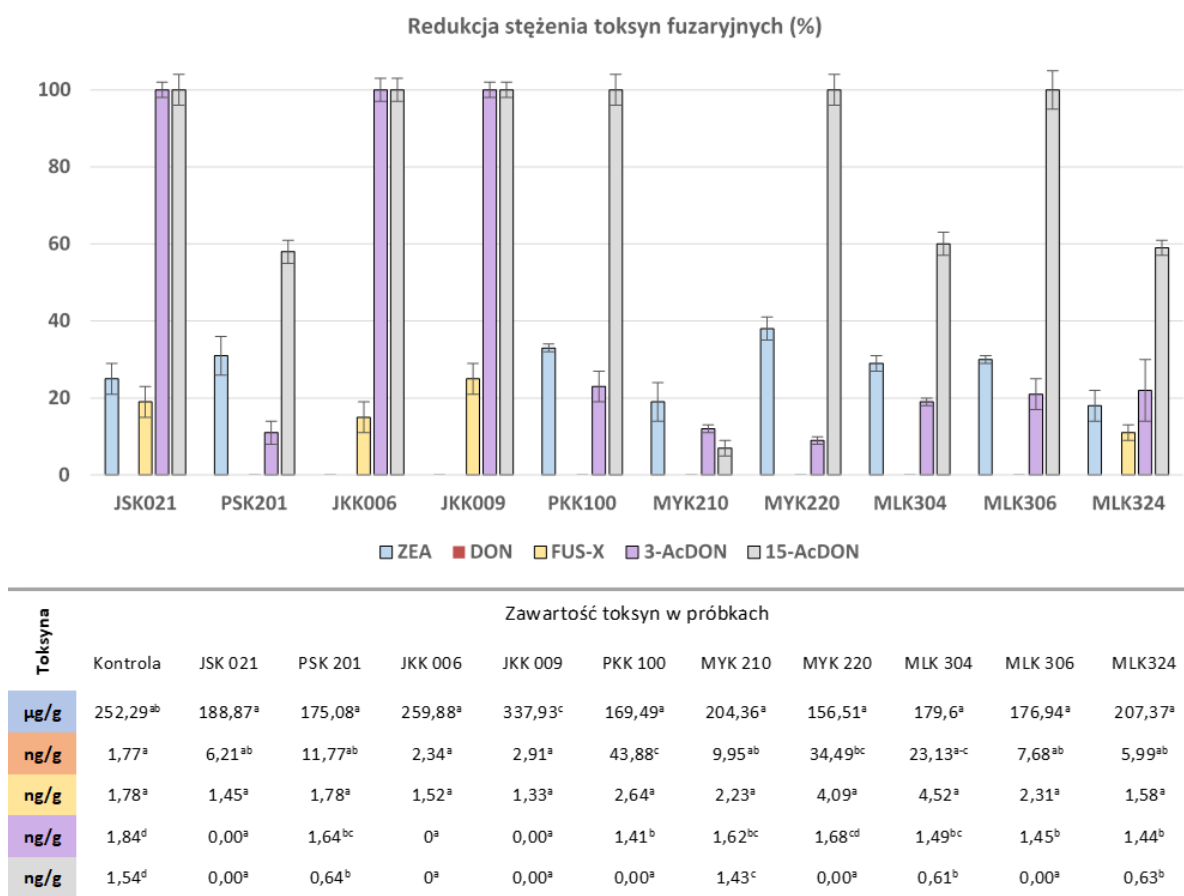
W niniejszym doświadczeniu oznaczono również stężenie mykotoksyn jakie zostały wytworzone przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Fusarium*: zearalenonu (ZEA) oraz deoksyniwalenolu (DON), jak również jego pochodnych tj. fuzarenonu X (FUS-X), 3 – acetylodeksyniwalenolu (3-AcDON) i 15 – acetylodeksyniwalenolu (15-AcDON). Średnią, procentową redukcją, jak również średnią zawartość oznaczanych mykotoksyn w poszczególnych wariantach przedstawiono na wykresach 8 i 9.

W przypadku ziarna zakażanego *F. graminearum* można zauważyć, że redukcja poszczególnych toksyn różniła się w zależności od wykorzystanego do zaprawienia ziarna szczepu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (w przypadku redukcji ZEA i 15-AcDON) lub

wypadała podobnie dla wszystkich badanych szczepów bakteryjnych (w przypadku DON, FUS-X oraz 3-AcDON). W największym stopniu zredukowana została zawartość DON w porównaniu do próby kontrolnej. Wszystkie badane bakterie z rodzaju *Lactobacillus* spowodowały obniżenie zawartości DON w blisko 99%. Również w przypadku stężenia FUS-X zaobserwowano znaczące różnice w stosunku do próby kontrolnej, zwłaszcza w przypadku *L. buchneri* JSK 021 i MYK 220, *L. paracasei* JKK 009, *L. pentosus* PKK 100 oraz *L. plantarum* MYK 210 i MLK 306, gdzie nie stwierdzono obecności FUS-X. W ziarnie pszenicy zaprawianym pozostałymi szczepami, *L. pentosus* PSK 201, *L. plantarum* MLK 304 oraz *L. buchneri* MLK324, stwierdzono redukcję stężenia FUS-X kolejno o 50, 55 i 53%. Analizując stężenie ZEA w zakażonym ziarnie, obserwowano wyraźne różnice w zależności od szczepu bakterii *Lactobacillus*, którym zaprawiano ziarno. Największy stopień redukcji ZEA odnotowano dla próbek ziarna zaprawianego *L. plantarum* MLK 306 (82%), *L. buchneri* MYK 220 (81%) oraz *L. plantarum* MYK 210 (80%). W próbkach, w których wykorzystano *L. buchneri* JSK 021 oraz *L. pentosus* PKK 100, stwierdzono umiarkowaną redukcję stężenia ZEA (kolejno o 42 i 38%), natomiast niski stopień redukcji ilości ZEA obserwowano dla próbek zaprawianych *L. paracasei* JKK 009 (22%), *L. pentosus* PSK 201 (16%) oraz *L. buchneri* MLK 324 (5%). W przypadku ziarna zaprawianego *L. paracasei* JKK 006 odnotowano wyższe stężenie ZEA (940,33 µg/g) w porównaniu do próby kontrolnej (410,49 µg/g). We wszystkich próbkach ziarna zaobserwowano również wyższe stężenie 3-AcDON niż w próbce kontrolnej, stąd nie stwierdzono redukcji tej toksyny w zakażonym ziarnie pszenicy.

Wpływ zaprawiania ziarna pszenicy badanymi bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* na poziom stężenia toksyn fuzaryjnych, wytwarzanych przez *F. culmorum*, różnił się od wyników otrzymanych w przy zakażeniu ziaren grzybem *F. graminearum*. W tym przypadku nie stwierdzono obniżenia stężenia DON w ziarnach zaprawianych badanymi bakteriami (stężenie w próbkach było wyższe aniżeli w próbkach kontrolnych). Wyższe stężenie FUS-X w ziarnach pszenicy w porównaniu z próbką kontrolną zaobserwowano również w próbkach zaprawianych *L. pentosus* PKK 100 i PSK 201, *L. buchneri* MYK 220 oraz we wszystkich próbkach zaprawianych bakteriami *L. plantarum*. Mniejsze stężenie FUS-X, odnotowano w ziarnach inokulowanych hodowlami obu szczepów *L. paracasei* oraz dwóch szczepów *L. buchneri* (MLK 324 i JSK 021), stwierdzając zmniejszony poziom FUS-X w zakresie 11 – 25%, zależnie od szczepu bakteryjnego. Zaprawienie ziaren pszenicy

badanymi bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* spowodowało obniżenie poziomu toksyny 15-AcDON.



\*ZEA – zearalenon, DON – deoksyniwalenol, FUS-X – fuzarenon X, 3-AcDON – 3-acetylodeoksyniwalenol, 15-AcDON – 15-acetylodeoksyniwalenol

\*średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych toksyn różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 9. Procentowa redukcja toksyn fuzaryjnych przez wyselekcjonowane bakterie z rodzaju *Lactobacillus* w ziarnie pszenicy zakażonym *F. culmorum***

Źródło: na podstawie badań własnych

W sześciu wariantach, przy wykorzystaniu *L. buchneri* JSK 021 i MYK 220, *L. paracasei* JKK 006 i JKK 009, *L. pentosus* PKK 100 oraz *L. plantarum* MLK 306, nie stwierdzono obecności 15-AcDON (100% redukcja w stosunku do prób kontrolnych). W pozostałych wariantach, w porównaniu z próbkami kontrolnymi, odnotowano zmniejszenie poziomu tej toksyny od 7% (*L. plantarum* MYK 210) do 60% (*L. plantarum* MLK 304). W przypadku 3-AcDON, nie stwierdzono obecności tej toksyny w próbkach inokulowanych bakteriami *L. paracasei* oraz *L. buchneri* JSK 021, natomiast w pozostałych ziarnach pszenicy odnotowano od 9 do 23% zmniejszone stężenie 3-AcDON. Analizując stężenie ZEA w ziarnach pszenicy zakażonych *F. culmorum*, obserwowano mniejsze obniżenie ilości

toksyny po inokulacji bakteriami fermentacji mlekowej, niż w przypadku prób zakażanych *F. graminearum*. Największą zredukację poziomu ZEA, 30 – 38%, odnotowano w ziarnie zaprawianym *L. plantarum* MLK 306, *L. pentosus* PSK 201 i PKK 100 oraz *L. buchneri* MYK 220. Ponad 20% obniżenie stężenia ZEA, w porównaniu z próbkami kontrolnymi zaobserwowano w wariantach z wykorzystaniem *L. plantarum* MLK 304 i *L. buchneri* JSK 021, natomiast poniżej 20% redukcji ZEA (19 i 18%) stwierdzono dla ziaren inokulowanych kolejno *L. plantarum* MYK 210 i *L. buchneri* MLK 324. Wyższe stężenie ZEA w odniesieniu do próbek kontrolnych można było zaobserwować w przypadku ziaren zaprawianych bakteriami *L. paracasei*.

Warto podkreślić, iż oba grzyby z rodzaju *Fusarium* różnie reagowały na kontakt z zaprawionym bakteriami kwasu mlekowego ziarnem w zakresie wzrostu i syntezy toksycznych metabolitów wtórnych. Może to świadczyć o różnym mechanizmie reagowania grzybów na czynniki drażniące, które w tym doświadczeniu stanowiły badane bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Sytuacja ta może być również powiązana ze stopniem hamowania wzrostu grzybów przez bakterie fermentacji mlekowej. W przypadku ziarna pszenicy zakażonego *F. culmorum*, obserwowano większe hamowanie wzrostu grzyba (wyższy stopień redukcji ergosterolu), co mogło być związane z silniejszym oddziaływaniem bakterii kwasu mlekowego na patogen. Zwiększona aktywność badanych bakterii w zakresie ograniczania wzrostu grzybnia *F. culmorum*, mogła zatem stanowić czynnik drażniący, skutkując zwiększoną reakcją grzyba na niekorzystne warunki wzrostu (synteza większej ilości metabolitów wtórnych), co przykładowo obserwować można było w przypadku ilości deoksyniwalenolu – wyższe stężenie w próbkach zaprawianych bakteriami w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Zagadnienie związane z większą syntezą toksycznych metabolitów wtórnych, na skutek zwiększonego stresu środowiskowego, poruszyła w pracy przeglądowej Suchorzyńska i Misiewicz (2012) omawiając wpływ pestycydów na grzyby strzępkowe.

W literaturze naukowej można znaleźć wiele opracowań, dotyczących możliwości wykorzystania różnego rodzaju mikroorganizmów w biologicznej ochronie roślin. Przykładowo, Shi i in. (2014) badali wpływ bakterii, izolowanych z łupin orzechów, na wzrost *F. graminearum* i zawartość deoksyniwalenolu w ziarnach pszenicy. Autorzy wykazali, że badane szczepy, zidentyfikowane jako bakterie z rodzaju *Bacillus*, wyraźnie hamowały wzrost *F. graminearum* przez minimum 10 dni, natomiast po 18 dniach grzybnia porosła całość ziaren pszenicy (brak różnic w porównaniu z próbą kontrolną).

Podobne rezultaty otrzymano w niniejszej pracy, gdyż po czasie inkubacji (po 21 dniach) grzybnie *F. culmorum* i *F. graminearum* porosły całość materiału roślinnego (pomimo wyraźnego zahamowania wzrostu na podstawie analizy ilości ergosterolu). W przypadku redukcji stężenia DON, autorzy wykazali wysoki stopień redukcji dla dwóch szczepów badanych bakterii z rodzaju *Bacillus* (w granicach 88 – 90%), natomiast trzy szczepy wykazały niski stopień redukcji tej toksyny. W prezentowanej pracy również obserwowano różnice w zakresie redukcji poszczególnych toksyn, jednakże było to związane bardziej z rodzajem grzyba niż ze szczepem bakteryjnym. Zastosowanie bakterii do biologicznej ochrony zbóż przed grzybami z rodzaju *Fusarium* zaprezentowali również Nagaraja i in. (2016), badając wpływ szczepu *Azotobacter nigricans* AZT 54, pochodzącego z próbki gleby z pola ryżowego. W swoich badaniach wykazali, że badany szczep *A. nigricans* skutecznie ograniczał (w zakresie 30 – 48,8%) występowanie grzybów z rodzaju *Fusarium* (w tym *F. culmorum* i *F. graminearum*) na ziarnie pszenicy, kukurydzy i sorgo inokulowanym zarówno samymi zarodnikami grzybów strzępkowych, jak i mieszaniną bakterii *A. nigricans* oraz zarodników grzybów *Fusarium*. W przypadku inokulacji ziarna wyłącznie kulturami bakteryjnymi, autorzy stwierdzili minimalne występowanie infekcji grzybowej na ziarnach zbóż (poniżej 8% stwierdzonych przypadków chorobowych). Chan i in. (2009) określili wpływ *B. subtilis* D1/2 na redukcję ergosterolu i deoksyniwalenolu, produkowanego przez *F. graminearum*, w ziarnie kukurydzy w warunkach polowych. Badany szczep *B. subtilis* D1/2 redukował ilość ergosterolu w 53 – 58% oraz zawartość deoksyniwalenolu w zakresie od 41 do 51%. Natomiast stopień redukcji uzależniony był od dawki i czasu inokulacji bakteriami po zarażeniu ziarna zarodnikami *F. graminearum*. W badaniach nad biologiczną kontrolą patogenów roślin uprawnych, również drożdże znalazły zastosowanie. Przykładowo, szczep *Debaryomyces hansenii*, izolowany ze środowiska morskiego, wykazywał potencjał w zakresie kontroli grzybów strzępkowych na ziarnie kukurydzy (Medina-Córdova i in., 2016). Izolat *D. hansenii* skutecznie ograniczał wzrost między innymi *F. proliferatum* (do 4 dni) oraz *F. subglutinans* (do 5 dni) na ziarnie kukurydzy. Medina-Córdova i in. (2016) wykazali również, że badany szczep *D. hansenii* skutecznie redukował poziom fumonizyny syntezowanej przez *F. subglutinans* (niemal w 60%) w ziarnie kukurydzy, natomiast w przypadku ziarna zaszczepionego *F. proliferatum* autorzy nie zaobserwowali spadku stężenia toksyny po inokulacji ziarna hodowlą drożdży.

Bakterie fermentacji mlekowej uważa się za grupę mikroorganizmów o dużym potencjale w zakresie biologicznej ochrony roślin. Zakwalifikowanie LAB do biologicznych

czynników kontroli patogenów roślin (BCAs, ang. *Biological Control Agents*), wynika z ich szerokiego spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, zwłaszcza w zakresie właściwości fungistatycznej (Lamont, Wilkins, Bywater-Ekegärd i Smith, 2017). Warto zwrócić uwagę, iż pomimo podkreślania w literaturze naukowej roli bakterii kwasu mlekowego w ograniczaniu skażenia roślin uprawnych przez grzyby strzępkowe, wciąż niewiele jest badań ściśle związanych z tym zagadnieniem. Większość badań nad biologicznymi czynnikami ochrony roślin skupia się nad wąską grupą mikroorganizmów, związanych głównie ze środowiskiem ryzosfery jak bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*, czy grzyby strzępkowe (Vessey, 2003). Bakterie fermentacji mlekowej nie stanowią dominującej grupy mikroorganizmów ryzosfery, głównie ze względu na ograniczenia w zakwaszaniu tej niszy ekologicznej (Lamont i in., 2017), co związane jest z szybkim rozkładem w glebie produkowanych przez nie kwasów organicznych (Jones, 1998). Niemniej jednak, bakterie kwasu mlekowego są powszechnie izolowane z różnych rodzajów gleb. Najliczniej występują w glebach bogatych w węgiel, obejmujących obszar hodowli zwierzęcych czy drzew owocowych (Chen, Yanagida i Shinohara, 2005; Bae, Fleet i Heard, 2006; Reyes-Escogido i in., 2010). Z kolei dużym zróżnicowaniem gatunkowym, w obrębie grupy bakterii kwasu mlekowego, cechuje się przykładowo ryzosfera w obrębie upraw oliwek czy trufli pustynnych (Fhoula i in., 2013). Warto jednak podkreślić, iż zdecydowanie większa ilość badań związana z bakteriami fermentacji mlekowej, pod kątem ich ewentualnego zastosowania jako BCAs, dotyczy szczepów izolowanych z różnego rodzaju roślinnych produktów fermentowanych. Przykładowo, Juodeikiene i in. (2018) szacowali wpływ *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, oraz trzech szczepów *P. pentosaceus* KTU05-8, KTU05-9, KTU05-10, izolowanych z zakwasu żytniego, na wzrost i produkcję mykotoksyn przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Autorzy wykazali znaczący wpływ badanych szczepów bakterii kwasu mlekowego na ograniczenie porażenia ziaren pszenicy przez grzyby strzępkowe (skuteczność w zakresie 87,3 – 95%). We wspomnianej pracy również zawartość toksyn (DON, ZEA oraz HT-2 i T-2 toksyny) w słodowanym ziarnie pszenicy była redukowana na poziomie od 12 do ok. 80%, w zależności od mykotoksyny i szczepu bakteryjnego. Husain, Hassan, Huda-Faujan i Lani (2017), badając szczepy LAB izolowane z gleby i owoców chili, wykazali, że badane izolaty charakteryzowały się aktywnością antagonistyczną wobec grzybów z rodzaju *Fusarium*, jak również pozytywnie wpływały na kiełkowanie ziaren chili co podkreśla duży potencjał tej grupy mikroorganizmów w uprawie roślin. Z kolei Gwiazdowski (2016), w swojej pracy określił



potencjał szczepu *L. plantarum* L2, pochodzącego z sianokiszonki, do ograniczania występowania chorób rzepaku w warunkach zarówno szklarniowych jak i polowych.

Biologiczna ochrona roślin uprawnych nie jest nowym zagadnieniem, jednakże coraz większe zainteresowanie tą metodą kontroli patogenów w uprawach powoduje, iż na świecie wciąż prowadzone są liczne badania w zakresie nowych rozwiązań biologicznych w agrotechnice (w tym poszukiwanie nowych szczepów mikroorganizmów). Można się zatem spodziewać, iż udział bakterii fermentacji mlekowej w biologicznej kontroli patogenów roślin będzie wzrastać, co podkreśla aktualność prowadzonych w niniejszej rozprawie badań.

#### **7.4.2. Określenie wiązania mykotoksyn fuzaryjnych przez komórki bakterii kwasu mlekowego**

W kolejnym etapie badań podjęto próbę oszacowania stopnia wiązania mykotoksyn fuzaryjnych przez wybrane izolaty bakterii fermentacji mlekowej. Zdolność do wiązania toksycznych metabolitów wtórnych grzybów strzępkowych przez bakterie kwasu mlekowego, może być cenną właściwością z punktu widzenia „oczyszczania” już skażonych toksynami produktów/surowców lub wiązania toksyn w trakcie ich uwalniania do otoczenia przez grzyby strzępkowe. Potwierdzenie zdolności do wiązania mykotoksyn fuzaryjnych, dla badanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pozwoliłoby na ich potencjalne wykorzystanie jako adsorbentów toksyn, lub umocniłoby prewencyjny charakter tej grupy bakterii. W doświadczeniu oceniono zdolność do wiązania mykotoksyn przez 5 szczepów badanych bakterii fermentacji mlekowej. Badania przeprowadzono na 2 toksynach (ZEA i DON), występujących powszechnie w naszej strefie klimatycznej. Określono również wpływ różnych czynników, jak temperatura i czas inkubacji, pH środowiska, stężenie toksyny oraz inaktywacja termiczna komórek, na stopień wiązania ZEA oraz DON przez badane mikroorganizmy. Szczegóły oraz sposób wykonanego doświadczenia przedstawiono w punkcie 6.4.2 w części metodycznej. Wyniki przedstawiono w tabelach 25 - 29.

Tabela 25. Wpływ czasu inkubacji oraz rodzaju komórek na wiązanie zearalenonu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej

Stopień redukcji zearalenonu przez komórki bakteryjne w zależności od czasu inkubacji							
Szczep	Rodzaj komórek	Pozostała frakcja (µg/ml)	Stopień redukcji	Szczep	Rodzaj komórek	Pozostała frakcja (µg/ml)	Stopień redukcji
<b>15 min. Inkubacji</b>				<b>30 min inkubacji</b>			
<b>Kontrola</b>		4,80 <sup>b</sup> ± 0,38		<b>Kontrola</b>		5,56 <sup>c</sup> ± 0,09	
<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	2,26 <sup>a</sup> ± 0,54	53%	<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	2,28 <sup>a</sup> ± 0,60	59%
	martwe	4,50 <sup>b</sup> ± 0,05	6%		martwe	4,24 <sup>b</sup> ± 0,48	24%
<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	2,33 <sup>a</sup> ± 0,47	51%	<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	2,35 <sup>a</sup> ± 0,19	58%
	martwe	5,03 <sup>b</sup> ± 0,27	0%		martwe	4,88 <sup>bc</sup> ± 0,37	12%
<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	2,01 <sup>a</sup> ± 0,61	58%	<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	1,88 <sup>a</sup> ± 0,61	66%
	martwe	3,97 <sup>b</sup> ± 0,54	17%		martwe	4,03 <sup>b</sup> ± 0,32	28%
<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	2,13 <sup>a</sup> ± 0,62	56%	<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	1,85 <sup>a</sup> ± 0,19	67%
	martwe	4,79 <sup>b</sup> ± 0,17	0%		martwe	4,78 <sup>bc</sup> ± 0,30	14%
<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	2,11 <sup>a</sup> ± 0,55	56%	<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	2,10 <sup>a</sup> ± 0,31	62%
	martwe	4,03 <sup>b</sup> ± 0,08	16%		martwe	3,93 <sup>b</sup> ± 0,13	29%
<b>90 min. inkubacji</b>				<b>24 h inkubacji</b>			
<b>Kontrola</b>		4,47 <sup>b</sup> ± 0,55		<b>Kontrola</b>		5,21 <sup>b</sup> ± 0,02	
<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	2,40 <sup>a</sup> ± 0,66	46%	<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	1,86 <sup>a</sup> ± 0,54	64%
	martwe	3,89 <sup>b</sup> ± 0,48	13%		martwe	2,38 <sup>a</sup> ± 0,70	54%
<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	2,29 <sup>a</sup> ± 0,11	49%	<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	2,41 <sup>a</sup> ± 0,36	54%
	martwe	3,86 <sup>b</sup> ± 0,81	14%		martwe	2,29 <sup>a</sup> ± 0,64	56%
<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	1,78 <sup>a</sup> ± 0,22	60%	<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	1,99 <sup>a</sup> ± 0,68	62%
	martwe	3,80 <sup>b</sup> ± 0,37	15%		martwe	1,99 <sup>a</sup> ± 0,31	62%
<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	2,23 <sup>a</sup> ± 0,47	50%	<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	1,43 <sup>a</sup> ± 0,12	73%
	martwe	4,27 <sup>b</sup> ± 0,20	4%		martwe	2,53 <sup>a</sup> ± 0,64	51%
<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	2,02 <sup>a</sup> ± 0,12	55%	<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	1,90 <sup>a</sup> ± 0,35	64%
	martwe	4,06 <sup>b</sup> ± 0,21	9%		martwe	2,00 <sup>a</sup> ± 0,42	62%

\* średnie oznaczone różnymi literami w dla poszczególnych czasów inkubacji różnią się istotnie przy p <0,05

Źródło: na podstawie badań własnych

Na podstawie analizy wyników przedstawionych w tabeli 25 można stwierdzić, że czas inkubacji oraz rodzaj komórek wpływa na stopień wiązania ZEA przez badane bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Jak się okazało, największy wpływ na stopień redukcji stężenia ZEA miał rodzaj komórek (żywe/martwe). Komórki badanych bakterii kwasu mlekowego poddane inaktywacji termicznej wiązały ZEA w znacznie mniejszym stopniu, aniżeli komórki żywe. Dopiero po 24 h inkubacji można było zaobserwować redukcję stężenia toksyny na podobnym poziomie zarówno dla komórek martwych jak i nie inaktywowanych termicznie. Wyjątek stanowiły martwe komórki *L. paracasei* JKK009, *L. plantarum* MLK304 oraz *L. buchneri* MLK324, dla których po 30 minutowej inkubacji z toksyną odnotowano istotny spadek stężenia ZEA, kolejno 24, 28 i 29%. Wszystkie badane szczepy wiązały ZEA w bardzo zbliżonym stopniu, który wyniósł dla komórek żywych 51 – 58% po 15 minutach, 58 – 67% po 30 minutach, 46 – 60% po 90 minutach oraz 54 – 73% po 24 godzinach inkubacji, natomiast dla komórek martwych 4 – 17% po 15 minutach, 12 – 29% po 30 minutach, 0 – 15% po 90 minutach oraz 51 – 62% po 24 godzinach inkubacji. Warto zwrócić uwagę, iż badane szczepy bakterii *Lactobacillus* już po 15 minutach redukowały stężenie ZEA w ponad 50%. Generalnie można było obserwować wzrost ilości związanej mykotoksyny przy wydłużaniu czasu inkubacji, jednakże, po 90 minutach odnotowano wzrost ilości ZEA niezwiązanego w porównaniu do rezultatów otrzymanych po 30 minutowej inkubacji.

Badane szczepy bakterii *Lactobacillus* redukowały poziom DON w stopniu znacznie mniejszym w porównaniu do wiązania ZEA. W tym przypadku nie zaobserwowano różnic w redukcji stężenia toksyny, pomiędzy komórkami żywymi a martwymi. Wyjątek stanowił szczep *L. buchneri* MYK220 (przez cały okres inkubacji) oraz *L. buchneri* MLK324 po 24 godzinach inkubacji, gdzie redukcja stężenia DON była większa w przypadku komórek żywych. Dla wszystkich badanych szczepów wraz z wydłużaniem czasu inkubacji komórek z toksyną, odnotowano spadek stężenia DON, za wyjątkiem szczepu *L. buchneri* MYK220 (komórki żywe i martwe) oraz *L. paracasei* JKK009 i *L. buchneri* MLK324 (komórki martwe), gdzie po 24 godzinach stężenie DON wzrosło. Zdecydowanie najgorsze efekty odnotowano dla szczepu *L. plantarum* MLK304, w przypadku, którego redukcja stężenia DON nie przekraczała 10%, niezależnie od czasu inkubacji komórek z toksyną. W największym stopniu DON wiązany był przez szczep *L. buchneri* MLK324 (w zakresie 17 – 30%), przy czym maksymalny spadek stężenia toksyny obserwowano po 90 min. inkubacji dla komórek inaktywowanych termicznie.

Tabela 26. Wpływ czasu inkubacji oraz rodzaju komórek na wiązanie deoksyniwalenolu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej

Stopień redukcji deoksyniwalenolu przez komórki bakteryjne w zależności od czasu inkubacji							
Szczep	Rodzaj komórek	Pozostała frakcja (µg/ml)	Stopień redukcji	Szczep	Rodzaj komórek	Pozostała frakcja (µg/ml)	Stopień redukcji
<b>15 min. Inkubacji</b>				<b>30 min inkubacji</b>			
<b>Kontrola</b>		4,77 <sup>f</sup> ± 0,21		<b>Kontrola</b>		4,90 <sup>f</sup> ± 0,11	
<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	4,85 <sup>f</sup> ± 0,05	0%	<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	4,52 <sup>e</sup> ± 0,03	8%
	martwe	4,66 <sup>f</sup> ± 0,10	2%		martwe	4,53 <sup>e</sup> ± 0,06	8%
<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	4,03 <sup>bc</sup> ± 0,08	16%	<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	3,83 <sup>bc</sup> ± 0,03	22%
	martwe	4,14 <sup>cd</sup> ± 0,05	13%		martwe	3,92 <sup>cd</sup> ± 0,07	20%
<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	4,57 <sup>ef</sup> ± 0,03	4%	<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	4,49 <sup>e</sup> ± 0,02	9%
	martwe	4,69 <sup>f</sup> ± 0,07	2%		martwe	4,64 <sup>e</sup> ± 0,08	5%
<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	4,11 <sup>cd</sup> ± 0,10	14%	<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	4,04 <sup>d</sup> ± 0,07	18%
	martwe	4,34 <sup>de</sup> ± 0,12	9%		martwe	4,47 <sup>e</sup> ± 0,10	9%
<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	3,73 <sup>a</sup> ± 0,06	22%	<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	3,64 <sup>ab</sup> ± 0,06	26%
	martwe	3,74 <sup>ab</sup> ± 0,10	22%		martwe	3,50 <sup>a</sup> ± 0,04	29%
<b>90 min. inkubacji</b>				<b>24 h inkubacji</b>			
<b>Kontrola</b>		4,90 <sup>f</sup> ± 0,11		<b>Kontrola</b>		4,87 <sup>f</sup> ± 0,07	
<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	4,46 <sup>e</sup> ± 0,12	9%	<i>L. paracasei</i> JKK009	żywe	4,04 <sup>cd</sup> ± 0,06	17%
	martwe	4,12 <sup>d</sup> ± 0,02	16%		martwe	4,30 <sup>de</sup> ± 0,08	12%
<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	3,63 <sup>abc</sup> ± 0,04	26%	<i>L. pentosus</i> PKK100	żywe	3,52 <sup>ab</sup> ± 0,03	28%
	martwe	3,83 <sup>c</sup> ± 0,04	22%		martwe	4,70 <sup>abc</sup> ± 0,04	24%
<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	4,55 <sup>e</sup> ± 0,06	7%	<i>L. plantarum</i> MLK304	żywe	4,56 <sup>ef</sup> ± 0,29	6%
	martwe	4,68 <sup>ef</sup> ± 0,03	5%		martwe	4,57 <sup>ef</sup> ± 0,25	6%
<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	3,79 <sup>bc</sup> ± 0,20	23%	<i>L. buchneri</i> MYK220	żywe	3,93 <sup>bcd</sup> ± 0,17	19%
	martwe	4,48 <sup>e</sup> ± 0,10	9%		martwe	4,64 <sup>ef</sup> ± 0,09	5%
<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	3,52 <sup>ab</sup> ± 0,09	28%	<i>L. buchneri</i> MLK324	żywe	3,47 <sup>a</sup> ± 0,21	29%
	martwe	3,41 <sup>a</sup> ± 0,08	30%		martwe	4,05 <sup>cd</sup> ± 0,11	17%

\* średnie oznaczone różnymi literami w dla poszczególnych czasów inkubacji różnią się istotnie przy p <0,05

Źródło: opracowanie własne

Tabela 27. Wpływ stężenia zearalenonu i deoksyniwalenolu na ich wiązanie przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej

Stożenie redukcji ZEA i DON w zaleźności od wyjściowego stężenia toksyny					
Zearalenon			Deoksyniwalenol		
Szczep	Pozostała frakcja ( $\mu\text{g/ml}$ )	Stożenie redukcji	Szczep	Pozostała frakcja ( $\mu\text{g/ml}$ )	Stożenie redukcji
<b>Stężenie wyjściowe toksyny 1 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>					
Kontrola	1,02 <sup>b</sup> $\pm$ 0,13		Kontrola	0,92 <sup>b</sup> $\pm$ 0,05	
<i>L. paracasei</i> JKK009	0,63 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,28	38%	<i>L. paracasei</i> JKK009	0,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	25%
<i>L. pentosus</i> PKK100	0,39 <sup>a</sup> $\pm$ 0,09	61%	<i>L. pentosus</i> PKK100	0,83 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	10%
<i>L. plantarum</i> MLK304	0,71 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,16	30%	<i>L. plantarum</i> MLK304	0,85 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	7%
<i>L. buchneri</i> MYK220	0,52 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,07	49%	<i>L. buchneri</i> MYK220	0,68 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	27%
<i>L. buchneri</i> MLK324	0,58 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,27	43%	<i>L. buchneri</i> MLK324	0,86 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	7%
<b>Stężenie wyjściowe toksyny 5 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>					
Kontrola	4,49 <sup>c</sup> $\pm$ 0,34		Kontrola	4,66 <sup>b</sup> $\pm$ 0,12	
<i>L. paracasei</i> JKK009	2,49 <sup>b</sup> $\pm$ 0,40	44%	<i>L. paracasei</i> JKK009	4,07 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	13%
<i>L. pentosus</i> PKK100	2,30 <sup>b</sup> $\pm$ 0,33	49%	<i>L. pentosus</i> PKK100	4,01 <sup>a</sup> $\pm$ 0,28	14%
<i>L. plantarum</i> MLK304	1,96 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,25	56%	<i>L. plantarum</i> MLK304	4,29 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,01	8%
<i>L. buchneri</i> MYK220	1,46 <sup>a</sup> $\pm$ 0,25	68%	<i>L. buchneri</i> MYK220	3,86 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13	17%
<i>L. buchneri</i> MLK324	1,29 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	71%	<i>L. buchneri</i> MLK324	4,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,20	12%
<b>Stężenie wyjściowe toksyny 10 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>					
Kontrola	8,71 <sup>a</sup> $\pm$ 0,61		Kontrola	9,15 <sup>b</sup> $\pm$ 0,13	
<i>L. paracasei</i> JKK009	7,79 <sup>a</sup> $\pm$ 0,32	11%	<i>L. paracasei</i> JKK009	6,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,30	26%
<i>L. pentosus</i> PKK100	7,79 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	11%	<i>L. pentosus</i> PKK100	6,57 <sup>a</sup> $\pm$ 0,15	28%
<i>L. plantarum</i> MLK304	7,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,34	10%	<i>L. plantarum</i> MLK304	6,73 <sup>a</sup> $\pm$ 0,15	26%
<i>L. buchneri</i> MYK220	7,92 <sup>a</sup> $\pm$ 0,86	9%	<i>L. buchneri</i> MYK220	6,90 <sup>a</sup> $\pm$ 0,03	25%
<i>L. buchneri</i> MLK324	7,83 <sup>a</sup> $\pm$ 0,42	10%	<i>L. buchneri</i> MLK324	6,58 <sup>a</sup> $\pm$ 0,42	28%

\* średnie oznaczone różnymi literami w dla poszczególnych stężeń wyjściowych toksyn różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne

W tabeli 27 przedstawiono wpływ stężenia zearalenonu i deoksyniwalenolu na ich wiązanie przez badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej. W przypadku ZEA badane szczepy bakterii *Lactobacillus* w dość dobrym stopniu redukowały jego ilość, gdy stężenie toksyny wynosiło 1 i 5  $\mu\text{g/cm}^3$ . Stożenie redukcji ZEA wyniosł 30 – 61% (przy stężeniu toksyny 1  $\mu\text{g/ml}$ ) oraz 44 – 71% (przy stężeniu toksyny 5  $\mu\text{g/ml}$ ), jednakże, tylko w przypadku *L. pentosus* PKK 100 odnotowano istotne różnice w końcowym stężeniu ZEA w porównaniu do próbki kontrolnej. Przy wysokim stężeniu ZEA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) odnotowano niski poziom redukcji toksyny, w granicach 10% dla wszystkich badanych szczepów bakteryjnych.

Analizując wiązanie DON przez badane bakterie fermentacji mlekowej obserwowano mniejszy stopień redukcji toksyny w porównaniu do ZEA, przy stężeniu DON 1 i 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Jednakże, w przypadku stężenia DON 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , badane bakterie w większym stopniu wiązały DON, w zakresie 25 – 28%, w porównaniu do wiązania ZEA. Warto podkreślić, iż *L. plantarum* MLK304, tak jak w poprzednim wariancie, redukowało stężenie DON w niespełna 10% (przy stężeniu toksyny 1 i 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), natomiast *L. paracasei* JKK009 oraz *L. buchneri* MYK220, przy stężeniu DON 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , cechowały się znaczącą, w porównaniu do innych szczepów, redukcją poziomu toksyny.

**Tabela 28. Wpływ temperatury inkubacji na wiązanie zearalenonu i deoksyniwalenolu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej**

Stopień redukcji ZEA i DON w zależności od temperatury inkubacji					
Zearalenon			Deoksyniwalenol		
Szczep	Pozostała frakcja ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Stopień redukcji	Szczep	Pozostała frakcja ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Stopień redukcji
<b>Temperatura inkubacji 4°C</b>					
Kontrola	4,65 <sup>a</sup> ± 0,10		Kontrola	4,80 <sup>b</sup> ± 0,06	
<i>L. paracasei</i> JKK009	4,21 <sup>a</sup> ± 0,50	9%	<i>L. paracasei</i> JKK009	4,13 <sup>a</sup> ± 0,10	14%
<i>L. pentosus</i> PKK100	4,40 <sup>a</sup> ± 0,05	5%	<i>L. pentosus</i> PKK100	4,00 <sup>a</sup> ± 0,15	17%
<i>L. plantarum</i> MLK304	4,08 ± 0,25	12%	<i>L. plantarum</i> MLK304	4,17 <sup>a</sup> ± 0,02	13%
<i>L. buchneri</i> MYK220	4,19 <sup>a</sup> ± 0,04	10%	<i>L. buchneri</i> MYK220	4,19 <sup>a</sup> ± 0,02	13%
<i>L. buchneri</i> MLK324	4,49 <sup>a</sup> ± 0,22	3%	<i>L. buchneri</i> MLK324	4,12 <sup>a</sup> ± 0,02	14%
<b>Temperatura inkubacji 25°C</b>					
Kontrola	4,65 <sup>c</sup> ± 0,10		Kontrola	4,74 <sup>b</sup> ± 0,05	
<i>L. paracasei</i> JKK009	2,49 <sup>b</sup> ± 0,40	46%	<i>L. paracasei</i> JKK009	4,11 <sup>a</sup> ± 0,09	13%
<i>L. pentosus</i> PKK100	2,30 <sup>b</sup> ± 0,33	51%	<i>L. pentosus</i> PKK100	3,73 <sup>a</sup> ± 0,21	21%
<i>L. plantarum</i> MLK304	1,96 <sup>ab</sup> ± 0,25	58%	<i>L. plantarum</i> MLK304	4,15 <sup>a</sup> ± 0,03	12%
<i>L. buchneri</i> MYK220	1,46 <sup>a</sup> ± 0,25	69%	<i>L. buchneri</i> MYK220	3,98 <sup>a</sup> ± 0,29	16%
<i>L. buchneri</i> MLK324	1,29 <sup>a</sup> ± 0,04	72%	<i>L. buchneri</i> MLK324	4,12 <sup>a</sup> ± 0,40	13%
<b>Temperatura inkubacji 40°C</b>					
Kontrola	4,65 <sup>c</sup> ± 0,10		Kontrola	4,82 <sup>b</sup> ± 0,09	
<i>L. paracasei</i> JKK009	3,25 <sup>ab</sup> ± 0,60	30%	<i>L. paracasei</i> JKK009	3,79 <sup>a</sup> ± 0,05	21%
<i>L. pentosus</i> PKK100	3,66 <sup>b</sup> ± 0,06	21%	<i>L. pentosus</i> PKK100	3,74 <sup>a</sup> ± 0,24	22%
<i>L. plantarum</i> MLK304	3,53 <sup>b</sup> ± 0,10	24%	<i>L. plantarum</i> MLK304	3,89 <sup>a</sup> ± 0,16	19%
<i>L. buchneri</i> MYK220	2,46 <sup>a</sup> ± 0,39	47%	<i>L. buchneri</i> MYK220	3,82 <sup>a</sup> ± 0,14	21%
<i>L. buchneri</i> MLK324	3,70 <sup>b</sup> ± 0,15	20%	<i>L. buchneri</i> MLK324	4,05 <sup>a</sup> ± 0,06	16%

\* Średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych temperatur inkubacji różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne

Temperatura inkubacji również wpływała na stopień na wiązania toksyn fuzaryjnych (tabela 28) przez badane bakterie fermentacji mlekowej. Inkubacja badanych szczepów *Lactobacillus* z roztworem ZEA w temperaturze 4°C nie wpłynęła znacząco na związanie toksyny przez komórki bakteryjne. Redukcja stężenia ZEA w tym wariacie oscylowała na poziomie 3 – 12% w zależności od szczepu bakteryjnego. Po inkubacji komórek bakterii z ZEA w temperaturze 40°C redukcja ilości toksyny wynosiła od 20% (dla *L. buchneri* MLK324) do 47% (dla *L. buchneri* MYK220). Optymalną temperaturą do wiązania ZEA przez badane szczepy bakteryjne, okazała się temperatura 25°C, gdzie stężenie toksyny redukowane było w zakresie 46 – 72%. W przypadku DON odnotowano niższą redukcję toksyny przez wybrane bakterie *Lactobacillus*, z wyjątkiem inkubacji komórek z DON w temperaturze 4°C, gdzie redukcja stężenia toksyny wynosiła 13 – 17%. Inkubacja w pozostałych temperaturach przyczyniła się do spadku stężenia DON od 13 do 22%, przy czym najefektywniejszy okazał się *L. pentosus* PKK100 – 21 oraz 22% spadek stężenia DON kolejno dla temperatury inkubacji 25 i 40°C.

Oceniając wpływ pH na wiązanie toksyn, stwierdzono, że szczepy bakterii skutecznie redukowały poziom ZEA podczas inkubacji komórek w środowisku o pH 7. Redukcja stężenia ZEA wyniosła od 46 do 72%. Niewielki poziom wiązania ZEA stwierdzono przy pH środowiska równemu 9 (1 – 13%), natomiast redukcja w środowisku o pH 3 wyniosła od 19 do 30%. Należy zwrócić uwagę, iż w pH 3 jak i 9 stężenie ZEA pozostałe po inkubacji z komórkami bakteryjnymi nie różniło się istotnie od zawartości toksyny w próbce kontrolnej. Stężenie DON, porównywalnie do poprzednich wariantów, było redukowane w znacznie mniejszym stopniu przez badane bakterie *Lactobacillus*, zwłaszcza w pH 3 i 7, natomiast w środowisku o pH 9 obserwowano podobny stopień wiązania DON jak w przypadku ZEA (w zakresie 7 – 13%). Wiązanie DON, w największym zakresie, obserwowano w przypadku *L. pentosus* PKK100, *L. plantarum* MLK304 oraz *L. buchneri* MLK324 przy pH środowiska 3, gdzie redukcja toksyny wyniosła kolejno 24, 21 oraz 22%. Warto podkreślić, że we wszystkich wariantach oraz dla większości szczepów, obserwowano istotnie niższy poziom DON w porównaniu do próbek kontrolnych.

Tabela 29. Wpływ pH środowiska na wiązanie zearalenonu i deoksyniwalenolu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej

Stopień redukcji ZEA i DON w zależności od pH środowiska					
Zearalenon			Deoksyniwalenol		
Szczep	Pozostała frakcja (µg/ml)	Stopień redukcji	Szczep	Pozostała frakcja (µg/ml)	Stopień redukcji
<b>pH 3</b>					
Kontrola	4,79 <sup>a</sup> ± 0,31		Kontrola	3,88 <sup>c</sup> ± 0,10	
<i>L. paracasei</i> JKK009	3,68 <sup>a</sup> ± 0,70	23%	<i>L. paracasei</i> JKK009	3,18 <sup>ab</sup> ± 0,05	18%
<i>L. pentosus</i> PKK100	3,59 <sup>a</sup> ± 0,72	25%	<i>L. pentosus</i> PKK100	2,94 <sup>a</sup> ± 0,10	24%
<i>L. plantarum</i> MLK304	3,42 <sup>a</sup> ± 0,58	29%	<i>L. plantarum</i> MLK304	3,05 <sup>a</sup> ± 0,10	21%
<i>L. buchneri</i> MYK220	3,90 <sup>a</sup> ± 0,60	19%	<i>L. buchneri</i> MYK220	3,41 <sup>b</sup> ± 0,22	12%
<i>L. buchneri</i> MLK324	3,36 <sup>a</sup> ± 0,60	30%	<i>L. buchneri</i> MLK324	3,03 <sup>a</sup> ± 0,09	22%
<b>pH 7</b>					
Kontrola	4,65 <sup>c</sup> ± 0,10		Kontrola	4,66 <sup>b</sup> ± 0,12	
<i>L. paracasei</i> JKK009	2,49 <sup>b</sup> ± 0,40	46%	<i>L. paracasei</i> JKK009	4,07 <sup>a</sup> ± 0,04	13%
<i>L. pentosus</i> PKK100	2,30 <sup>b</sup> ± 0,33	51%	<i>L. pentosus</i> PKK100	4,01 <sup>a</sup> ± 0,28	14%
<i>L. plantarum</i> MLK304	1,96 <sup>ab</sup> ± 0,25	58%	<i>L. plantarum</i> MLK304	4,29 <sup>ab</sup> ± 0,01	8%
<i>L. buchneri</i> MYK220	1,46 <sup>a</sup> ± 0,25	69%	<i>L. buchneri</i> MYK220	3,86 <sup>a</sup> ± 0,13	17%
<i>L. buchneri</i> MLK324	1,29 <sup>a</sup> ± 0,04	72%	<i>L. buchneri</i> MLK324	4,12 <sup>a</sup> ± 0,20	12%
<b>pH 9</b>					
Kontrola	5,77 <sup>a</sup> ± 0,29		Kontrola	4,61 <sup>c</sup> ± 0,07	
<i>L. paracasei</i> JKK009	5,56 <sup>a</sup> ± 0,55	4%	<i>L. paracasei</i> JKK009	4,28 <sup>b</sup> ± 0,06	7%
<i>L. pentosus</i> PKK100	5,20 <sup>a</sup> ± 0,52	10%	<i>L. pentosus</i> PKK100	3,99 <sup>a</sup> ± 0,07	13%
<i>L. plantarum</i> MLK304	5,50 <sup>a</sup> ± 0,44	5%	<i>L. plantarum</i> MLK304	4,18 <sup>ab</sup> ± 0,05	9%
<i>L. buchneri</i> MYK220	5,70 <sup>a</sup> ± 0,48	1%	<i>L. buchneri</i> MYK220	4,23 <sup>b</sup> ± 0,03	8%
<i>L. buchneri</i> MLK324	5,00 <sup>a</sup> ± 0,50	13%	<i>L. buchneri</i> MLK324	4,07 <sup>ab</sup> ± 0,16	12%

\* średnie oznaczone różnymi literami dla poszczególnych wartości pH różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne

Obecnie wiele badań naukowych skupia swoją uwagę na usuwaniu bądź unieszkodliwianiu mykotoksyn na drodze mikrobiologicznej (Gwiazdowska, 2014). Jest to związane z wysokimi kosztami wykorzystania metod fizycznych lub chemicznych, których stosowanie w rolnictwie nie jest praktyczne (Niderkorn i in., 2006), zwłaszcza biorąc pod uwagę rosnącą liczbę gospodarstw ekologicznych. W literaturze naukowej można znaleźć informacje dotyczące wiązania lub unieszkodliwiania mykotoksyn przez różne grupy mikroorganizmów. Przykładowo, Ciegler i in., (1966) oraz Lillehoj, Ciegler i Hall (1967) określili zdolność szczepu *Flavobacterium aurantiacum* do degradacji aflatoksyny B<sub>1</sub>



zarówno przez martwe jak i żywe komórki. Z kolei Petchkongkaew Taillandier, Gasaluck i Lebrihi (2008) określili zdolność do redukcji stężenia aflatoksyny B<sub>1</sub>, jak również ochratoksyny, dla różnych szczepów bakterii *Bacillus* spp. Dane literaturowe, związane z mikrobiologiczną eliminacją toksycznych metabolitów wtórnych grzybów strzępkowych, odnoszą się również do mykotoksyn fuzaryjnych. Na przykład dla niektórych szczepów grzybów z rodzaju *Rhizopus*, odnotowano niemal całkowitą degradację zearalenonu (Varga, Péteria, Táboria, Téren i Vágvölgyi, 2005). Redukcję stężenia ZEA zaobserwowano również dla dwóch szczepów bakterii *Brevibacillus* (Juś i in., 2016) oraz dla dwóch szczepów bakterii *Rhodococcus* (Gwiazdowski, Gwiazdowska, Juś i Waśkiewicz, 2015). Völkl, Vogler, Schollenberger i Karlovsky (2004) w swoich badaniach określili zdolność mieszaniny mikroorganizmów, izolowanych ze środowiska glebowego, do konwersji deoksyniwalenolu do pochodnych wykazujących mniejszą toksyczność. Z kolei Fuchs, Binder, Heidler i Krska (2002), określili zdolność szczepu *Eubacterium* sp. BBSH 797 do biotransformacji niektórych trichotecenów z grupy A w warunkach beztlenowych. Dużą uwagę, w zakresie eliminacji mykotoksyn, skupiają na sobie bakterie fermentacyjne, jak bakterie fermentacji mlekowej, które odgrywają istotną rolę w przemyśle rolniczym i spożywczym (Niderkorn i in., 2006; Gwiazdowska, 2014). El-Nezami, Kankaanpaa, Salminen i Ahokas (1998) określili zdolność do redukcji stężenia Aflatoksyny B<sub>1</sub> dla 5 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, przy czym najefektywniejsze działanie (ok. 80% redukcja stężenia toksyny) wykazywały szczepy *L. rhamnosus* GGo oraz LC-705. Niektóre bakterie fermentacji mlekowej są również w stanie redukować stężenie patuliny, co w swoich badaniach opisali Hatab, Yue i Mohamad (2012). Autorzy wykazali redukcję stężenia patuliny przez dwa szczepy *Bifidobacterium* i trzy szczepy bakterii *Lactobacillus*, wskazując, że najlepsze efekty uzyskiwane były po 24 h inkubacji oraz przy pH 4, natomiast rodzaj komórek (żywe martwe) nie wpływał na stopień redukcji toksyny. W niniejszej pracy również nie obserwowano istotnych różnic w redukcji ZEA po 24 godzinnej inkubacji pomiędzy komórkami żywymi i martwymi, jednakże, przy krótszym czasie inkubacji stopień wiązania ZEA był istotnie mniejszy w przypadku komórek inaktywowanych termicznie. Redukcję ilości patuliny, jak również ochratoksyny A, przez bakterie kwasu mlekowego w istotnym stopniu zostało także opisane przez Fuchs i in. (2008), przy czym najwyższy stopień redukcji poszczególnych toksyn wykazywały szczepy *B. animalis* VM 12 (patulina) oraz *L. acidophilus* VM 20 (ochratoksyna A). W literaturze opisana jest również redukcja toksyn fuzaryjnych przez bakterie fermentacji mlekowej. Przykładowo, Niderkorn i in. (2006) określili zdolność do redukcji

deoksyniwalenolu i fumonizyny B<sub>1</sub> przez między innymi bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*. Dodatkowo, autorzy określili stopień redukcji ZEA, NIV i FB<sub>2</sub> dla szczepów *L. rhamnosus* GG, *L. delburecki* spp. *bulgaricus* i *L. mesenteroides* wskazując, że badane szczepy najefektywniej redukowały stężenie DON, NIV, FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub> przy pH 4, natomiast wzrost pH (do 7,8) powodował ograniczenie w zakresie redukcji ilości toksyny za wyjątkiem redukcji ZEA, gdzie wraz ze wzrostem pH stopień redukcji był porównywalny bądź zwiększał się. W niniejszej pracy również obserwowano najwyższą redukcję ZEA przy pH 7, natomiast w środowisku o pH 3 i 9 nie obserwowano istotnych różnic w porównaniu z próbą kontrolną. Mokoena, Chelule i Gqaleni (2005) wykazali redukcję ZEA i FB<sub>1</sub> w fermentowanej mące kukurydzianej z dodatkiem bakterii starterowych (*S. lactis* i *L. delbrueckii*), w porównaniu do próbki poddanej spontanicznej fermentacji, przy czym istotną różnicę w redukcji ZEA (67 – 68,2%) oraz FB<sub>1</sub> (55,8 – 74,6) odnotowano zostało kolejno po 3 i 4 dniowej fermentacji. Warto również nadmienić, iż najbardziej prawdopodobnym mechanizmem redukcji stężenia mykotoksyn przez bakterie fermentacji mlekowej jest ich wiązanie przez ścianę komórkową bakterii (Niderkorn i in., 2006). Rolę ściany komórkowej bakterii kwasu mlekowego, w wiązaniu mykotoksyn, potwierdzają również inni autorzy (Haskard, Binnion i Ahokas, 2000; El-Nezami, Chrevatidis i in. 2002; El-Nezami, Polychronaki i in., 2002) wskazując, że w większości przypadków nie są obserwowane pochodne mykotoksyn po ich inkubacji z hodowlami bakterii kwasu mlekowego. Na mechanizm wiązania toksyn przez ścianę komórkową bakterii fermentacji mlekowej, wskazuje również redukcja stężenia mykotoksyn przez komórki inaktywowane termicznie (Niderkorn i in., 2006), co również zostało zaobserwowane w niniejszej pracy.

#### **7.4.3. Określenie stabilność kompleksu bakterii fermentacji mlekowej z zearalenonem w symulowanym układzie pokarmowym**

W kolejnym etapie badań określono stopień trwałości związanego ZEA przez komórki bakterii fermentacji mlekowej w trakcie pasażu przez symulowany układ pokarmowy. Ograniczony stopień uwalniania związanej toksyny do poszczególnych odcinków układu pokarmowego byłby cenną cechą wyizolowanych bakterii z punktu widzenia ich praktycznego zastosowania, głównie w kontekście poprawy bezpieczeństwa zdrowotnego. Do badań wybrano jeden szczep bakterii fermentacji mlekowej, *L. plantarum* MLK 304, ponieważ zarówno żywe i martwe komórki tego szczepu w wysokim i porównywalnym stopniu wiązały ZEA. Komórki bakteryjne, wraz ze związanym ZEA, pasażowano przez układ

pokarmowy symulujący ślinę, żołądek oraz jelito cienkie. Zgodnie z punktem 6.4.3. Wyjściową ilość ZEA związanego z komórkami *L. plantarum* MLK 304 stanowiła ilość oszacowana w poprzednim etapie badań (po 24 h inkubacji). Wyniki przedstawiono w tabeli 30.

**Tabela 30. Stabilność kompleksu bakterie-zearalenon podczas pasażu przez symulowany układ pokarmowy zwierząt monogastrycznych**

Stopień uwalniania ZEA w trakcie pasażu przez symulowany układ pokarmowy						
Etap transferu	Komórki żywe			Komórki inaktywowane termicznie		
	Ilość toksyny uwolnionej ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )		Ilość toksyny związanej ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	Ilość toksyny uwolnionej ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )		Ilość toksyny związanej ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )
	( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	(%)		( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	(%)	
	ZEA związany w ilości <b>3,24 <math>\mu\text{g}/\text{cm}^3</math></b>			ZEA związany w ilości <b>3,21 <math>\mu\text{g}/\text{cm}^3</math></b>		
Ślina	0,25 ± 0,02	7,7	2,99	0,36 ± 0,00	11,2	2,85
Żołądek (0h)	0,00 ± 0,00	0,0	2,99	0,00 ± 0,00	0,0	2,85
Żołądek (po 2 h)	0,01 ± 0,00	0,3	2,98	0,02 ± 0,00	0,6	2,83
Sok jelitowy (0h)	0,00 ± 0,00	0	2,98	0,00 ± 0,00	0,0	2,83
Sok jelitowy (po 2h)	0,02 ± 0,00	0,6	2,96	0,03 ± 0,01	0,9	2,80
<b>łącznie</b>	<b>0,28<sup>a</sup></b>	<b>8,6</b>	<b>2,96</b>	<b>0,41<sup>b</sup></b>	<b>12,7</b>	<b>2,80</b>

\* średnie oznaczone różnymi literami istotnie przy  $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne

W trakcie pasażu komórek bakterii *L. plantarum* MLK304 przez symulowany układ pokarmowy obserwowano niewielką ilość uwalnianej toksyny. Zarówno komórki żywe jak i inaktywowane termicznie cechowały się zbliżoną stabilnością kompleksu bakteria-mykotoksyna w poszczególnych odcinkach układu pokarmowego. Dla obu wariantów odnotowano najwyższy stopień uwalniania ZEA w ślinie, które wyniosło 7,7 oraz 11,2% kolejno dla komórek żywych i martwych. W ostatnim etapie pasażu przez układ pokarmowy z żywych komórek *L. plantarum* MLK304 uwolnione zostało 0,28  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  a z komórek martwych 0,41  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  ZEA.

Niniejsze doświadczenie miało na celu określenie, czy bakterie fermentacji mlekowej są zdolne do utrzymania związanej mykotoksyny w trakcie pasażu przez układ pokarmowy. Dane literaturowe wskazują, że bakterie fermentacji mlekowej, są zdolne do ograniczenia biodostępności mykotoksyn. Przykładowo, El-Nezami, Mykkänen, Kankaanpää, Salminen i Ahokas (2000) określił zdolność bakterii *L. rhamnosus* GG i LC do wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub>

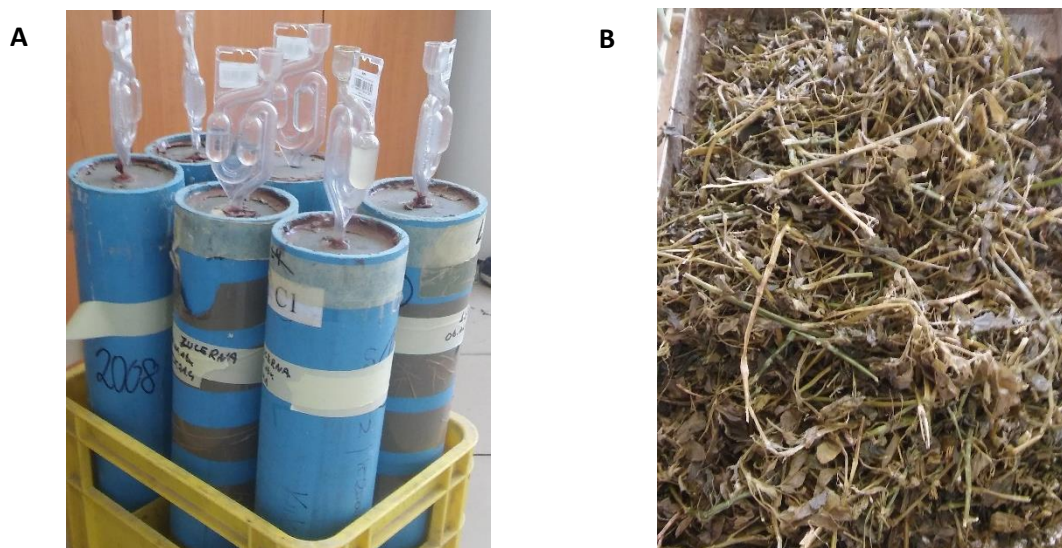
z płynu jelitowego w badaniach *in vivo* wykazując, że bakterie redukowały poziom toksyny do 74% w zależności od szczepu. Zmniejszenie biodostępności aflatoksyny M<sub>1</sub> odnotowano również w przypadku probiotycznych bakterii mlekowych, w tym *Bifidobacterium bifidum* NRRL B-41410, a redukcja stężenia mykotoksyny wynosiła od 23 do 45% w zależności od szczepu bakteryjnego (Serrano-Nino i in. 2013). Z kolei Gwiazdowska (2014) określiła zdolność bakterii fermentacji propionowej do ograniczenia biodostępności mykotoksyn fuzaryjnych, takich jak zearalenon, deoksynivalenol oraz fumonizyny, stwierdzając, że powstały kompleks bakteria-toksyna jest stabilny w trakcie pasażu przez symulowany układ pokarmowy. Określenie zdolności bakterii fermentacji mlekowej może stanowić bardzo istotny czynnik warunkujący ich przydatność do komponowania nowych preparatów probiotycznych czy dodatków paszowych lub kiszonkarskich.

#### **7.4.4. Wykorzystanie wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej do produkcji kiszzonek paszowych**

Zapewnienie odpowiedniego pokarmu dla zwierząt hodowlanych jest jednym z kluczowych elementów zapewniających powodzenie prowadzonej hodowli. Ważne jest zatem, by potrzeby żywieniowe zwierząt gospodarskich zaspokajane były paszami o wysokich walorach żywieniowych, jak również wysokim standardzie higienicznym (zapewnienie bezpieczeństwa zdrowotnego pasz). Z tego względu, ostatnim etapem pracy, w zakresie możliwości praktycznego zastosowania izolatów bakterii kwasu mlekowego, było wytworzenie kiszzonek paszowej. W tym celu dwa badane szczepy z rodzaju *Lactobacillus* (*L. plantarum* MLK 304 i *L. buchneri* MYK 220) oraz jeden kolekcyjny szczep bakterii z rodzaju *Propionibacterium* (*P. acidipropionici* PCM 2434), wykorzystano jako kultury wspomagające (starterowe) proces zakiszania lucerny. Bakterie fermentacji mlekowej są powszechnie stosowane w produkcji kiszzonek paszowych, przyczyniając się do poprawy samego procesu kiszenia, jak i zwiększają walory odżywcze i sensoryczne zakiszzonego materiału roślinnego. W doświadczeniu wykorzystano również szczep bakterii z rodzaju *Propionibacterium*, ze względu na przypuszczalną zdolność tej grupy bakterii do zapewnienia dłuższej stabilności mikrobiologicznej kiszzonek paszowych (produkcja kwasu propionowego i octowego). Miarą przydatności zastosowanych szczepów bakteryjnych w produkcji kiszzonek paszowych, było porównanie czystości mikrobiologicznej kiszzonek wytworzonych przy udziale badanych szczepów, do kiszzonek otrzymanych przy zastosowaniu komercyjnego preparatu do zakiszania. W doświadczeniu założono również,

że wykorzystanie całych hodowli bakteryjnych (bakterie wraz z płynem hodowlanym) pozytywnie wpłynie na parametry mikrobiologiczne przygotowywanych kiszonek z lucerny. Doświadczenie wykonano zgodnie z punktem 6.4.4., opisanym w części metodycznej.

Po zakończeniu procesu zakiszania lucerny, silosy zostały otwarte i wstępnie oceniono poprawność przygotowania kiszonki. Zakiszona lucerna cechowała się typowym dla kiszonek paszowych oliwkowo – zielonym zabarwieniem, jak i swoistym zapachem zakiszzonego materiału roślinnego. Nie stwierdzono również widocznych, niepożądanych zmian związanych z ewentualnym zakażeniem kiszonki przez grzyby strzępkowe w trakcie procesu kiszenia.



**Fotografia 15.** Zdjęcia z doświadczenia związanego z przygotowaniem kiszonki z lucerny zaprawionej badanymi szczepami bakterii fermentacji mlekowej: A – silosy z kieszonką z lucerny przed otwarciem oraz B – kieszonka z lucerny tuż po wyciągnięciu z silosu

Źródło: fotografie własne

W uzyskanych kieszonkach z lucerny określono następnie liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów, w celu określenia ich jakości higienicznej. W zakiszonym materiale oznaczono ogólną liczbę bakterii tlenowych, ogólną liczbę bakterii kwasu mlekowego, ogólną liczbę grzybów (drożdży i grzybów strzępkowych), jak również obecność bakterii z rodzaju *Salmonella*. Oznaczone zostało również stężenie mykotoksyn fuzaryjnych (DON i ZEA). Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z punktem 6.4.4, opisanym w części metodycznej. Wyniki z uzyskanych posiewów mikrobiologicznych przedstawiono w tabeli 31.

**Tabela 31. Jakość higieniczna kiszonek z lucerny oraz zawartość mykotoksyn w zależności od zastosowanego wariantu inokulacji materiału roślinnego przed zakiszeniem**

Wpływ badanych izolatów LAB i PAB na jakość mikrobiologiczną kisonki z lucerny oraz na zawartość mykotoksyn							
Wariant*	Liczba poszczególnej grupy mikroorganizmów (log jtk/g)					Stężenie toksyn (ng/g)	
	Ogólna liczba bakterii mezofilnych	Ogólna liczba bakterii kwasu mlekowego	Ogólna liczba drożdży	Ogólna liczba grzybów strzępkowych	Obecność bakterii <i>Salmonella</i> sp.	ZEA	DON
K	8,15 <sup>b</sup> ± 0,08	8,24 <sup>b</sup> ± 0,13	2,85 <sup>a</sup> ± 0,00	2,59 <sup>a</sup> ± 0,11	Brak	0,85 <sup>a</sup>	nw
MYK	8,11 <sup>b</sup> ± 0,06	8,74 <sup>c</sup> ± 0,13	2,67 <sup>a</sup> ± 0,52	2,50 <sup>a</sup> ± 0,17	Brak	nw	nw
MLK	7,86 <sup>a</sup> ± 0,02	7,85 <sup>a</sup> ± 0,23	2,27 <sup>a</sup> ± 0,32	2,39 <sup>a</sup> ± 0,27	Brak	nw	nw
PCM	8,55 <sup>d</sup> ± 0,02	8,60 <sup>b</sup> ± 0,21	2,45 <sup>a</sup> ± 0,21	2,50 <sup>a</sup> ± 0,24	Brak	nw	0,36 <sup>a</sup>
M	8,31 <sup>c</sup> ± 0,09	8,33 <sup>b</sup> ± 0,02	2,54 <sup>a</sup> ± 0,09	2,49 <sup>a</sup> ± 0,20	Brak	2,53 <sup>a</sup>	0,80 <sup>a</sup>

\* K – preparat handlowy, MYK – *L. buchneri* MYK 220; MLK – *L. plantarum* MLK 304; PCM – *P. acidopropionici* PCM 2434; M – mieszanka bakterii *L. buchneri* JSK 021, *L. plantarum* MLK 304 i *P. acidopropionici* PCM 2434; nw – nie wykryto

\* Średnie oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

Źródło: opracowanie własne

Z otrzymanych danych wynika, że zastosowanie wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* i *Propionibacterium*, jako kultur wspomagających proces kiszenia, zarówno pojedynczo jak i w mieszance, jest w równym stopniu skuteczne w porównaniu z preparatem handlowym. Zarówno w przypadku ogólnej liczby drożdży i grzybów strzępkowych we wszystkich wariantach obserwowano zbliżoną liczbę tych grup mikroorganizmów w kisonkach z lucerny (2,27 – 2,85 log jtk/g dla drożdży oraz 2,39 – 2,59 log jtk/g dla grzybów strzępkowych). Podobne rezultaty otrzymano w przypadku ogólnej liczby bakterii tlenowych i ogólnej liczby bakterii fermentacji mlekowej, z wyjątkiem wariantu, w którym zastosowano szczep *L. plantarum* MLK 304. W wariantach z wykorzystaniem *L. buchneri* MYK 220, *P. acidopropionici* PCM 2434, mieszanki trzech badanych szczepów oraz preparatu handlowego, odnotowano ogólną liczbę bakterii na poziomie 8,11 – 8,55 log jtk/g, natomiast ogólna liczba bakterii kwasu mlekowego wyniosła 8,24 – 8,74 log jtk/g. W kisonce zaprawionej *L. plantarum* MLK 304 odnotowano niższą (o jeden rząd wielkości) ilość bakterii tlenowych oraz bakterii fermentacji mlekowej, która wynosiła kolejno 7,86 i 7,85 log jtk/g. Warto podkreślić, iż najlepszymi parametrami mikrobiologicznymi, pod względem ogólnej liczby bakterii i grzybów, cechowała się kisonka z lucerny inokulowana bakteriami *L. plantarum* MLK 304, przy czym biorąc pod uwagę ogólną liczbę bakterii fermentacji mlekowej, kisonka z tego wariantu wypadła

najstąbiej. Największą liczbę bakterii kwasu mlekowego, odnotowano natomiast dla kiszonki inokulowanej bakteriami *L. buchneri* MYK 220. Należy jednak podkreślić, iż różnice parametrów mikrobiologicznych pomiędzy poszczególnymi wariantami są niewielkie (w większości przypadków ilość poszczególnych grup mikroorganizmów oscylowała w tym samym rzędzie wielkości), stąd też można stwierdzić, że wszystkie wykorzystane warianty cechowała podobna skuteczność. W przygotowanych kiszoncek z lucerny nie stwierdzono obecności bakterii *Salmonella* sp. – brak charakterystycznych kolonii na podłożu BSA.

W przypadku posiewów w kierunku ogólnej liczby grzybów strzępkowych, uważnie przeanalizowano jaki rodzaj grzybów występował w poszczególnych kiszoncek. Wyróżnione na podłożu agarowym grzybnie poddano ocenie makroskopowej, zwracając szczególną uwagę na barwę oraz strukturę grzybni. We wszystkich wariantach stwierdzono obecność grzybów strzępkowych z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* czy *Alternaria*, nie odnotowano natomiast obecności grzybów z rodzaju *Fusarium*.

W przygotowanych kiszoncek odnotowano niewielkie ilości mykotoksyn fuzaryjnych. Zearalenon obecny był tylko w kiszoncek przygotowanych z dodatkiem preparatu handlowego oraz mieszaniny bakteryjnej, gdzie stężenie toksyny wyniosło kolejno 0,85 i 2,53 ng/g. W przypadku deoksyniwalenolu jego obecność stwierdzono w kiszoncek przygotowanej z dodatkiem *P. acidopropionici* PCM2434 (0,36 ng/g) oraz w kiszoncek z dodatkiem mieszaniny bakterii (0,8 ng/g). Ilości toksyn nie były jednak istotne statystycznie. Można wnioskować, że wybrane izolaty bakterii fermentacji mlekowej są zdolne do ograniczania występowania mykotoksyn fuzaryjnych w kiszoncek paszowych.

W literaturze naukowej można znaleźć wiele opracowań związanych z wpływem różnego rodzaju preparatów bakteryjnych na poprawę jakości kiszoncek paszowych. Określenie czystości mikrobiologicznej kiszoncek jest jednym z podstawowych parametrów, które są oznaczane w zakiszczonych materiałach, zwłaszcza ogólna liczba drożdży i grzybów strzępkowych. Przykładowo, w pracy Zielińska i in. (2015), określona została czystość mikrobiologiczna kiszoncek z lucerny, inokulowanej trzema szczepami bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Autorki zaobserwowały, iż najmniejszą liczbą drożdży charakteryzowała się kiszoncek zaprawiana *L. plantarum* K KKP 593p (0,95 log jtk/g), natomiast najmniej grzybów strzępkowych znajdowało się w kiszoncek zaprawionej *L. buchneri* KKP 907p (0,86 log jtk/g). Wspomniane wcześniej szczepy bakteryjne z rodzaju *Lactobacillus* i jeden szczep *L. brevis* KKP 839, wykorzystano również w preparacie bakteryjno-mineralno-witaminowym do poprawy jakości sianokiszoncek w gospodarstwach ekologicznych (Zielińska,

Fabiszewska, Stecka i Wróbel, 2013). W badaniach zostało wykazane, że liczba grzybów pleśniowych oscylowała w zakresie od 1,78 do 3,30 log jtk/g sianokiszonki, w zależności od gospodarstwa, z którego pochodził materiał roślinny. Autorki obserwowały również zmniejszony poziom aflatoksyn, w sianokiszonkach z dodatkiem bakteryjnym, w porównaniu z próbkami kontrolnymi (niezaprawionymi preparatem bakteryjno-mineralno-witaminowym). Filya i Sucu (2010) określili liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów w kiszonkach z kukurydzy, inokulowanych bakteriami fermentacji mlekowej (*L. plantarum*, *L. buchneri*, *P. cerevisiae* i *E. faecium*) oraz bakteriami fermentacji propionowej (*P. acidopropionici*). Po 90 dniach zakiszania, kiszonki z kukurydzy cechowały się niższą niż w prezentowanej pracy, liczebnością grzybów strzępkowych (poniżej 2 log jtk/g) oraz bakterii kwasu mlekowego (5,52 – 6,27 log jtk/g). Autorzy obserwowali natomiast dość wysoką liczbę drożdży w przygotowanych kiszonkach z kukurydzy (3,48 – 5,78 log jtk/g) z wyjątkiem dwóch wariantów, w których do przygotowania kiszonki wykorzystano szczepy *L. buchneri* (liczba drożdży poniżej 2 log jtk/g). Do przygotowania kiszonek, oprócz kultur starterowych, w celu poprawy procesu zakiszania można również wykorzystać kwasy organiczne (np. kwas propionowy). Tego typu badania przeprowadzili Zhang i in. (2014), stosując do przygotowania kiszonek z owsa i wyki pospolitej szczep *L. plantarum* i kwas propionowy. Okazało się, że inokulacja materiału roślinnego zarówno kulturami bakteryjnymi i kwasem propionowym, jak i mieszanką tych dwóch czynników, skutecznie ograniczało rozwój drożdży w kiszonkach (poniżej 2 log jtk/g), jednakże, dodatek kwasu propionowego ograniczał ilość bakterii kwasu mlekowego (5,71 log jtk/g w przypadku kwasu propionowego oraz 6,72 log jtk/g w przypadku mieszanki kwasu i szczepu *L. plantarum*).

Hodowla zwierzęca stanowi jeden z najszybciej rozwijających się sektorów w gospodarce rolniczej (Dunière i in., 2013). Jak już wcześniej wspomniano, odpowiednie żywienie zwierząt, obok techniki hodowlanej i warunków sanitarnych, stanowi kluczowy czynnik wpływający na osiągnięte rezultaty hodowlane (Kukier, Kwiatek, Grenda i Goldsztejn, 2014). W przypadku przeżuwaczy, zarówno w hodowli mięsnej oraz mlecznej, w celu dostarczenia wszystkich niezbędnych składników odżywczych oraz optymalnego pokrycia zapotrzebowania pokarmowego, hodowcy stosują pasze różnego pochodzenia oraz przeznaczenia żywieniowego. Można tutaj wyróżnić przede wszystkim pasze gospodarskie, odpadki przemysłu rolno – spożywczego oraz pasze przemysłowe (Piwowar, 2013). Warto również wspomnieć, iż w przypadku przeżuwaczy stosuje się żywienie pastwiskowe,



zwłaszcza w przypadku prowadzenia hodowli tradycyjnej czy ekologicznej (Brodziak, Król i Nowaczek, 2017). Udział poszczególnych rodzajów żywności, stosowanych w hodowli, uzależniony jest przede wszystkim od potrzeb pokarmowych zwierząt, rodzaju prowadzonej hodowli oraz od pory roku i warunków geograficznych, w których znajduje się gospodarstwo (Driehuis i Oude Elferink, 2000; Piwowar, 2013; Brodziak in., 2017). W skład pierwszej grupy pasz, otrzymywanych w gospodarstwie rolnym w produkcji celowej lub jako odpadki, wchodzi między innymi kiszonki paszowe (Piwowar, 2013), które ze względu na swoje różnorodne walory odżywcze, są istotnym źródłem pożywienia przeżuwaczy, zwłaszcza w okresie zimowym (Zhou, Drouin i Lafrenière, 2016). Produkowane są głównie z trawy, kukurydzy, lucerny czy runi łąkowej, jak również, z produktów ubocznych przemysłu spożywczego (pulpa buraczana, wytloki z jabłek, zacier browarniczy) (Ashbell i Weinberg, 2006; Suterska i in., 2009; Ajila i in., 2012). Zielonki, poddane procesowi spontanicznej lub wspomaganej fermentacji, nabywają specjalnych walorów organoleptycznych i odżywczych, oraz charakteryzują się lepszą strawnością i dłuższą trwałością (Kukier i in., 2014). Dla uzyskania jak najwyższych wskaźników efektywności w hodowli bydła, udział wysokiej jakości kiszzonek powinien wnosić około 50 – 75% w dziennej dawce żywieniowej (Driehuis, 2013; Zielińska i in., 2013). Na jakość otrzymywanej kiszonki paszowej ma wpływ wiele czynników zarówno środowiskowych (gleba, zakiszany surowiec, warunki klimatyczne, mikrobiota środowiskowa) jak i technicznych (rodzaj prowadzonego gospodarstwa, sposoby nawożenia, termin zbioru surowca do zakiszania, technika procesu kiszenia) (Faligowska i Selwet, 2012; Kapturowska i in., 2012; Purwin i in., 2012; Wróbel, 2012a, 2012b; Krukier, Kwiatek, Goldsztejn i Grenda, 2015; Zhou i in., 2016). Z danych literaturowych wynika, że jednym z ważniejszych czynników wpływających na kształtowanie się jakości kiszzonek paszowych ma czystość mikrobiologiczną, a mówiąc dokładniej, rodzaj i udział poszczególnych mikroorganizmów na wszystkich etapach produkcji kiszonki (od zbioru surowca do etapu przechowywania i skarmiania) (Driehuis, Oude Elferink, 2000). Do największych zagrożeń mikrobiologicznych, wpływających zarówno na jakość i bezpieczeństwo kiszzonek paszowych, należy zaliczyć bakterie z grupy *Salmonella*, *Clostridium*, *Listeria*, *Enterobacteriaceae*, bakterie z grupy coli, drożdże i grzyby strzępkowe, jak również wszystkie toksyczne metabolity pochodzenia mikrobiologicznego (toksyny bakteryjne, mykotoksyny) (Grajewski i in., 2007; Kwiatek i Krukier, 2008; Dunière i in., 2013; Kukier i in., 2014, 2015). Niska jakość mikrobiologiczna kiszzonek paszowych może istotnie wpływać na

ich parametry jakościowe, co z kolei będzie się przekładało na stopień przyswajania paszy przez zwierzęta (zmniejszenie masy ciała zwierząt), zwiększoną śmiertelność na skutek działania mikroorganizmów chorobotwórczych i ich metabolitów, zmniejszoną odporność oraz obniżenie jakości, bezpieczeństwa i przydatności technologicznej surowców i produktów zwierzęcych (Driehuis, Oude Elferink, 2000; Kukier i in., 2014). Wszystkie wyżej wspomniane zagrożenia mogą znaczenie obniżyć osiągnięte efekty hodowlane oraz bezpośrednio wpływać na bezpieczeństwo dla zdrowia i życia konsumentów.

Pomimo, iż mikroorganizmy postrzegane są jako jeden z głównych czynników obniżających jakość pasz (w tym kiszzonek), wciąż w ustawodawstwie brakuje odpowiednich norm, ustalających limity poszczególnych grup mikroorganizmów w paszach (Dorszewski, Grabowicz, Szterk, Grajewski i Twarużek, 2013; Kukier i in., 2015). Obowiązujące wymagania skupiają się głównie na kontroli obecności pałeczek *Salmonella* spp. w paszach i ograniczają liczebność bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* w materiałach paszowych pochodzenia zwierzęcego i w surowej karmie dla zwierząt domowych (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 142/2011, 2011). Według prawa Europejskiego, cała odpowiedzialność za jakość i bezpieczeństwo pasz ponoszona jest przez przedsiębiorstwa paszowe i gospodarstwa rolne (Rozporządzenie (WE) nr 183/2005, 2005). W Polsce, do roku 2003, stosowano kryteria oceny mikrobiologicznej pasz zawarte w normie PN-R64791:1994, która została zniesiona ustawą o normalizacji w 2003. Od tej pory formalnie funkcjonuje dobrowolność stosowania norm z zakresu czystości mikrobiologicznej pasz (Kukier i in., 2015). Wprowadzane zostają jedynie pewne kryteria z zakresu odpowiedniej jakości mikrobiologicznej pasz, które opierają się na prowadzonych badaniach naukowych i sanitarnych żywności przeznaczonej dla zwierząt hodowlanych. Jako najistotniejsze wskaźniki odpowiedniej jakości mikrobiologicznej pasz uznaje się takie parametry mikrobiologiczne jak ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych, ogólna liczba grzybów, liczba bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* oraz miano *Clostridium* spp. Należy jednak pamiętać, iż są to wskaźniki higieniczne pasz, które dają możliwość oceny kiszzonek paszowych jako dobrej lub gorszej jakości mikrobiologicznej (Kukier i in., 2012; Dorszewski i in., 2013; Kukier i in., 2015). Na podstawie badań prowadzonych w Polsce w latach 2002 – 2012, związanych z zanieczyszczeniem mikrobiologicznym pasz, zostały wskazane pewne wartości graniczne, przekroczenie których, może wskazywać na obniżoną jakość higieniczną. Dla poszczególnych grup mikroorganizmów sugerowane wartości graniczne kształtują się następująco: ogólna liczba bakterii tlenowych - < 6 log jtk/g, ogólna liczba

grzybów - < 5 log jtk/g, liczba *Enterobacteriaceae* - < 2 log jtk/g, liczba *C. perfingers* - < 3 log jtk/g (Kukier i in., 2012 i 2014). W Holandii, w paszach bardzo dobrej jakości liczba zarodników grzybów nie przekracza 4 log jtk/g, natomiast w paszach złej jakości higienicznej liczba zarodników grzybów oscyluje powyżej 5,7 log jtk/g. Z kolei w Niemczech ogólna liczba bakterii i grzybów strzępkowych w paszach, uważana za naturalną, mieści się kolejno zakresie 5,7 – 7 oraz 3,7 – 4 log jtk/g (Kukier i in., 2015). Dorszewski i in. (2013), w swojej pracy przytacza również wartości referencyjne ściśle związanych z kiszonkami paszowymi (głównie z traw i kukurydzy), z których wynika, że w dobrej jakościowo kiszonce liczba drożdży i grzybów strzępkowych mieści się na poziomie 3 log jtk/g. Biorąc pod uwagę wymienione powyżej wartości można stwierdzić, iż przygotowane w niniejszej pracy kiszonki z lucerny cechowały się dobrą jakością higieniczną w zakresie liczby drożdży i grzybów strzępkowych. W przypadku ogólnej liczby bakterii tlenowych, we wszystkich wariantach przekroczona została liczebność tej grupy mikroorganizmów, co może zaniżyć finalną ocenę jakości higienicznej przygotowanych kiszonek. Jednakże, biorąc pod uwagę główne założenia niniejszej pracy, badane szczepy bakteryjne skutecznie ograniczyły wzrost grzybów strzępkowych w kiszoncek z lucerny, zwłaszcza grzybów z rodzaju *Fusarium*.

Należy podkreślić, że aby w pełni określić przydatność badanych bakterii kwasu mlekowego do produkcji kiszonek paszowych, oprócz podstawowych badań mikrobiologicznych, należałoby wykonać pełną analizę chemiczną otrzymanych kiszonek. Jednakże, w związku ze znaczeniem zanieczyszczenia mikrobiologicznego na jakość kiszonek paszowych, zwrócono uwagę tylko na ten aspekt oceny jakości kiszonek. Badanie miało na celu określenie, czy uzyskane izolaty są w stanie konkurować z dostępnymi na rynku preparatami do zakiszania. Podobny wpływ badanych bakterii fermentacji mlekowej i komercyjnego preparatu, wskazuje na duży potencjał otrzymanych izolatów w zakresie produkcji kiszonek paszowych. Należy jednak kontynuować badania w tym kierunku, w celu optymalizacji procesu zakiszania z wykorzystaniem badanych bakterii kwasu mlekowego.

## **7.5. Modelowanie właściwości fungistatycznych izolatów bakterii fermentacji mlekowej poprzez optymalizację składu podłoża**

Ostatnim etapem niniejszej rozprawy doktorskiej była optymalizacja warunków wzrostu wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej w celu próby zwiększenia ich aktywności fungistatycznej. W doświadczeniu zastosowano podłoża różniące się zarówno źródłem związków azotowych (stanowiących bazę do poszczególnych pożywek), jak również proporcją i rodzajem źródła węgla (glukoza, glicerol, octan sodu). Ponadto podjęto próbę zmniejszenia kosztów hodowli bakterii fermentacji mlekowej poprzez zastosowanie jako źródła azotu surowców odpadowych (serwatka i ekstrakt roślinny po produkcji melasy). W badaniu uwzględniono również czas hodowli jako czynnik mogący wpływać na aktywność fungistatyczną bakterii kwasu mlekowego. Jako mikroorganizmy wskaźnikowe zastosowano dwa grzyby z rodzaju *Fusarium* (*F. graminearum* i *F. culmorum*). Charakterystykę poszczególnych pożywek oraz opis przeprowadzonego doświadczenia przedstawiono w punktach 5.4.3 i 6.5 w części metodycznej.

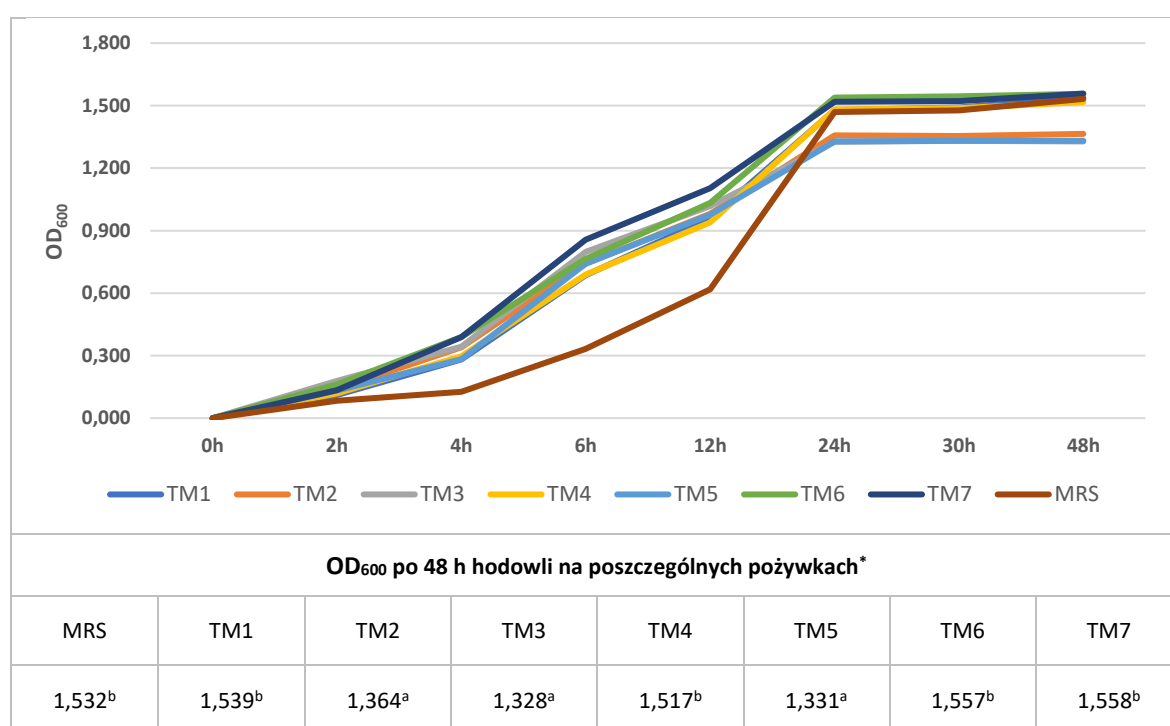
### **7.5.1. Wzrost wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej na przygotowanych podłożach**

Wzrost wybranych izolatów bakterii kwasu mlekowego na przygotowanych pożywkach oceniano na podstawie zmian gęstości optycznej przy długości fali 600 nm ( $OD_{600}$ ). Wyniki doświadczenia zaprezentowano na wykresach 10 – 24.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że szybkość i intensywność wzrostu badanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej zależała od rodzaju pożywki. Monitorując kinetykę wzrostu badanych szczepów można zauważyć większą szybkość wzrostu na pożywkach skomponowanych w niniejszej pracy w porównaniu z pożywką MRS pomiędzy 2 a 12 godziną inkubacji. Wyjątek stanowił szczep *L. buchneri* MYK 220, w przypadku którego nie obserwowano tak dużych różnic. W końcowych godzinach inkubacji (po 24 godzinach) wartość  $OD$  hodowli zależała od źródła węgla zastosowanego w podłożach.

W przypadku wzrostu *L. paracasei* JKK 009 (wykres 10 - 11), obserwowano istotne różnice w szybkości wzrostu na pożywkach skomponowanych w niniejszej pracy w stosunku do wzrostu na bulionie MRS od 2 do 12 godziny. W 24 godzinie hodowli wszystkie hodowle osiągały zbliżoną wartość absorbancji. Kolejne godziny hodowli ponownie zróżnicowały intensywność wzrostu. Najwyższe wartości  $OD$  po 48 godzinach inkubacji odnotowano

w przypadku hodowli na podłożach na bazie serwatki (od 1,579 do 1,721), zwłaszcza w wariantach z dodatkiem octanu sodu. Analizując kinetykę wzrostu *L. paracasei* JKK 009 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz ekstraktu roślinnego zauważono, że dodatek glukozy w największym stopniu wpływał na wzrost bakterii. Po 48 godzinach hodowli istotnie wyższą wartość OD odnotowano na podłożu z tryptonem i ekstraktem mięsnym z dodatkiem glukozy. Istotnie niższe wartości absorbancji w porównaniu z hodowlami w bulionie MRS obserwowano natomiast w wariantach, gdzie jako źródło węgla zastosowano wyłącznie glicerol lub octan sodu.

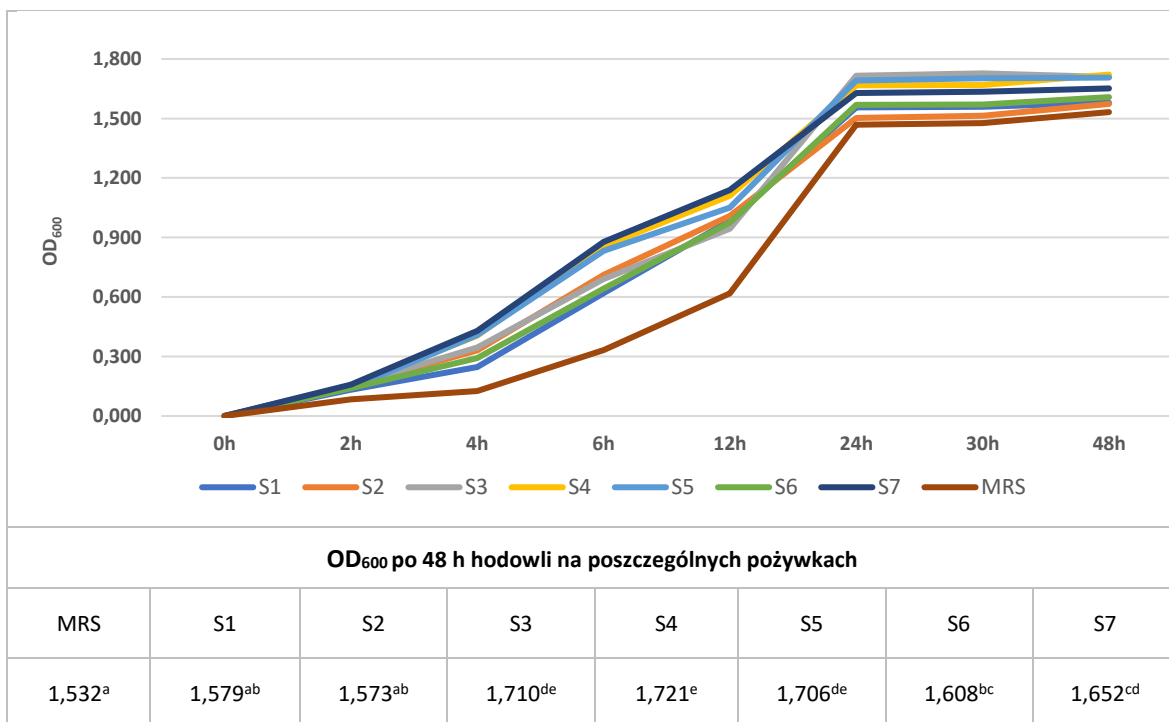


\* TM1 – glukoza, TM2 – glicerol, TM3 – octan sodu, TM4 – glukoza + octan sodu, TM5 – glicerol + octan sodu, TM6 – glukoza + glicerol, TM7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\*średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 10. Krzywa wzrostu *L. paracasei* JKK 009 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

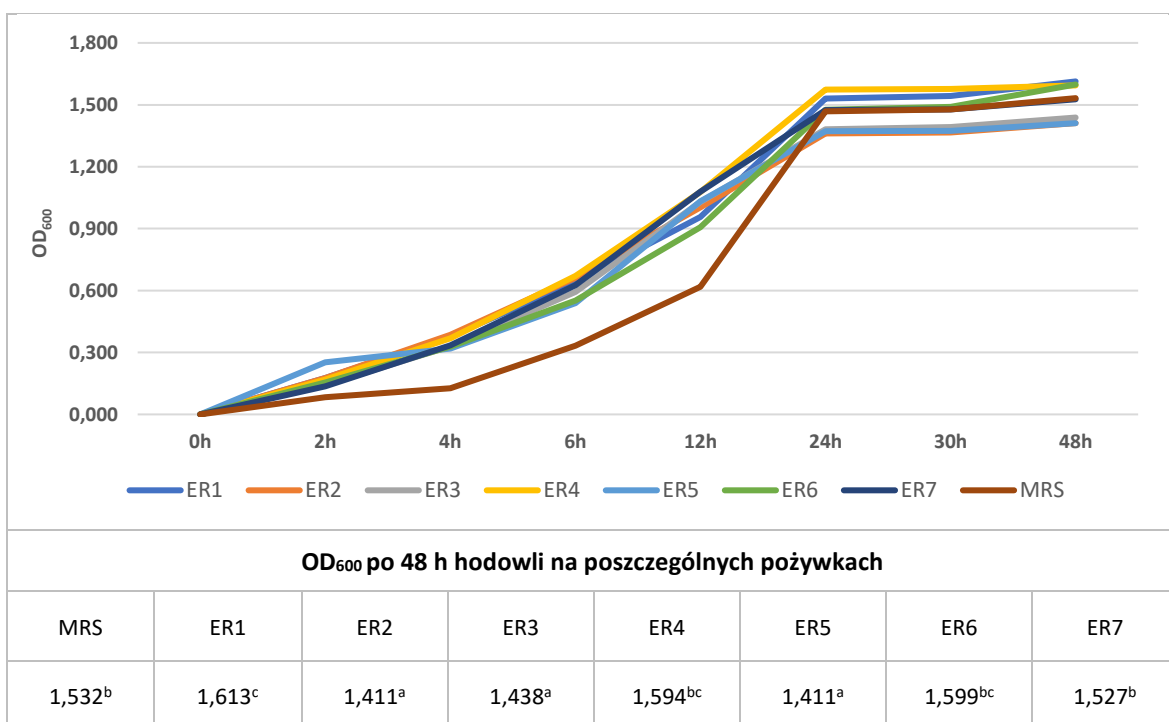


\* S1 – glukoza, S2 – glicerol, S3 – octan sodu, S4 – glukoza + octan sodu, S5 – glicerol + octan sodu, S6 – glukoza + glicerol, S7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 11. Krzywa wzrostu *L. paracasei* JKK 009 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



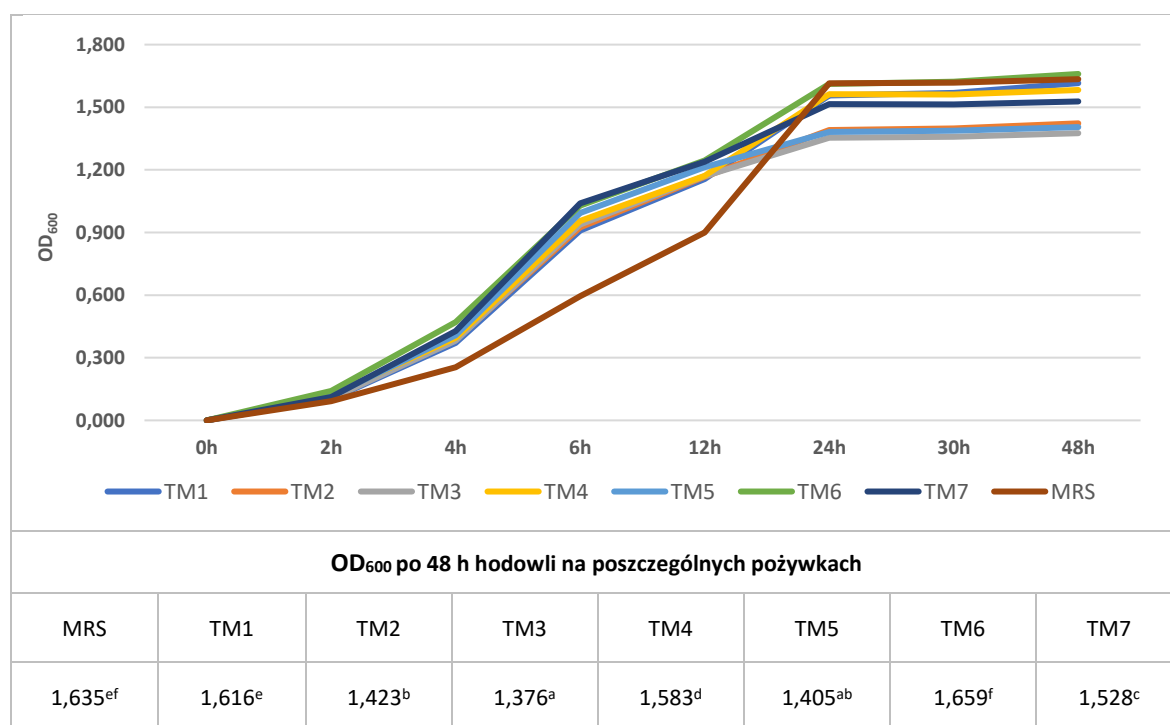
\* ER1 – glukoza, ER2 – glicerol, ER3 – octan sodu, ER4 – glukoza + octan sodu, ER5 – glicerol + octan sodu, ER6 – glukoza + glicerol, ER7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 12. Krzywa wzrostu *L. paracasei* JKK 009 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

Szczep *L. pentosus* PKK 100 wykazywał podobne tendencje wzrostowe na przygotowanych podłożach. We wszystkich wariantach pożywek skomponowanych w ramach prezentowanej pracy, do 12 godziny inkubacji, hodowle cechowała wyższa intensywność wzrostu w porównaniu do hodowli na podłożu MRS. Warto podkreślić, iż w hodowlach *L. pentosus* PKK 100 na przygotowanych pożywkach, już w 6 godzinie inkubacji wartość OD wynosiła 1,000 i była istotnie wyższa niż OD hodowli na pożywce MRS. Dodatek glukozy w największym stopniu wpływał na intensywność wzrostu szczepu *L. pentosus* PKK 100 w hodowlach prowadzonych na pożywkach na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu oraz ekstraktu roślinnego, natomiast w hodowlach na pożywkach na bazie serwatki, największy wpływ na intensywność wzrost miał dodatek octanu sodu. W 24 h wszystkie osiągały podobne wartości OD, a po 48 h jedynie w trzech wariantach pożywki serwatkowej obserwowano istotnie wyższy wzrost hodowli badanego szczepu. Na pozostałych podłożach wartość OD była porównywalna bądź niższa niż w hodowli na pożywce MRS.

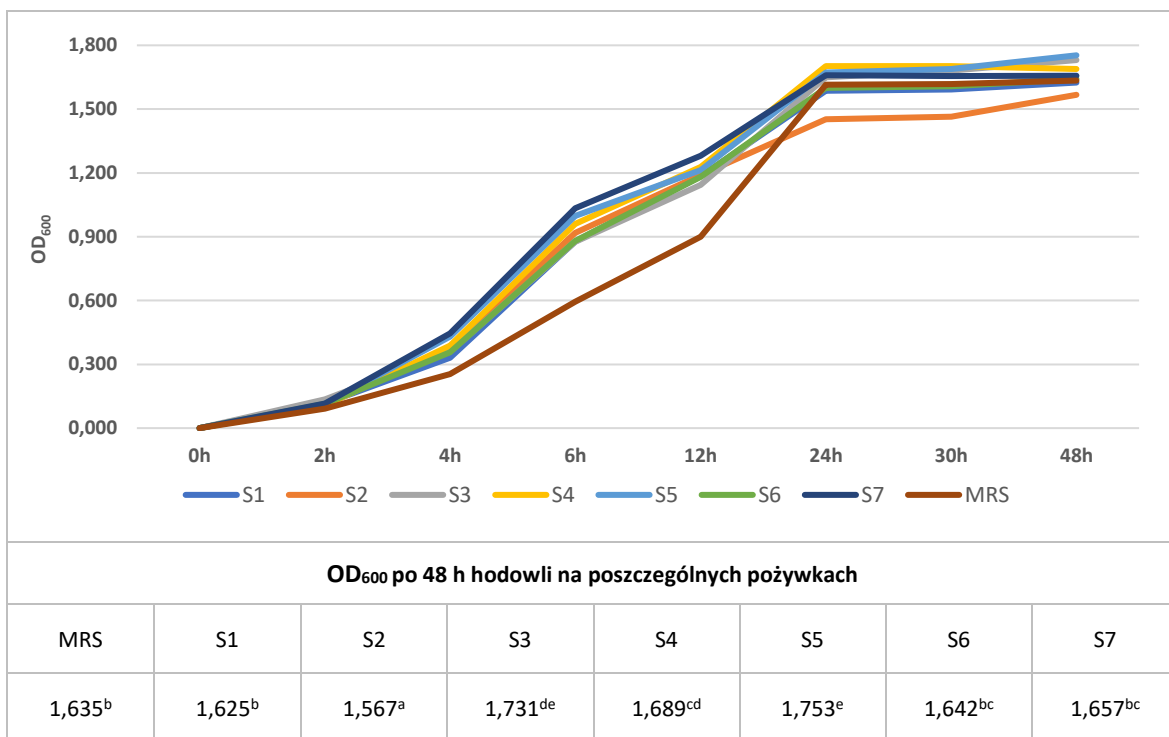


\* TM1 – glukoza, TM2 – glicerol, TM3 – octan sodu, TM4 – glukoza + octan sodu, TM5 – glicerol + octan sodu, TM6 – glukoza + glicerol, TM7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 13. Krzywa wzrostu *L. pentosus* PKK 100 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

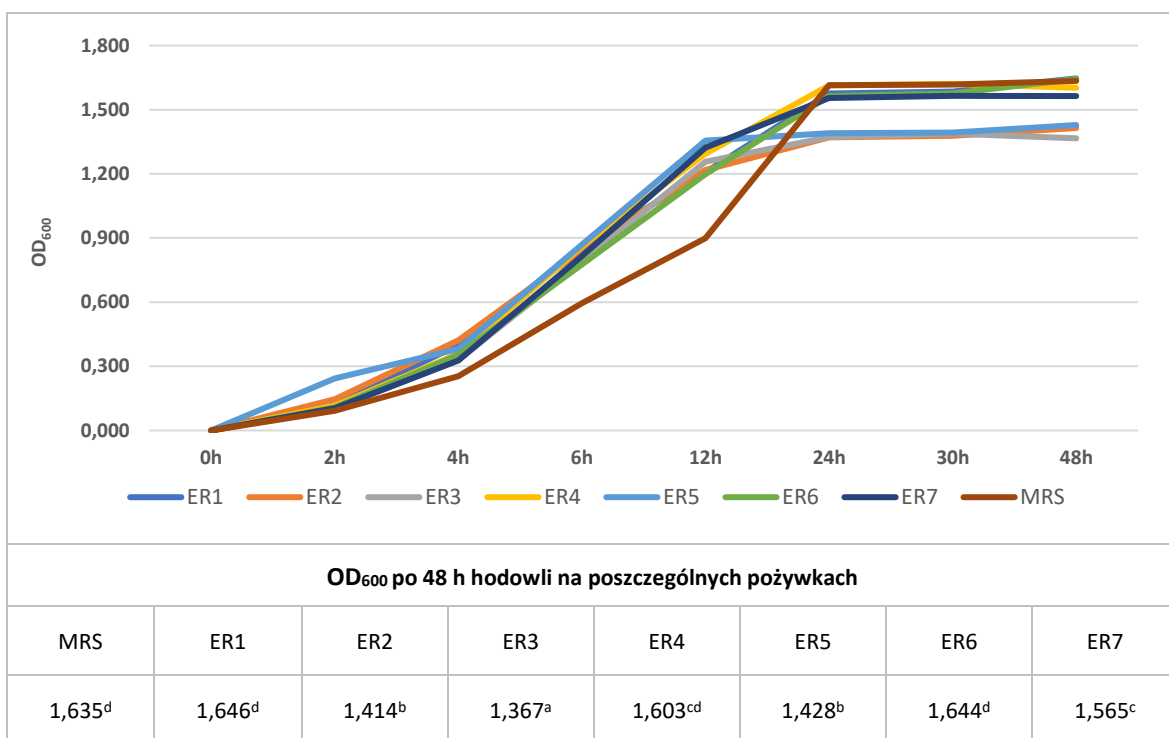


\* S1 – glukoza, S2 – glicerol, S3 – octan sodu, S4 – glukoza + octan sodu, S5 – glicerol + octan sodu, S6 – glukoza + glicerol, S7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 14. Krzywa wzrostu *L. pentosus* PKK 100 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



\* ER1 – glukoza, ER2 – glicerol, ER3 – octan sodu, ER4 – glukoza + octan sodu, ER5 – glicerol + octan sodu, ER6 – glukoza + glicerol, ER7 – glukoza + glicerol + octan sodu

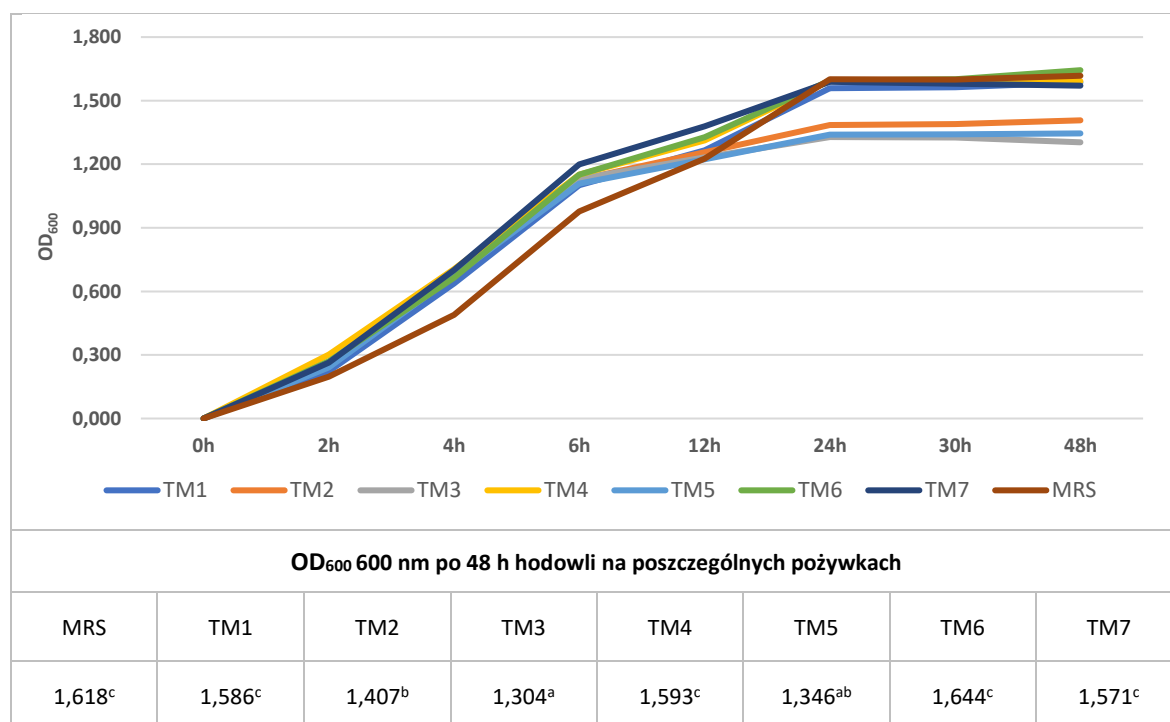
\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 15. Krzywa wzrostu *L. pentosus* PKK 100 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



W przypadku *L. plantarum* MLK 304 obserwowano szybsze tempo wzrostu w porównaniu z pozostałymi badanymi szczepami, zarówno na przygotowanych podłożach jak i podłożu MRS. Faza adaptacyjna była wyraźnie skrócona, a wzrost wartości OD był widoczny już w drugiej godzinie hodowli. W 6 godzinie inkubacji wartość OD wynosiła powyżej 1,000 (również hodowla na podłożu MRS), przy czym najwyższe wartości odnotowano dla pożywek zawierających mieszankę glukozy i octanu sodu. Najlepszym podłożem dla *L. plantarum* MK 304 okazały się pożywki na bazie serwatki, gdzie po 48 h w 6 wariantach obserwowano wyższe absorbancje w porównaniu do hodowli kontrolnej, aczkolwiek w trzech przypadkach były to różnice statystycznie istotne.). Najefektywniej na wzrost *L. plantarum* MLK 304 na pożywkach na bazie serwatki, wpłynął dodatek glicerolu i octanu sodu (wariant S5) jako źródła węgla.

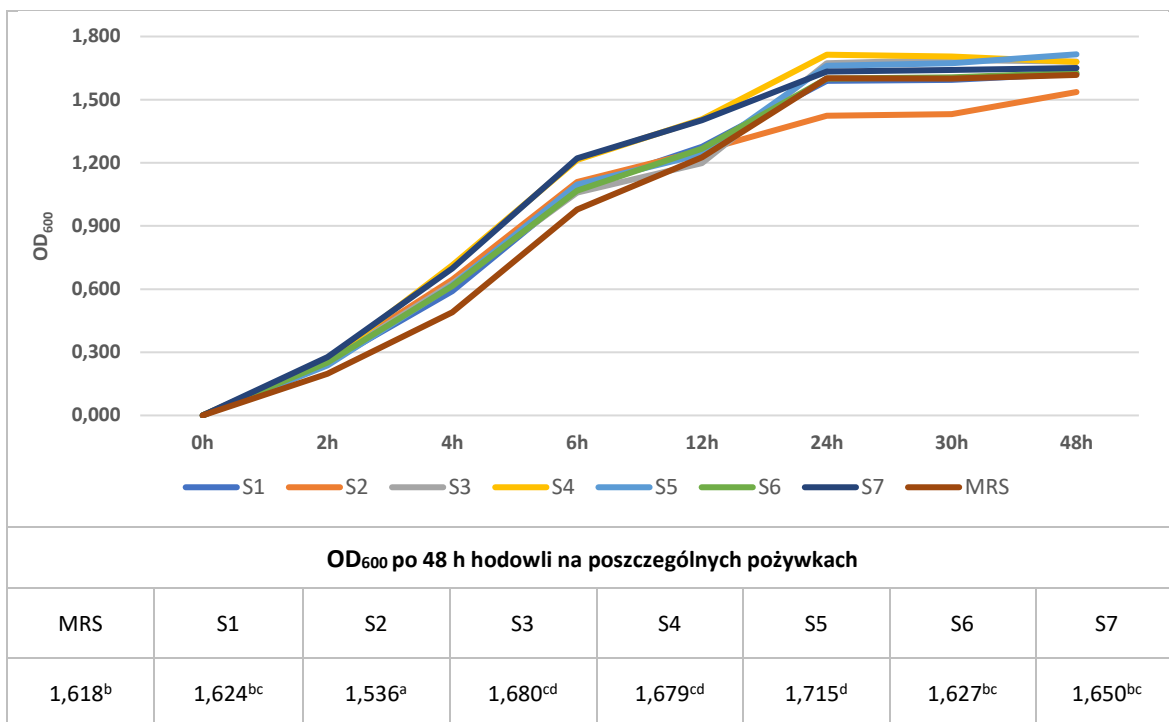


\* TM1 – glukoza, TM2 – glicerol, TM3 – octan sodu, TM4 – glukoza + octan sodu, TM5 – glicerol + octan sodu, TM6 – glukoza + glicerol, TM7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 16. Krzywa wzrostu *L. plantarum* MLK 304 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

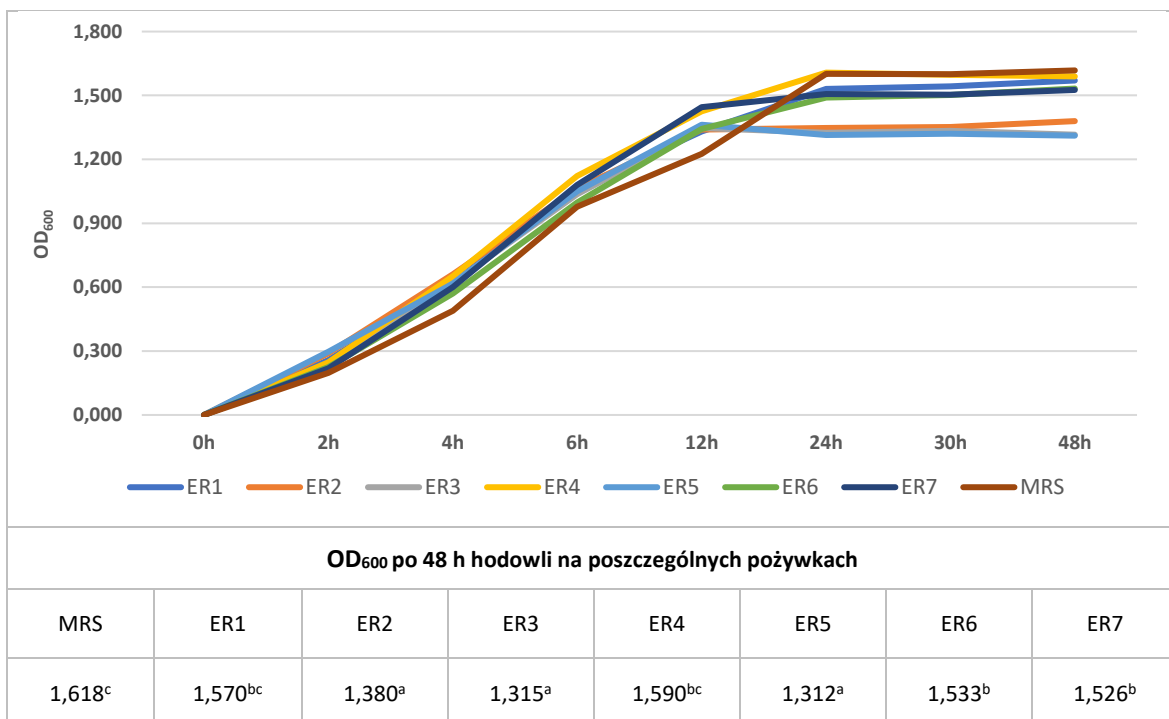


\* S1 – glukoza, S2 – glicerol, S3 – octan sodu, S4 – glukoza + octan sodu, S5 – glicerol + octan sodu, S6 – glukoza + glicerol, S7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 17. Krzywa wzrostu *L. plantarum* MLK 304 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



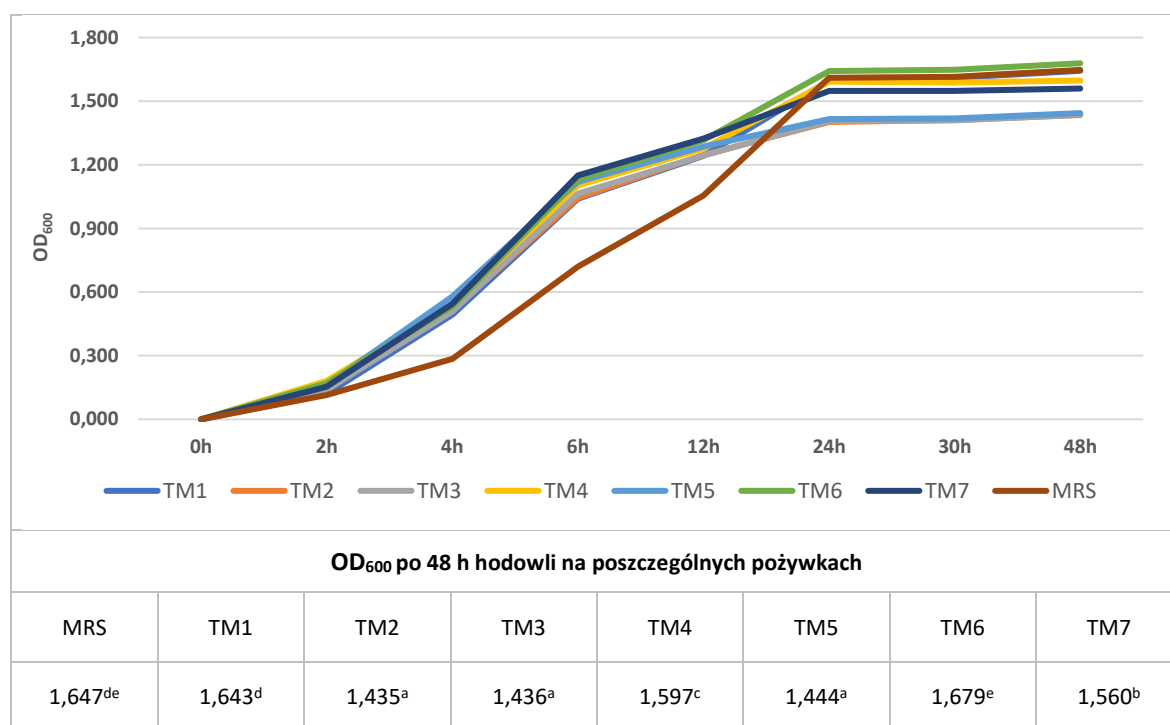
\* ER1 – glukoza, ER2 – glicerol, ER3 – octan sodu, ER4 – glukoza + octan sodu, ER5 – glicerol + octan sodu, ER6 – glukoza + glicerol, ER7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 18. Krzywa wzrostu *L. plantarum* MLK 304 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

Analizując kinetyki wzrostu *L. buchneri* MLK 324 również można zauważyć, że od 4 do 12 godziny hodowli wzrost był intensywniejszy na pożywkach skomponowanych w ramach niniejszej pracy w porównaniu z MRS. Najwyższe wartości OD obserwowano w hodowlach na podłożu na bazie serwatki, przy czym odnotowano istotne różnice pomiędzy intensywnością wzrostu na trzech wariantach pożywki zawierających octan sodu (S3, S4 i S5) a MRS. Hodowle na pozostałych pożywkach, po osiągnięciu fazy stacjonarnej przebiegały podobnie jak na pożywce MRS bądź też z istotnie mniejszą intensywnością. W przypadku hodowli na pożywkach zawierających ekstrakt roślinny można zauważyć, że szybciej osiągały fazę stacjonarną niż na pożywce MRS.

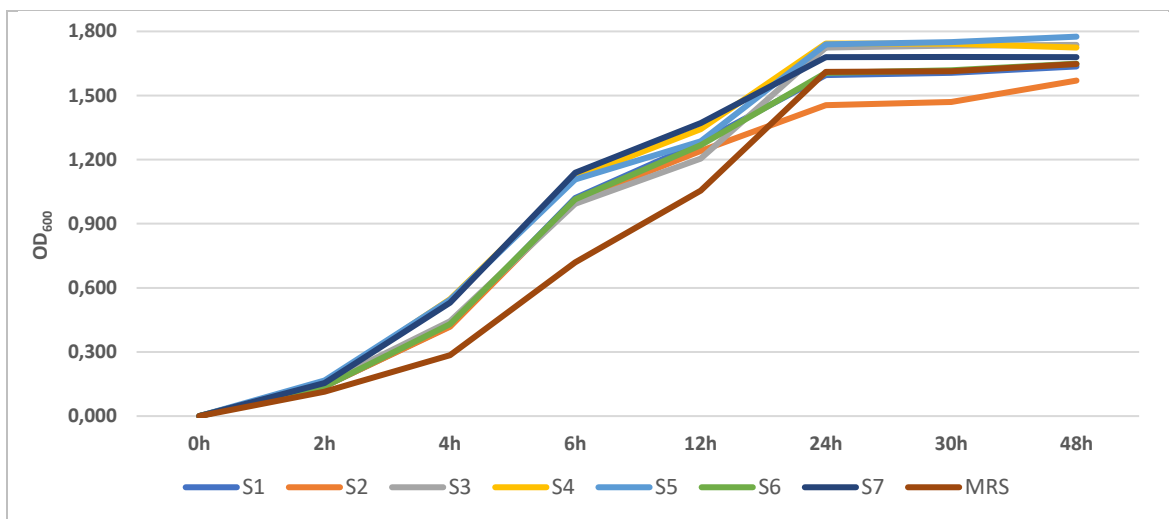


\* TM1 – glukoza, TM2 – glicerol, TM3 – octan sodu, TM4 – glukoza + octan sodu, TM5 – glicerol + octan sodu, TM6 – glukoza + glicerol, TM7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 19. Krzywa wzrostu *L. buchneri* MLK 324 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



**OD<sub>600</sub> po 48 h hodowli na poszczególnych pożywkach**

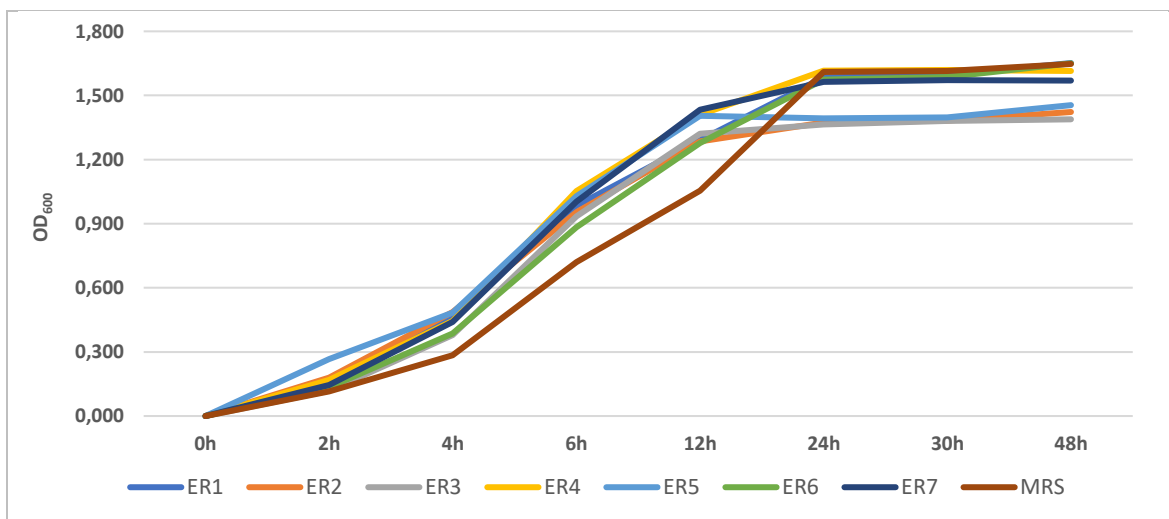
MRS	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
1,647 <sup>b</sup>	1,636 <sup>b</sup>	1,570 <sup>a</sup>	1,737 <sup>d</sup>	1,724 <sup>cd</sup>	1,775 <sup>d</sup>	1,649 <sup>b</sup>	1,680 <sup>bc</sup>

\* S1 – glukoza, S2 – glicerol, S3 – octan sodu, S4 – glukoza + octan sodu, S5 – glicerol + octan sodu, S6 – glukoza + glicerol, S7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 20. Krzywa wzrostu *L. buchneri* MLK 324 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



**OD<sub>600</sub> po 48 h hodowli na poszczególnych pożywkach**

MRS	ER1	ER2	ER3	ER4	ER5	ER6	ER7
1,647 <sup>d</sup>	1,652 <sup>d</sup>	1,423 <sup>ab</sup>	1,388 <sup>a</sup>	1,614 <sup>cd</sup>	1,455 <sup>b</sup>	1,650 <sup>d</sup>	1,570 <sup>c</sup>

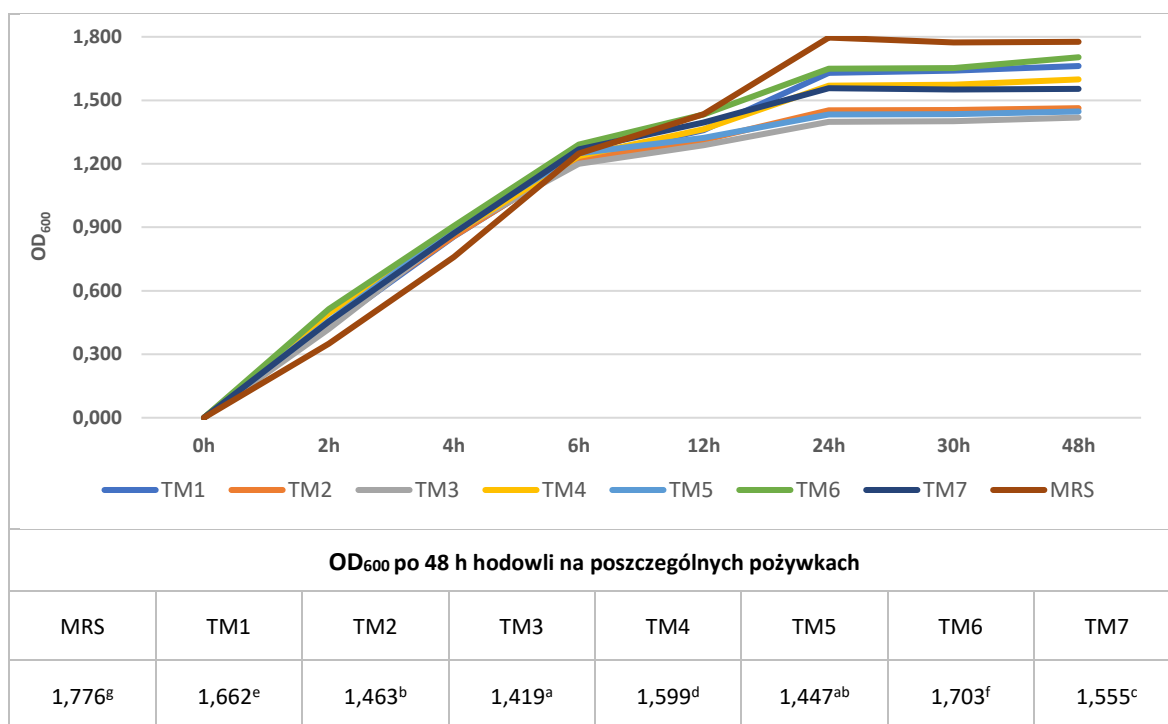
\* ER1 – glukoza, ER2 – glicerol, ER3 – octan sodu, ER4 – glukoza + octan sodu, ER5 – glicerol + octan sodu, ER6 – glukoza + glicerol, ER7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 21. Krzywa wzrostu *L. buchneri* MLK 324 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

Zastosowane pożywki w niewielkim stopniu wpływały na wzrost szczepu *L. buchneri* MYK 220. W 6 godzinie hodowli *L. buchneri* MYK 220 na wszystkich podłożach wartość OD sięgała około 1,200, jednak nie obserwowano wyraźnych różnic w intensywności wzrostu w porównaniu z pożywką MRS. Po 24 h można natomiast zauważyć istotnie niższe wartości absorbancji na przygotowanych podłożach niż w MRS. Tendencja taka utrzymywała się do 48 godziny hodowli.

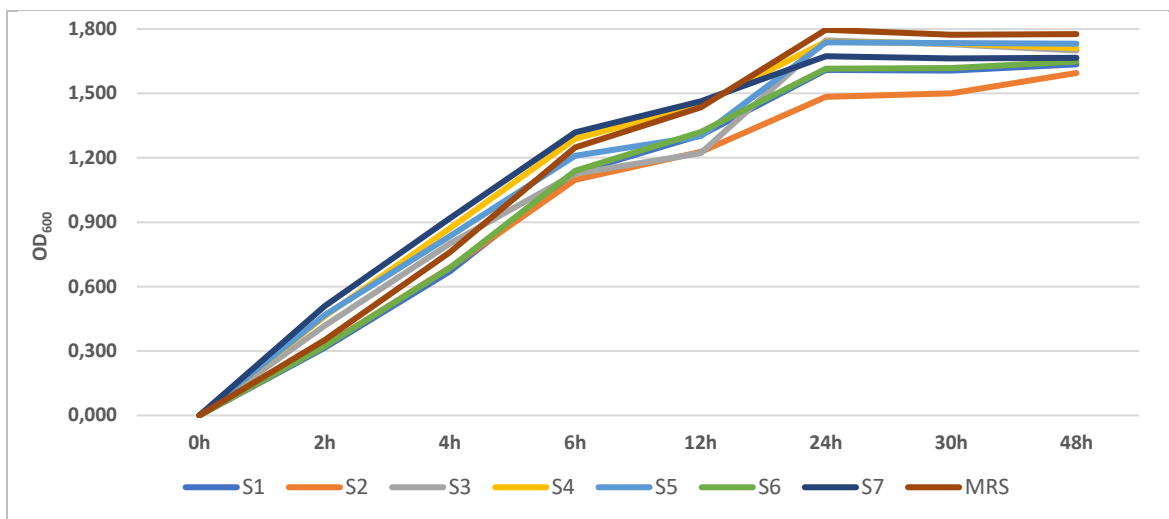


\* TM1 – glukoza, TM2 – glicerol, TM3 – octan sodu, TM4 – glukoza + octan sodu, TM5 – glicerol + octan sodu, TM6 – glukoza + glicerol, TM7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* Średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 22. Krzywa wzrostu *L. buchneri* MYK 220 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS.**

Źródło: na podstawie badań własnych



**OD<sub>600</sub> po 48 h hodowli na poszczególnych pożywkach**

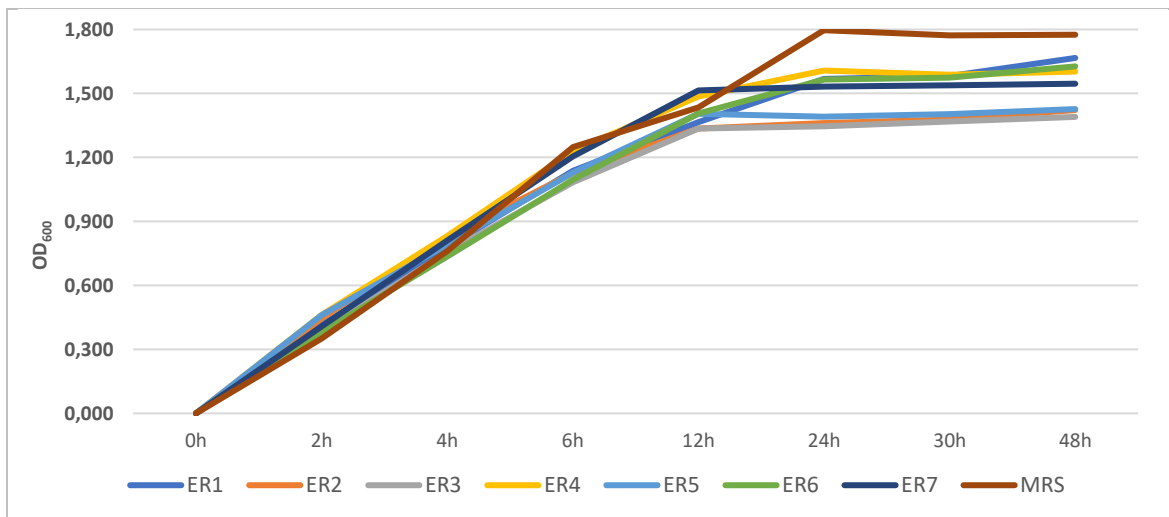
MRS	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
1,776 <sup>d</sup>	1,635 <sup>b</sup>	1,595 <sup>a</sup>	1,701 <sup>c</sup>	1,710 <sup>c</sup>	1,732 <sup>c</sup>	1,648 <sup>b</sup>	1,666 <sup>b</sup>

\* S1 – glukoza, S2 – glicerol, S3 – octan sodu, S4 – glukoza + octan sodu, S5 – glicerol+ octan sodu, S6 – glukoza + glicerol, S7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 23. Krzywa wzrostu *L. buchneri* MYK 220 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych



**OD<sub>600</sub> po 48 h hodowli na poszczególnych pożywkach**

MRS	ER1	ER2	ER3	ER4	ER5	ER6	ER7
1,776 <sup>f</sup>	1,666 <sup>e</sup>	1,422 <sup>b</sup>	1,390 <sup>a</sup>	1,603 <sup>d</sup>	1,427 <sup>b</sup>	1,627 <sup>d</sup>	1,546 <sup>c</sup>

\* ER1 – glukoza, ER2 – glicerol, ER3 – octan sodu, ER4 – glukoza + octan sodu, ER5 – glicerol + octan sodu, ER6 – glukoza + glicerol, ER7 – glukoza + glicerol + octan sodu

\* średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy  $p < 0,05$

**Wykres 24. Krzywa wzrostu *L. buchneri* MYK 220 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS**

Źródło: na podstawie badań własnych

Określenie optymalnych warunków wzrostu bakterii, w tym dobór odpowiedniego podłoża, jest bardzo istotne zwłaszcza w przypadku mikroorganizmów wykorzystywanych w różnego rodzaju procesach produkcyjnych. Uzyskanie wysokiej liczebności populacji w jak najkrótszym czasie, przy równoczesnym wykorzystaniu stosunkowo tanich surowców w podłożach, jest ważnym elementem uzyskania efektywnej i opłacalnej produkcji. Modelowanie składu podłoża w celu zwiększenia intensywności wzrostu mikroorganizmów, jest istotne przy optymalizacji kosztów hodowli, które w skali przemysłowej prowadzone są w dużych objętościach.

Obecnie w literaturze naukowej można znaleźć wiele ciekawych opracowań związanych z wpływem składu podłoża na wzrost bakterii fermentacji mlekowej. Toplaghaltcyan i in. (2017), określali w swoich badaniach wpływ różnych źródeł węgla (glukoza, glicerol, etanol, octan sodu i kwas mrówkowy) na wzrost *L. rhamnosus* R-2002, wyizolowanego z marynowanego sera. Autorzy zaobserwowali, że największą intensywność wzrostu wykazywała hodowla z dodatkiem 10 g/l glukozy oraz 10 g/l kwasu mrówkowego w porównaniu z próbą kontrolną (20 g/ml glukozy). Porównywalną intensywność wzrostu odnotowano po zastosowaniu dodatku mieszanki glukoza-glicerol, natomiast najniższy wzrost zaobserwowany został w przypadku hodowli na podłożu z dodatkiem 20 g/l octanu sodu. W niniejszej pracy również obserwowano wysoką intensywność wzrostu wyizolowanych bakterii kwasu mlekowego na podłożach na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu z dodatkiem glukozy i glicerolu i niską intensywność w przypadku dodatku octanu sodu. Natomiast w pożywce serwatkowej dodatek octanu sodu wpływał pozytywnie na wzrost badanych szczepów. Z kolei Davoodi, Behbahani, Shirani i Mohabatkar (2016), określali w swojej pracy wpływ dodatku sacharozy, glukozy, liści stewii oraz glikozydu stewiolowego na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. W swoich badaniach wykazali, że najintensywniejszy wzrost uzyskiwały hodowle rosące na podłożu z dodatkiem 10 g/l sacharozy, natomiast najniższy wzrost obserwowano w przypadku hodowli na podłożach z dodatkiem liści stewii i glikozydu stewiolowego. Autorzy wykazali również, że na wszystkich podłożach badane bakterie kwasu mlekowego (*L. plantarum*, *L. brevis* i *L. casei*) były w stanie produkować kwas mlekowy, przy czym największą ilość kwasu odnotowano w przypadku podłoży z wysoką zawartością sacharozy. Ciekawe badania z zakresu wpływu różnego rodzaju substancji na wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* przedstawili również w swojej pracy Wee, Kim, Yun i Ryu (2005). W swoich badaniach wykazali, że dodatek do podłoża związków węglowych takich jak glukoza, fruktoza, maltoza,

galaktoza, sacharoza oraz laktoza wpływały na intensywność przyrostu biomasy i produkcji kwasu mlekowego przez szczep *Lactobacillus* sp. RKY2 w porównaniu do hodowli na podłożach z dodatkiem skrobi, ksylozy czy glicerolu. Autorzy wykazali również wpływ różnych źródeł związków azotowych na wzrost *Lactobacillus* sp. RKY2, odnotowując, że surowce takie jak ekstrakt mięsny, pepton, ekstrakt drożdżowy, serwatka, mąka sojowa, napar z kukurydzy czy mąka z nasion bawełny wpływały na intensywność wzrostu i produkcji kwasu mlekowego przez badany szczep. Warto podkreślić, iż różne związki mogą wywierać zróżnicowany wpływ na wzrost bakterii fermentacji mlekowej, jak również różne szczepy mogą inaczej reagować na konkretne substancje odżywcze. Istotne jest więc dobranie odpowiednich proporcji konkretnych surowców, aby osiągać optymalny poziom wzrostu bakterii.

#### **7.5.2. Wpływ przygotowanych podłoży na aktywność fungistatyczną wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej**

Kolejnym krokiem w tym etapie badań było określenie wpływu zastosowanych pożywek na aktywność antygrzybową badanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Dodatkowo określony został wpływ czasu prowadzenia hodowli na poszczególnych podłożach na właściwości fungistatyczne badanych bakterii fermentacji mlekowej. Bakterie hodowano w temperaturze optymalnej dla danego szczepu, tj. 30°C dla *L. plantarum* MLK 304, *L. pentosus* PKK100 i *L. buchneri* MYK220 i MLK324 oraz 37°C dla *L. paracasei* JKK009. Jako mikroorganizmy wskaźnikowe wykorzystano dwa grzyby z rodzaju *Fusarium* – *F. graminearum* i *F. culmorum*. Całe doświadczenie wykonano zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 6.5.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż badane szczepy bakterii *Lactobacillus*, hodowane na przygotowanych podłożach, wykazywały właściwości fungistatyczne względem wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Silniejsze oddziaływanie antygrzybowe obserwowano w stosunku do *F. graminearum*, natomiast w przypadku *F. culmorum* odnotowano w większości przypadków jedynie zmiany morfologiczne grzybni (zmiana barwy i/lub redukcja grzybni powierzchniowej). Silniejsze oddziaływanie wykazywały hodowle bakterii fermentacji mlekowej prowadzone na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na bazie serwatki w porównaniu z hodowlami na pożywce z ekstraktem roślinnym. Wyniki doświadczenia przedstawiono w tabelach 32 - 36.



Tabela 32. Aktywność fungistatyczna szczepu *Lactobacillus paracasei* JKK009 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*

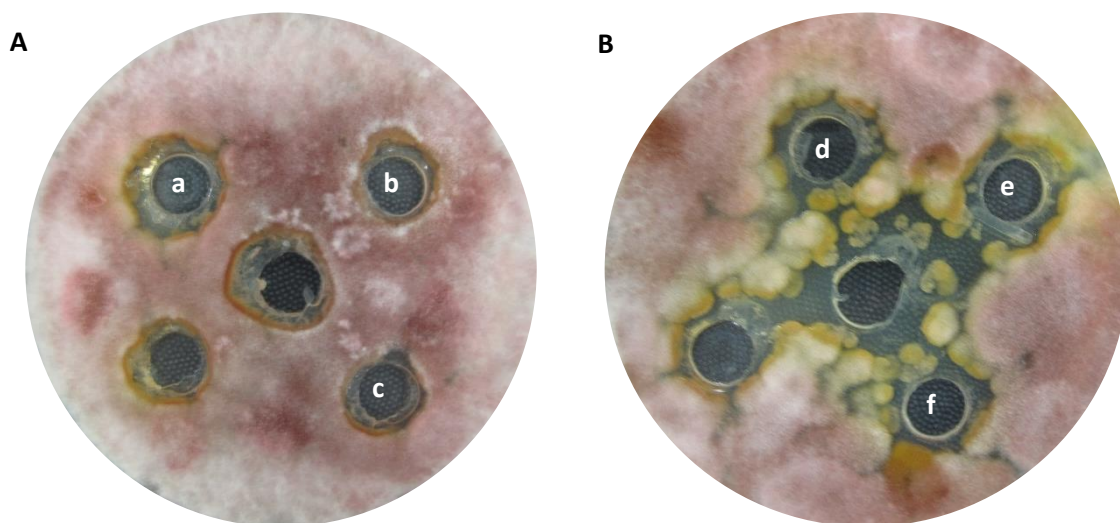
Podłoże*	Strefa zahamowania wzrostu grzybni (mm)					
	<i>Fusarium graminearum</i>			<i>Fusarium culmorum</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu</b>						
TM1	14,00 ± 1,41	+	+	+	+	+
TM2	+	+	+	+	+	+
TM3	15,00 ± 1,41	13,00 ± 0,00	12,50 ± 0,71	+	+	+
TM4	12,00 ± 0,00	+	+	+	+	+
TM5	14,50 ± 0,71	14,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	+	+	+
TM6	+	+	+	+	+	+
TM7	12,00 ± 0,00	+	+	+	+	+
<b>Hodowle na pożywce na bazie serwatki</b>						
S1	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+	+
S3	12,00 ± 0,00	+	+	12,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	+
S4	12,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	+	+	+
S5	10,50 ± 0,00	+	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+
S7	12,00 ± 0,00	+	+	+	+	+
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy</b>						
ER1	+	+	+	+	+	+
ER2	+	+	+	+	+	+
ER3	+	+	+	+	+	+
ER4	+	+	+	+	+	+
ER5	+	+	+	+	+	+
ER6	+	+	+	+	+	+
ER7	+	+	+	+	+	+

\* 1 – glukoza, 2 – glicerol, 3 – octan sodu, 4 – glukoza + octan sodu, 5 – glicerol + octan sodu, 6 – glukoza + glicerol, 7 – glukoza + glicerol + octan sodu; + - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

Z danych w tabeli 32 wynika, że szczep *L. paracasei* JKK009 wykazywał wyższą aktywność fungistatyczną wobec *F. graminearum* aniżeli wobec *F. culmorum*, przy czym największe strefy zahamowania wzrostu obserwowano w przypadku hodowli prowadzonych na pożywce z ekstraktem mięsny i tryptonem oraz na bazie serwatki. Hamowanie wzrostu *F. culmorum* obserwowano tylko w przypadku 24- i 48-godzinnej hodowli na serwatce z dodatkiem octanu sodu. W pozostałych wariantach widoczne były jedynie zmiany w morfologii grzybni węgłnej i powierzchniowej.

Hodowle *L. paracasei* JKK009 prowadzone na podłożu na bazie ekstraktu roślinnego nie hamowały wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych, obserwowano natomiast wpływ na wygląd morfologiczny badanych grzybów. Analizując wpływ źródła węgla na właściwości antygrzybowe hodowli *L. paracasei* na przygotowanych podłożach zaobserwowano, że największe znaczenia miał dodatek octanu sodu lub mieszanki octanu sodu i glicerolu. Czas prowadzenia hodowli w większości przypadków powodował spadek aktywności fungistatycznej.



Fotografia 16. Strefy zahamowania wzrostu *F. graminearum*, przez hodowle *L. paracasei* JKK009 na pożywce TM3 (A) oraz TM5 (B) w zależności od czasu prowadzenia hodowli: a i d – 24 h; b i e – 48 h;

Źródło: fotografie własne

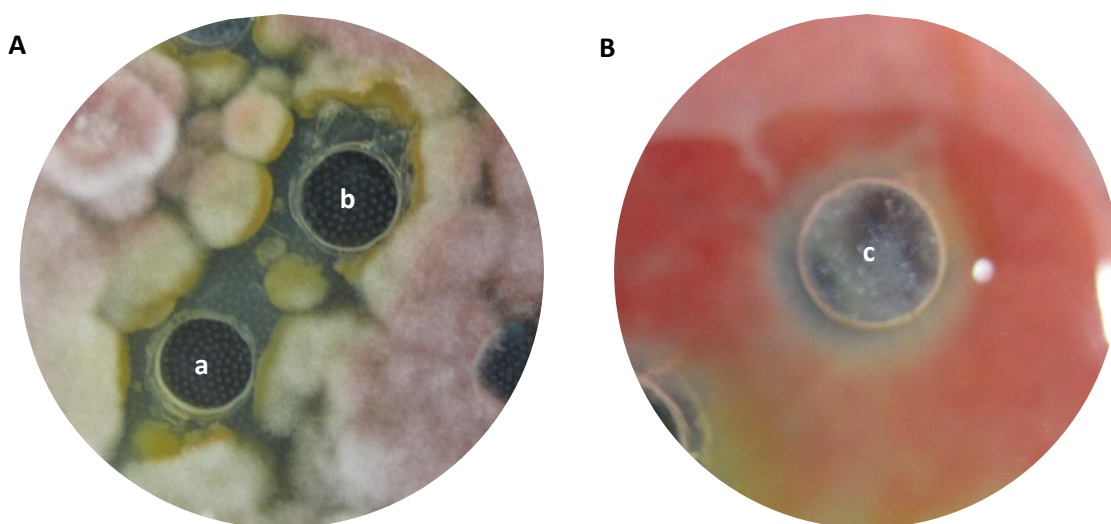
Tabela 33. Aktywność fungistatyczna szczepu *Lactobacillus pentosus* PKK100 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*

Podłoże	Strefa zahamowania wzrostu grzybni (mm)					
	<i>Fusarium graminearum</i>			<i>Fusarium culmorum</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu</b>						
TM1	12,50 ± 0,71	+	+	+	+	+
TM2	12,00 ± 0,00	+	+	+	+	+
TM3	13,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	12,50 ± 0,71	+	+	+
TM4	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	+	+	+
TM5	14,00 ± 1,41	16,00 ± 1,41	14,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	+	+
TM6	+	+	+	+	+	+
TM7	11,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	+	+	+	10,75 ± 0,35
<b>Hodowle na pożywce na bazie serwatki</b>						
S1	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+	+
S3	14,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	13,00 ± 0,00	+	11,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71
S4	12,50 ± 0,71	13,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	+	+	+
S5	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	12,50 ± 0,71	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+
S7	12,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	+	+	+
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy</b>						
ER1	+	+	+	+	+	+
ER2	+	+	+	+	+	+
ER3	+	+	+	+	+	+
ER4	+	+	+	+	+	+
ER5	+	+	10,75 ± 0,35	+	+	+
ER6	+	+	+	+	+	+
ER7	+	+	+	+	+	+

\* 1 – glukoza, 2 – glicerol, 3 – octan sodu, 4 – glukoza + octan sodu, 5 – glicerol + octan sodu, 6 – glukoza + glicerol, 7 – glukoza + glicerol + octan sodu; + - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

W przypadku hodowli *L. pentosus* PKK100 odnotowano lepsze rezultaty w zakresie hamowania wzrostu *F. graminearum* na pożywkach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na bazie serwatki w porównaniu do szczepu *L. paracasei* JKK009. Najsilniejsze oddziaływanie fungistatyczne wykazywały hodowle prowadzone na pożywce z ekstraktem mięsnym i tryptonem za wyjątkiem wariantu zawierającego glukozę i glicerol. Również hodowle prowadzone na pożywce na bazie serwatki wykazywały zdolność do hamowania wzrostu *F. graminearum*. Wyjątek stanowią hodowle na pożywce serwatkowej z dodatkiem glukozy, glicerolu oraz glukozy i glicerolu. Hodowle na podłożach z ekstraktem roślinnym wpływały wyłącznie na cechy morfologiczne *F. graminearum*, tylko w przypadku 72 godzinnej hodowli na pożywce zawierającej glicerol i octan sodu zaobserwowano słabe hamowanie wzrostu grzyba. W stosunku do *F. culmorum* hodowle *L. pentosus* PKK100, na przygotowanych podłożach, wpływały wyłącznie na cechy morfologiczne grzyba. W kilku przypadkach obserwowano strefy zahamowania wzrostu. Dotyczyło to hodowli na pożywce na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu zawierającego glukozę i glicerol oraz wariantu zawierającego glukozę, glicerol i octan sodu, a także hodowli na pożywce serwatkowej zawierającej octan sodu. Odnotowano także wpływ czasu hodowli *L. pentosus* PKK100 na ich aktywność fungistatyczną,



Fotografia 17. Strefy zahamowania wzrostu *F. graminearum* (A) oraz *F. culmorum* (B) przez hodowle *L. pentosus* PKK100 na przygotowanych podłożach: a – TM5, 24 h; b – TM5, 48 h; c – S3, 48 h

Źródło: fotografie własne

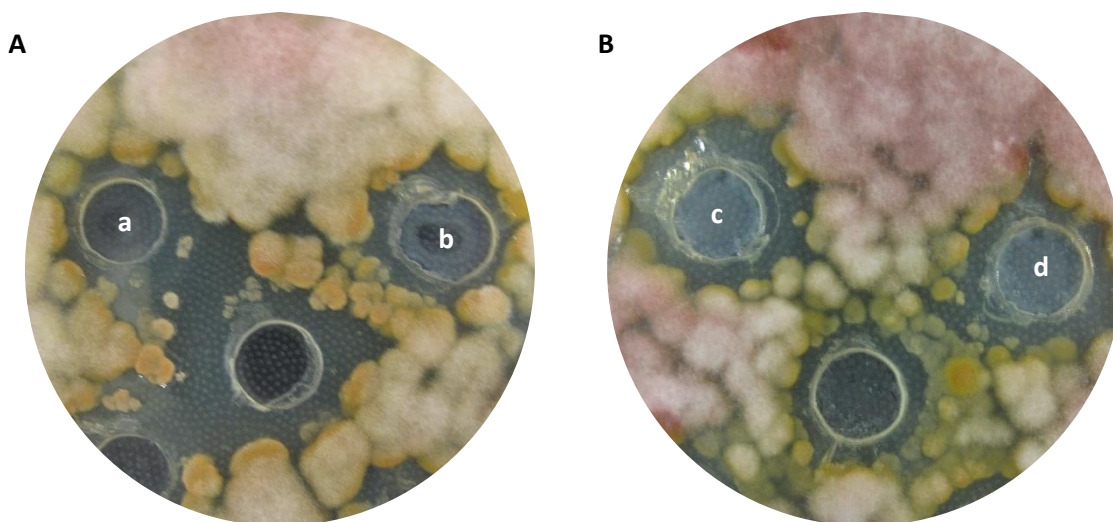
Tabela 34. Aktywność fungistatyczna szczepu *Lactobacillus plantarum* MLK304 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*

Podłoże	Strefa zahamowania wzrostu grzybni (mm)					
	<i>Fusarium graminearum</i>			<i>Fusarium culmorum</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu</b>						
TM1	+	+	+	+	+	+
TM2	13,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	+	+	+
TM3	20,00 ± 0,00	14,50 ± 0,71	14,00 ± 1,41	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
TM4	19,00 ± 1,41	18,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	10,50 ± 0,00	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
TM5	19,50 ± 0,71	15,00 ± 0,00	15,50 ± 0,71	11,50 ± 0,00	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
TM6	+	+	+	+	+	+
TM7	17,00 ± 2,83	13,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71
<b>Hodowle na pożywce na bazie serwatki</b>						
S1	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+	+
S3	16,50 ± 1,41	17,00 ± 1,41	16,00 ± 1,41	11,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71
S4	13,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	+	+	+
S5	15,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	+	+
S6	+	+	+	+	+	+
S7	12,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	+	+	+
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy</b>						
ER1	+	+	+	+	+	+
ER2	+	+	+	+	+	+
ER3	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	+	+	+
ER4	+	+	+	+	+	+
ER5	13,00 ± 1,41	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	+	+	+
ER6	+	+	+	+	+	+
ER7	+	+	+	+	+	+

\* 1 – glukoza, 2 – glicerol, 3 – octan sodu, 4 – glukoza + octan sodu, 5 – glicerol + octan sodu, 6 – glukoza + glicerol, 7 – glukoza + glicerol + octan sodu; + - zmiana barwy grzybni wglębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

Hodowle *L. plantarum* MLK304, prowadzone na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego wykazywały aktywność fungistatyczną wobec obu wykorzystanych mikroorganizmów wskaźnikowych. W przypadku *F. graminearum* strefy zahamowania wzrostu kształtowały się na poziomie 12,50 do 20,00 mm za wyjątkiem wariantów zawierających glukozę oraz glicerol i glukozę. Podobne rezultaty obserwowano w stosunku do *F. culmorum*, jednak strefy hamowania były mniejsze (10,50 – 12,50 mm) przy czym aktywności nie wykazywały również hodowle z dodatkiem glicerolu. Można było zaobserwować, iż na aktywność antygrzybową wpłynął dodatek octanu sodu i glicerolu (dla *F. graminearum*) oraz octanu sodu (dla *F. culmorum*). Dla hodowli *L. plantarum* MLK 304, prowadzonych na pożywkach na bazie serwatki, również zaobserwowano znaczący wpływ dodatku octanu sodu na aktywność fungistatyczną badanego szczepu, zarówno dodany sam jak również w mieszance z glukozą czy glicerolem. Dla hodowli na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego odnotowano strefy zahamowanego wzrostu wyłącznie dla *F. graminearum*, w przypadku pożywek zawierających octan sodu oraz octan sodu z glicerolem. We wszystkich wariantach odnotowano natomiast zmiany w barwy grzybni lub redukcję grzybni powierzchniowej obu mikroorganizmów wskaźnikowych.



Fotografia 18. Strefy zahamowania wzrostu *F. graminearum* hodowle *L. plantarum* MLK304 na podłożu TM5 (A) oraz S3 (B) w zależności od czasu prowadzenia hodowli: a i c – 48 h; b i d – 72 h

Źródło: fotografie własne

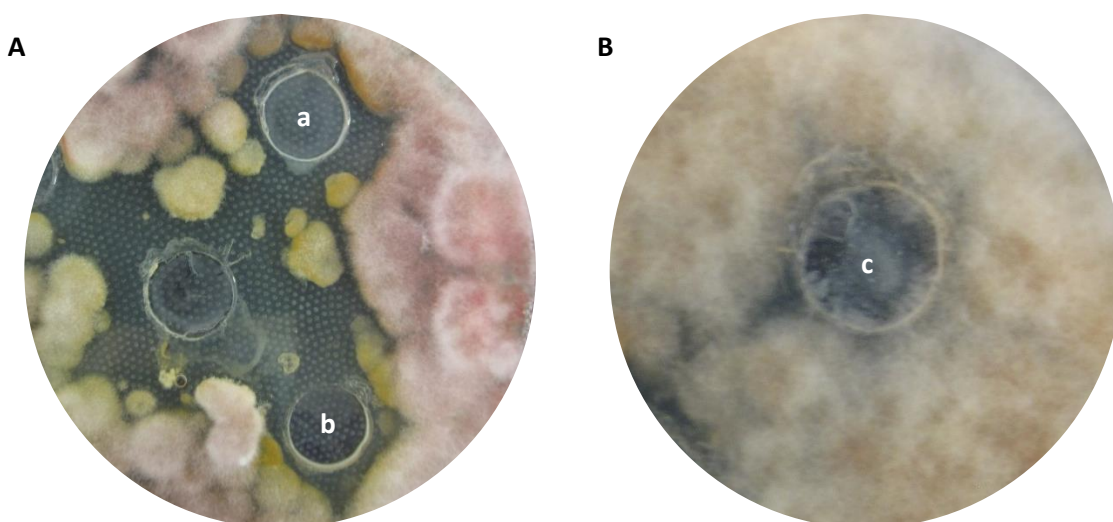
Tabela 35. Aktywność fungistatyczna szczepu *Lactobacillus buchneri* MYK220 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*

Podłoże	Strefa zahamowania wzrostu grzybni (mm)					
	<i>Fusarium graminearum</i>			<i>Fusarium culmorum</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu</b>						
TM1	+	+	+	+	+	+
TM2	14,00 ± 0,00	12,50 ± 0,71	12,00 ± 1,41	+	+	+
TM3	17,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
TM4	14,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	+	+	+
TM5	16,50 ± 0,71	16,50 ± 2,12	16,00 ± 1,41	10,50 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,50 ± 0,00
TM6	11,00 ± 0,00	10,50 ± 0,00	10,50 ± 0,00	+	+	+
TM7	14,50 ± 2,12	14,00 ± 1,41	12,50 ± 2,12	13,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00
<b>Hodowle na pożywce na bazie serwatki</b>						
S1	+	+	+	+	+	+
S2	12,00 ± 0,00	12,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00	+	+	+
S3	14,00 ± 0,00	12,50 ± 0,71	13,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71
S4	12,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	14,00 ± 0,00	+	+	+
S5	14,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71
S6	+	+	+	+	+	+
S7	12,50 ± 0,71	13,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	+	+	11,00 ± 0,00
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy</b>						
ER1	+	+	+	+	+	+
ER2	+	+	+	+	+	+
ER3	+	+	11,00 ± 0,00	+	+	+
ER4	+	+	+	+	+	+
ER5	11,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00	+	+	+
ER6	+	+	+	+	+	+
ER7	+	+	+	+	+	+

\* 1 – glukoza, 2 – glicerol, 3 – octan sodu, 4 – glukoza + octan sodu, 5 – glicerol + octan sodu, 6 – glukoza + glicerol, 7 – glukoza + glicerol + octan sodu; + - zmiana barwy grzybni wglębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

Szczep *L. buchneri* MYK 220 wykazywał wysoką aktywność fungistatyczną, względem *F. graminearum*, hodowany na podłożach na bazie serwatki oraz ekstraktu mięsnego i tryptonu. Niemal we wszystkich wariantach, za wyjątkiem pożywek zawierających glukozę, a w przypadku pożywki serwatkowej również glukozę z glicerolem, obserwowano hamowanie wzrostu *F. graminearum*. Aktywność hodowli utrzymywała się przez 72 godziny, chociaż w ostatniej dobie zwykle spadała. W przypadku hodowli prowadzonych na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego aktywność fungistatyczną wykazywały tylko warianty zawierające octan sodu sam i w połączeniu z glicerolem. Wzrost *F. culmorum* hamowany był w znacznie mniejszym stopniu przez hodowle *L. buchneri* MYK220. Hamowanie wzrostu grzyba obserwowano tylko w przypadku hodowli na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz serwatki w wariantach, w których zastosowano jako źródło węgla octan sodu i glicerol. Podobnie jak wcześniej omawiane szczepy bakterii kwasu mlekowego, hodowle *L. buchneri* MYK220 wpływały na cechy morfologiczne obu grzybów z rodzaju *Fusarium* we wszystkich zastosowanych wariantach. Widoczne były zmiany barwy grzybni (od lekko różowej do żółtej) oraz redukcja grzybni powierzchniowej.



**Fotografia 19. Strefy zahamowania wzrostu *F. graminearum* (A) oraz *F. culmorum* (B) przez hodowle *L. buchneri* MYK220 na przygotowanych podłożach: a – TM4, 24 h; b – TM4, 48 h; c – S5, 24 h**

Źródło: fotografie własne



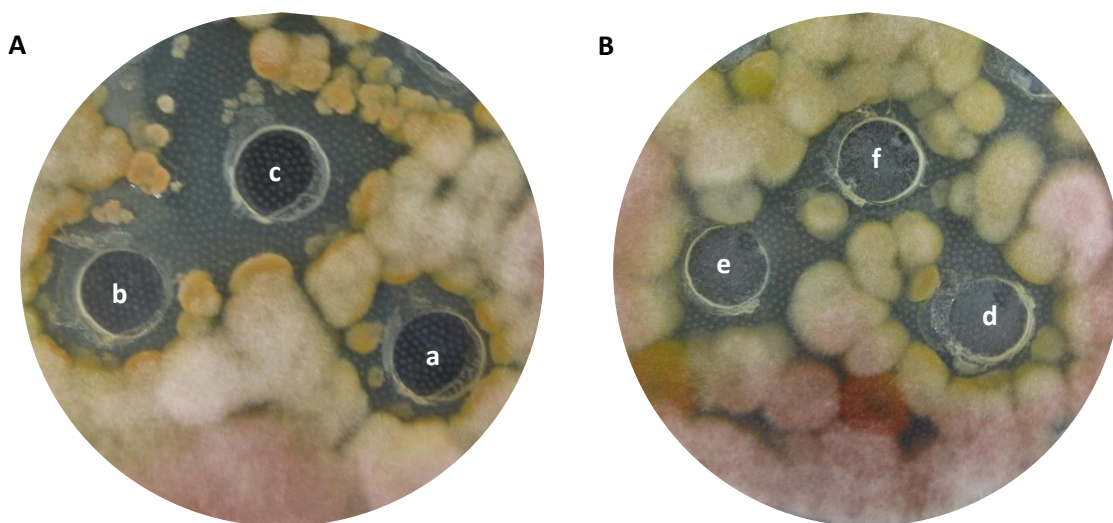
Tabela 36. Aktywność fungistatyczna szczepu *Lactobacillus buchneri* MLK324 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*

Podłoże	Strefa zahamowania wzrostu grzybni (mm)					
	<i>Fusarium graminearum</i>			<i>Fusarium culmorum</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu</b>						
TM1	+	+	+	+	+	+
TM2	11,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	+	+	+
TM3	11,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	14,00 ± 1,41	+	11,00 ± 0,00	+
TM4	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	+	+	+
TM5	15,00 ± 0,00	14,50 ± 0,71	19,00 ± 0,00	+	11,00 ± 0,00	+
TM6	+	+	+	+	+	+
TM7	+	+	+	+	+	+
<b>Hodowle na pożywce na bazie serwatki</b>						
S1	+	+	+	+	+	+
S2	11,00 ± 0,00	+	+	+	+	+
S3	14,50 ± 0,71	14,00 ± 0,00	14,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	10,50 ± 0,35	11,50 ± 0,71
S4	+	11,00 ± 0,00	+	+	+	+
S5	13,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00	13,00 ± 1,41	+	+	+
S6	+	+	+	+	+	+
S7	+	11,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	+	+	+
<b>Hodowle na pożywce na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy</b>						
ER1	+	+	+	+	+	+
ER2	+	+	+	+	+	+
ER3	+	12,00 ± 0,00	13,00 ± 0,00	+	+	+
ER4	+	+	+	+	+	+
ER5	+	10,75 ± 0,35	11,50 ± 0,71	+	+	+
ER6	+	+	+	+	+	+
ER7	+	+	+	+	+	+

\* 1 – glukoza, 2 – glicerol, 3 – octan sodu, 4 – glukoza+octan sodu, 5 – glicerol+octan sodu, 6 – glukoza+glicerol, 7 – glukoza+glicerol+octan sodu; + - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

W przypadku drugiego szczepu *L. buchneri* (MLK324), stwierdzono słabsze właściwości fungistatyczne., w porównaniu z *L. buchneri* MYK220. Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku hodowli prowadzonych na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego (cztery badane warianty) oraz serwatki (pięć wariantów), wobec *F. graminearum*. Wyjątek stanowiły hodowle na wymienionych pożywkach z dodatkiem glukozy, samej i w połączeniu z glicerolem, jak również z dodatkiem glukozy, glicerolu i octanu sodu w przypadku pożywki na bazie ekstraktu mięsnego i tryptonu. Biorąc pod uwagę hodowle prowadzone na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego, tylko pożywki z octanem sodu, osobno i z dodatkiem glicerolu, zahamowały wzrost *F. graminearum* po 48 i 72 h prowadzenia hodowli. W przypadku *F. culmorum*, tylko hodowle na pożywce z ekstraktem mięsnym i tryptonem zawierająca glicerol oraz glicerol z octanem sodu oraz na pożywce serwatkowej z octanem sodu skutecznie hamowały wzrost tego grzyba, przy czym dla hodowli na pożywce S3 obserwowano działanie we wszystkich dobach prowadzenia hodowli. Wszystkie hodowli *L. buchneri* MLK324 wpływały na cechy morfologiczne *F. graminearum* i *F. culmorum*.



**Fotografia 20. Strefy zahamowania wzrostu *F. graminearum* hodowle *L. buchneri* MLK324 na podłożu TM5 (A) oraz S5 (B) w zależności od czasu prowadzenia hodowli: a i d – 24 h; b i e – 48 h; c i f – 72 h**

Źródło: fotografie własne

Przeprowadzone w tym etapie badania pozwalają wnioskować, iż odpowiednio dobrany skład podłoża może wpłynąć na aktywność fungistatyczną bakterii fermentacji mlekowej. Warto podkreślić, iż w niektórych przypadkach obserwowano silniejsze oddziaływanie badanych bakterii wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium*, w porównaniu do oznaczonej wcześniej aktywności fungistatycznej 24-godzinnej hodowli LAB na podłożu

MRS. Dane literaturowe wskazują coraz częściej na możliwości modelowania właściwości antygrzybowych bakterii kwasu mlekowego poprzez odpowiedni dobór warunków hodowli (podłoże, temperatura, czas, pH). Przykładowo, Toplaghaltsyan i in. (2017), określili wpływ różnych źródeł węgla na aktywność fungistatyczną *L. rhamnosus* R-2002 wobec *Mucor plumbeus*, *Penicillium aurantioviolaceum* oraz *A. flavus*. Autorzy wykazali zróżnicowany wpływ poszczególnych podłoży na aktywność antagonistyczną względem wykorzystanych mikroorganizmów wskaźnikowych, przy czym najefektywniejszy okazał się dodatek kwasu mrówkowego oraz mieszanki kwasu mrówkowego i glukozy, natomiast najmniej skuteczne okazało się podłoże z dodatkiem kombinacji glukozy i etanolu (10 g :10 ml) oraz glukozy i glicerolu (10 g : 10 ml). Z kolei Rouse, Harnett, Vaughan i van Sinderen (2007) określili wpływ różnych czynników (źródło węgla, pH i temperatura) na stabilność aktywności fungistatycznej, wobec *P. notatum*, czterech szczepów bakterii kwasu mlekowego – *L. plantarum* CM8, *Weissella cibaria* R16, *W. confusa* I5 oraz *P. pentosaceus* R47. Autorzy stwierdzili, że bakterie wykazywały (zachowały) właściwości antagonistyczne względem *P. notatum*, we wszystkich zastosowanych wariantach w zakresie źródła węgla (glukoza, maltoza, sacharoza, laktoza, fruktoza i sorbitol) oraz pH pożywki (4, 5, 6, 7, 8), jednakże, w przypadku temperatury inkubacji, efektywne okazały się hodowle prowadzone w temperaturze 21, 25, 30 i 37°C. Wpływ różnych źródeł węgla na aktywność fungistatyczną bakterii fermentacji mlekowej (izolowanych z przewodu pokarmowego ludzi i materiału roślinnego), wobec m.in. *F. latenicum* 0508, oceniali w swoich badaniach Lipińska i in. (2016). Autorzy wykazali, że dodatek do podłoża mieszanki galaktozy i ksylitolu, zwiększył oddziaływanie antygrzybowe względem *F. latenicum* 0508, w porównaniu z aktywnością antagonistyczną hodowli prowadzonej na podłożu MRS.

Jako najważniejsze czynniki stymulujące aktywność fungistatyczną bakterii fermentacji mlekowej należy wymienić temperaturę i czas inkubacji, jak również skład i pH medium hodowlanego (Dalié i in., 2010; Szasland-Fattyn i Królasik, 2015). Już w połowie lat 80 – tych ubiegłego wieku, Reddy i Ranganathan (1985) zaobserwowali, że szczep *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S<sub>1</sub>-67-C największą ilość związków antygrzybowych wytwarza po 48 i 72 godzinach hodowli w temperaturze 25°C przy pH podłoża 6,8. Sathe i in. (2007) wykazali, że badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wykazywały wzrost w zakresie temperatur 10 - 45°C, pH 4,4 – 9,6 i stężeniu NaCl na poziomie 6,5%. Z kolei najwyższą aktywność fungistatyczną, dla szczepu *L. plantarum* CUK501, autorzy odnotowali prowadząc hodowle w temperaturze 30°C, pH w zakresie 4,5 – 4,8 po 36h inkubacji (późna

faza logarytmiczna), natomiast po 48 h hodowli obserwowali spadek aktywności fungistatycznej, która minimum osiągnęła po 72 h inkubacji (Sathe i in., 2007). Temperaturę 30°C jako optymalną dla osiągnięcia najwyższej aktywności fungistatycznej przez bakterie kwasu mlekowego, wskazują również inni autorzy. Przykładowo, Corsetti, Gobbetti, Rossi i Damiani (1998), optymalne stężenie różnych kwasów organicznych, produkowanych przez szczep *L. sanfrancisco* CB1 odnotowali po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C i pH w granicach 6.0. Podobnie Roy, Batish, Grover i Neelakantan (1996), najwyższą aktywność fungistatyczną szczepu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3, a Batish, Lai i Grover (1990) -szczepu *L. acidophilus* R, obserwowali w temperaturze 30°C po 48 godzinach hodowli.

Medium hodowlane również może wpływać na aktywność fungistatyczną bakterii fermentacji mlekowej. Przykładowo, podłoże Elliker's broth okazało się najlepszym medium do syntezy związków przeciwgrzybowych wobec *A. flavus* IARI, przez *L. lactis* subs. *lactis* CHD28.3, w porównaniu do podłoża MRS czy M17 (Roy i in., 1996; Daliè i in., 2010). Thakur i Roy (2009) również zaobserwowali wyższą aktywność antagonistyczną szczepu *Leuconostoc lactis* na podłożu Elliker's broth, jednakże względem bakterii patogennych, w porównaniu do hodowli prowadzonych na podłożu MRS czy TDY (ang. *tryptone dextrose yeast extract broth*). W niniejszej pracy również przedstawiono wpływ podłoża hodowlanego na aktywność fungistatyczną bakterii kwasu mlekowego, wykazując, że lepsze działanie antagonistyczne względem grzybów z rodzaju *Fusarium* osiągnięto podczas hodowli bakterii na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na bazie serwatki. W badaniach Muhiadin, Hassan i Sadon (2011b) stwierdzono z kolei, że niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego dłużej wykazują oddziaływanie antagonistyczne wobec grzybów strzępkowych na chlebie niż w pulpie pomidorowej.

Dodatek różnych składników odżywczych także może oddziaływać na aktywność biologiczną bakterii fermentacji mlekowej. Szosland-Fajtyn i Królasik (2015) oraz Daliè i in. (2010) w swoich pracach przeglądowych zwrócili uwagę, iż dodatek takich składników jak glukoza, ekstrakt drożdżowy czy chlorek wapnia lub sodu mogą powodować wzrost aktywności fungistatycznej bakterii kwasu mlekowego, natomiast ksyloza, hydrolizat kazeiny czy mieszanka proteozy i peptonu mogą wywierać odwrotny efekt. Negatywny wpływ polioli, jak ksylitol i erytrytol, na wzrost i produkcję kwasów organicznych przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, odnotowali również Klewicka i Klewicki (2009), przy czym

dodatek galaktozydopolioli już nie ograniczał w dużym stopniu wzrostu bakterii i syntezy kwasów organicznych.

Modelowanie składu podłoża można również wykorzystać do zwiększenia syntezy poszczególnych związków aktywnych przez bakterie fermentacji mlekowej. Przykładowo Magnuson i Schnürer (2001) zaobserwowali zwiększoną ilość związków peptydowych, wykazujących działania antygrzybowe, w hodowlach *L. coryniformis* Si3 po dodaniu do podłoża etanolu, kwasu octowego czy kwasu mrówkowego. Wiele opracowań związanych jest z optymalizacją składu podłoża w celu zwiększenia syntezy kwasu 3-fenylomlekowego (PLA), który charakteryzuje się wysokimi właściwościami fungistatycznymi. Li, Jinag i Pan (2007) wykazali, że dodatek kwasu fenylopirogronowego do hodowli *Lactobacillus* sp. SK007 zwiększa intensywność syntezy PLA przez ten szczep bakteryjny. Wyższe stężenie PLA, produkowanego przez *L. plantarum* ITM21B, poprzez dodatek do podłoża zwiększonej ilości fenyloalaniny oraz małych ilości tyrozyny odnotowali w swoich badaniach Valerio, Lavermicocca, Pascale, i Visconti (2004). Z kolei Vermeulen, Gänzle i Vogel (2006) wykazali, że dodatek do podłoża związków peptydowych jako substratu, zamiast pojedynczych aminokwasów, zwiększa produkcję PLA przez *L. plantarum* TMW1.468. Wpływ różnych czynników (temperatury, czasu inkubacji, składu podłoża) na produkcję kwasów organicznych i właściwości fungistatyczne bakterii kwasu mlekowego przedstawili w swoich badaniach Peyer i in. (2016). Autorzy wykazali, iż dodatek ekstraktu ze słodu jęczmiennego (6, 9 i 12%) zwiększa produkcję kwasów organicznych, w tym PLA, przez badane bakterie fermentacji mlekowej, przy inkubacji w temperaturze 30°C przez 48 godzin.

Z powyższej analizy wynika, że projektowanie podłoża do hodowli bakterii kwasu mlekowego, jak również optymalizacja warunków wzrostu, jest bardzo istotna w celu osiągnięcia najlepszych efektów w zakresie ich aktywności biologicznej. Ważny jest też, zwłaszcza z punktu widzenia ograniczenia kosztów hodowli, dobór surowca/ów tak, by był jak najtańszy lub jak najprostszy do otrzymania.

## Podsumowanie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie możliwości zastosowania wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej jako czynników ograniczających występowanie grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w łańcuchu żywnościowym. Obecność grzybów z rodzaju *Fusarium*, jak i ich toksyczne metabolity stanowią zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i pasz, a także obniżają ich jakość, co skłania do poszukiwania nowych metod ograniczenia ich występowania. Biorąc pod uwagę, iż grzyby z rodzaju *Fusarium* i ich metabolity pojawiają się już na etapie uprawy roślin, a znacząca pula plonów jest przeznaczona na pasze dla zwierząt, badania skoncentrowano na możliwości zredukowania zagrożenia grzybami i mykotoksynami na etapie produkcji rolniczej. Metody mikrobiologiczne, będące przedmiotem niniejszej pracy, wpisują się w koncepcję zrównoważonego rozwoju rolnictwa, które w celu efektywnej produkcji wysokiej jakości produktów rolnych uwzględnia ochronę środowiska naturalnego, a także ochronę zdrowia i dobrostanu zwierząt.

Zarówno dane literaturowe jak i tendencje na rynku produktów wykorzystywanych w produkcji rolniczej podkreślają zasadność podjętych badań w kierunku rozwoju preparatów opartych na czynnikach biologicznych. W niniejszej pracy badania skoncentrowano na możliwościach wykorzystania w tym zakresie bakterii fermentacji mlekowej.

Z kiszonek paszowych poddanych spontanicznej fermentacji wyizolowano łącznie 114 czystych kultur mikroorganizmów, które poddawano kolejnym etapom selekcji. Głównym kryterium selekcji izolatów bakterii fermentacji mlekowej stanowiła aktywność fungistatyczna, określana wobec czterech gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium*. Stwierdzono, że tylko nieliczne szczepy mają potencjał do dalszego zastosowania i wykazują wysoką aktywność fungistatyczną, większość natomiast wykazywała słabe oddziaływanie wobec badanych grzybów. Dodatkowymi kryteriami były: aktywność antibakteryjna badanych izolatów LAB, profil ważniejszych kwasów organicznych, a także wrażliwość badanych izolatów bakterii na wybrane antybiotyki jako czynnik warunkujący ich bezpieczne zastosowanie. Stanowiły one element charakterystyki badanych mikroorganizmów, a zarazem dodatkową zaletę badanych izolatów, istotną z punktu widzenia potencjalnej komercjalizacji oraz możliwości konkurowania badanych bakterii z dostępnymi na rynku preparatami.

W oparciu o powyższe kryteria do dalszych badań wybrano 10 izolatów. Wyselekcjonowane izolaty bakterii fermentacji mlekowej poddano charakterystyce fenotypowej oraz identyfikacji genetycznej. Identyfikację przeprowadzono w oparciu o sekwencjonowanie fragmentu genu 16S RNA.

Kolejny etap polegał na określeniu zdolności wyselekcjonowanych szczepów do hamowania wzrostu grzybów strzępkowych i redukcji zawartości mykotoksyn w warunkach modelowych. Zaproponowano cztery możliwe rozwiązania, w tym wykorzystanie wyizolowanych mikroorganizmów do ograniczenia rozwoju grzybów z rodzaju *Fusarium* i wytwarzania mykotoksyn w ziarnie pszenicy poddanym inokulacji hodowlami bakterii LAB, w materiale roślinnym poddawany fermentacji oraz wiązanie i/lub degradację wybranych mykotoksyn fuzaryjnych w warunkach *in vitro*, jak również w symulowanym układzie pokarmowym.

Jednym z możliwych zakładanych zastosowań wyizolowanych bakterii było wykorzystanie jako alternatywy dla chemicznych środków stosowanych w ochronie roślin np. jako element zaprawy nasion. Dlatego też przeprowadzono doświadczenia z inokulacją zainfekowanego grzybami ziarna pszenicy z użyciem hodowli bakterii fermentacji mlekowej, w którym wykazano, że wybrane szczepy bakterii hamują wzrost grzybów z rodzaju *Fusarium*, mogą też ograniczać wytwarzanie przez nie mykotoksyn – zearalenonu i trichotecenów z grupy B. Jest to jednak zależne od szczepu bakterii, gatunku grzyba i toksyny. Zwrócono jednak uwagę, że w niektórych przypadkach ilość toksyn może się zwiększyć, co potwierdza zasadność przeprowadzonych badań i konieczność dokładnego analizowania szczepów bakterii przeznaczonych do zastosowania w biologicznej ochronie roślin.

Mając na uwadze, iż zanieczyszczony grzybami i mykotoksynami materiał roślinny często trafia do pasz bądź jest wykorzystywany do produkcji kiszonek, zaproponowano wykorzystanie wyselekcjonowanych szczepów jako czynników adsorbujących mykotoksyny oraz ograniczających występowanie grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w kiszonkach. Pięć spośród testowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przebadano następnie pod kątem ich zdolności do wiązania i/lub degradacji wybranych toksyn fuzaryjnych. Wykazano, że dwie najczęściej występujące w naszych warunkach toksyny z tej grupy, deoksyniwalenol i zearalenon, są wiązane przez większość wyselekcjonowanych szczepów, a efektywność procesu zależy od czasu inkubacji, temperatury, pH i stężenia toksyny. Tym samym pozytywnie zweryfikowano dwie pierwsze hipotezy mówiące, że materiał roślinny poddany

spontanicznej fermentacji może stanowić źródło bakterii fermentacji mlekowej, wykazujących działanie fungistatyczne i zdolność do wiązania lub degradacji mykotoksyn fuzaryjnych oraz że stopień redukcji mykotoksyn przez te bakterie w warunkach *in vitro* jest zależny od czynników środowiskowych. Na przykładzie zearalenonu i wybranego szczepu bakterii *L. plantarum* wykazano ponadto możliwość wykorzystania wybranych szczepów jako czynnika ograniczającego biodostępność mykotoksyn w przewodzie pokarmowym zwierząt monogastycznych, jak założono w hipotezie trzeciej.

Z udziałem wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przygotowano także kiszonkę paszową na bazie lucerny wykorzystując je jako kultury starterowe. Kiszonkę oceniono pod względem jakości mikrobiologicznej oraz zawartości najważniejszych mykotoksyn, deoksyniwalenolu i zearalenonu po 3 miesiącach od przygotowania, wykazując, że aktywność biologiczna wyselekcjonowanych w niniejszej pracy szczepów jest porównywalna z dostępnym na rynku preparatem do zakiszania. Rezultaty pozwoliły na weryfikację hipotezy czwartej, wskazującej, że wykorzystanie odpowiednio dobranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej do produkcji kiszonek może wpływać na ich jakość mikrobiologiczną.

W ostatnim etapie badań wykazano natomiast, że skład podłoża wpływa na wzrost i właściwości fungistatyczne badanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co jest bardzo istotne z punktu widzenia kosztów produkcji preparatów z udziałem tych bakterii, a także wskazując na możliwość modelowania ich właściwości fungistatycznych. Tym samym zweryfikowano pozytywnie hipotezę piątą.

Przeprowadzone badania wskazują na szerokie możliwości zastosowania wyselekcjonowanych w niniejszej pracy szczepów bakterii fermentacji mlekowej, zarówno jako czynników biologicznej kontroli w ochronie roślin, ale także w produkcji zwierzęcej jako składnik preparatów do zakiszania czy dodatek do pasz o charakterze adsorbenta mykotoksyn. Warto również podkreślić, że w warunkach produkcyjnych możliwe jest wykorzystanie produktów odpadowych, co z jednej strony obniża koszty produkcji biopreparatów, a z drugiej jest przyjazne dla środowiska.



## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń sformułowano następujące wnioski:

1. Próbkki kiszzonek z kukurydzy oraz sianokiszsonki stanowiły dobre źródło izolacji bakterii fermentacji mlekowej, przy czym liczebność bakterii istotnie się różniła w zależności od próbki materiału roślinnego.
2. Spośród 114 wyizolowanych bakterii, przebadanych pod kątem właściwości antagonistycznych względem grzybów z rodzaju *Fusarium*, 49,1% wykazało wysoką (zgodnie z założeniami pracy) aktywność fungistatyczną. Większość izolatów cechowała się niską lub średnią aktywnością antagonistyczną wobec wybranych grzybów, natomiast w większości przypadków obserwowano zmiany cech morfologicznych grzybów *Fusarium*, związanych ze zmianą barwy grzybni lub redukcją grzybni powierzchniowej.
3. Izolaty bakterii fermentacji mlekowej wybrane na podstawie właściwości fungistatycznych wykazywały zróżnicowane oddziaływanie w stosunku do bakterii wskaźnikowych, które zależało zarówno od izolatu jak i mikroorganizmu wskaźnikowego. W większości przypadku aktywność antybakteryjna izolatów była niska.
4. Dominującym produktem w 24-godzinnej hodowli wybranych izolatów bakterii był kwas mlekowy, stwierdzono także śladowe ilości kwasu octowego i propionowego.
5. Badane izolaty bakterii fermentacji mlekowej wykazywały podobną wrażliwość na ampicylinę, amoksycylinę, tetracyklinę, penicylinę, natomiast większe różnice obserwowano w przypadku neomycyny. Ostatecznie, z przebadanych 27 izolatów, tylko 10 wykazywało wrażliwość na wybrane antybiotyki, warunkującą ich wybór do dalszych etapów badań.
6. Identyfikacja fenotypowa i genotypowa potwierdziła przynależność 10 wybranych izolatów do grupy bakterii fermentacji mlekowej. Ze względu na ukierunkowany screening badanych izolatów, w rezultacie uzyskano grupę bakterii o niewielkim zróżnicowaniu gatunkowym, które zidentyfikowano jako *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. paracasei* oraz *L. pentosus*.
7. Wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykazywały zdolność do ograniczenia wzrostu oraz występowania mykotoksyn fuzaryjnych w zainfekowanym ziarnie pszenicy w układzie modelowym. Stopień zahamowania

wzrostu grzybów, jak również zmiany stężenia poszczególnych toksyn w ziarnie pszenicy zależały zarówno od gatunku grzyba jak i od szczepu bakterii, stosowanego do inokulacji ziarna.

8. Pięć wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wykazywało zdolność do redukcji stężenia zearalenonu i deoksyniwalenolu w warunkach *in vitro*. Stopień obniżania ilości DON i ZEA uzależniony był od rodzaju toksyny oraz warunków, w jakich prowadzono inkubację bakterii z mykotoksynami. Bakterie w większym stopniu redukowały poziom ZEA aniżeli DON, natomiast na efektywność procesu wiązania toksyn wpływały wszystkie badane czynniki tj. temperatura, pH, czas inkubacji i stężenie toksyny.
9. Szczep *L. plantarum* MLK304 wykazał zdolność do ograniczenia biodostępności ZEA w trakcie pasażu przez symulowany układ pokarmowy zwierząt monogastycznych.
10. Przygotowane kiszonki z lucerny, z wykorzystaniem bakterii *L. plantarum* MLK304, *L. buchneri* JSK021 oraz *P. acidipropionici* PCM2434, cechowały się akceptowalną jakością mikrobiologiczną. W większości prób nie odnotowano obecności ZEA i DON, a w niektórych stwierdzono śladowe ich ilości. Zastosowane bakterie wpłynęły na badaną jakość kiszonek w stopniu porównywalnym do handlowego preparatu do zakiszania materiału roślinnego, co zwiększa ich możliwości aplikacyjne.
11. Skład podłoża wpływał na wzrost i właściwości fungistatyczne badanych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Silniejsze oddziaływanie antagonistyczne wobec grzybów *Fusarium* wykazywały hodowle prowadzone na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na bazie serwatki w porównaniu z hodowlami na pożywce z ekstraktem roślinnym.

## Bibliografia

- Abrunhosa, L., Santos, L., i Venâncio, A. (2006). Degradation of ochratoxin a by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology*, 20(3), 231–242. <https://doi.org/10.1080/08905430600904369>
- Ahangarkani, F., Rouhi, S., i Azizi, I. G. (2014). A review on incidence and toxicity of fumonisins. *Toxin Reviews*, 33(3), 95–100. <https://doi.org/10.3109/15569543.2013.871563>
- Alassane-Kpembi, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F. A., Oswald, I. P., i Puel, O. (2013). New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(1), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.023>
- Albert, T. J., Dailidienė, D., Dailidė, G., Norton, J. E., Kalia, A., Richmond, T. A., Berg, D. E. (2005). Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nature Methods*, 2(12), 951–953. <https://doi.org/10.1038/nmeth805>
- Aldana, J. R., Silva, L. J. G., Pena, A., Mañes V., J., i Lino, C. M. (2014). Occurrence and risk assessment of zearalenone in flours from Portuguese and Dutch markets. *Food Control*, 45, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.023>
- Alexa, E., Dehelean, C. A., Poiana, M.-A., Radulov, I., Cimpean, A.-M., Bordean, D.-M., Pop, G. (2013). The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. *Chemistry Central Journal*, 7, 99. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-99>
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Mañes, J., i Soler, C. (2014). Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food Chemistry*, 157, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.052>
- Almeida, I., Martins, H. M., Santos, S., Costa, J. M., i Bernardo, F. (2011). Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. *Mycotoxin Research*, 27(3), 177–181. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0093-8>
- Alonso, V., Monge, M. del P., Dalcerro, A. M., Keller, K. M., Rosa, C. A. D. R., Lilia Cavaglieri, i Stella Maris Chiacchiera. (2009). Contribution of raw materials on dairy cattle feedstuff aflatoxin contamination in central Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, 31(2), 92–99.
- Amanatidou A., Smid E. J., i Gorris L. G. M. (2001). Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable-associated microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 429–438. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00682.x>
- Ammor, M. S., Belén Flórez, A., i Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Food Microbiology*, 24(6), 559–570. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.11.001>
- Ammor, M. S., i Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76(1), 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>

- Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., i Cabras, P. (2007). *In vitro* interaction between ochratoxin a and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 2043–2048. <https://doi.org/10.1021/jf062768u>
- Aoki, T., Ward T. J., Kistler H. C. i O'donnel K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium head blight cereal* Pathogens. *Japanese Society of Mycotoxicology*, 62, 91–102.
- ApSimon, J. W. (2001). Structure, synthesis, and biosynthesis of fumonisin B1 and related compounds. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 2), 245–249.
- Aunbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., i Knøchel, S. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 194, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007>
- Avis, T.J., i Bélanger, R.R. (2001). Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 956–960. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.956-960.2001>
- Avis, T.J., Gravel, V., Antoun, H., i Tweddell, R. J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1733-1740. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.02.013>
- Backhouse, D. (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1), 161–173. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0374-5>
- Bae S., Fleet G.H., i Heard G.M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 712–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x>
- Baird-Parker, A.C. (1980). Organic Acids. W Silliker, J.H. (Red.), *Microbial Ecology of Foods, Volume 1: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms* (T. 1, s. 126 – 135). New York: Academic press.
- Balconi, C., Berardo, N., Locatelli, S., Lanzanova, C., Torri, A., i Redaelli, R. (2014). Evaluation of ear rot (*Fusarium verticillioides*) resistance and fumonisin accumulation in Italian maize inbred lines. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(1), 14–26. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-11776](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-11776)
- Banaszkiewicz, T. (2003). *Chemiczne środki ochrony roślin: zagadnienia ogólne* (Olsztyn). Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.
- Barbosa, T. M., i Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 3(5), 303–311. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0167>
- Batish, V. K., Lai, R., i Grover, S. (1990). Studies on environmental and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus*. *R. Food Microbiology*, 7(3), 199–206. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(90\)90025-D](https://doi.org/10.1016/0740-0020(90)90025-D)
- Batish, V. K., Roy, U., Lail, R., i Grower, S. (1997). Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria—A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(3), 209–225. <https://doi.org/10.3109/07388559709146614>

- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., i Lebrihi, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 111 Suppl 1, S46-52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.004>
- Belguesmia, Y., Rabesona, H., Mounier, J., Pawtowsky, A., Le Blay, G., Barbier, G., Chobert, J.-M. (2014). Characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellan-xanthan beads during batch fermentation. *Food Control*, 36(1), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.028>
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, Ó., i Thormar, H. (2001). In Vitro Killing of *Candida albicans* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), 3209–3212. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3209-3212.2001>
- Bernhoft, A., Clasen, P.-E., Kristoffersen, A. B., i Torp, M. (2010). Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives i Contaminants: Part A*, 27(6), 842–852. <https://doi.org/10.1080/19440041003645761>
- Bertuzzi, T., Rastelli, S., Mulazzi, A., Donadini, G., i Pietri, A. (2011). Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control*, 22(12), 2059-2064. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.002>
- Beuchat L. R., Chmielewski R., Keswani J., Law S. E., i Frank J. F. (1999). Inactivation of aflatoxigenic *Aspergilli* by treatment with ozone. *Letters in Applied Microbiology*, 29(3), 202–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00618.x>
- Binder, E. M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1-2), 149-166. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.08.008>
- Biro, D., Juracek, M., Kacaniova, M., Simko, M., Galik, B., Michalkova, J., i Gyongyova, E. (2009). Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(2), 227–232.
- Black, B. A., Zannini, E., Curtis, J. M., i Gänzle, M. G. (2013). Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1866–1873. <https://doi.org/10.1128/AEM.03784-12>
- Blandino, G., Milazzo, I., i Fazio, D. (2008). Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20(4), 199-203. <https://doi.org/10.1080/08910600802408111>
- Boevre, M. D., Mavungu, J. D. D., Maene, P., Audenaert, K., Deforce, D., Haesaert, G., Saeger, S. D. (2012). Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. *Food Additives i Contaminants: Part A*, 29(5), 819–835. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.656707>
- Böswald, C., Engelhardt, G., Vogel, H., i Wallnöfer, P.R. (1995). Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. *Natural Toxins*, 3(3), 138–144. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030304>

- Bottalico, A. (1998). *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85–103.
- Bottalico, A., i Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 611–624. <https://doi.org/10.1023/A:1020635214971>
- Boutigny, A-L., Ward, T., Ballois, N., Iancu, G. i loos, R. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 133–148.
- Bracarense, A.-P. F. L., Luciola, J., Grenier, B., Drociunas Pacheco, G., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., i Oswald, I. P. (2012). Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *The British Journal of Nutrition*, 107(12), 1776–1786. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004946>
- Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K., i Schnürer, J. (2007). Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5547–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.02939-06>
- Brodziak, A., Król, J., i Nowaczek, A. (2017). Naturalne substancje pochodzenia roślinnego negatywnie oddziałujące na zdrowie krów oraz jakość mleka. *Żywność: nauka-technologia-jakość*, 1(110), 33-47. doi: 10.15193/zntj/2017/110/171
- Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E. K., i Furey, A. (2012). Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(10), 2983–2995. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5955-1>
- Bryła, M., Waśkiewicz, A., Podolska, G., Szymczyk, K., Jędrzejczak, R., Damaziak, K., i Sułek, A. (2016). Occurrence of 26 mycotoxins in the grain of cereals cultivated in Poland. *Toxins*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/toxins8060160>
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L., Steiner, B., Stierschneider, M., i Ruckenbauer, P. (2002). Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1), 84–91. <https://doi.org/10.1007/s001220200009>
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Burdaspal, P., Legarda, T. M., Ramos, A. J., ... i Marín, S. (2011). Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control*, 22(3-4), 490-495. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.033>
- Cao, A., Santiago, R., Ramos, A. J., Souto, X. C., Aguín, O., Malvar, R. A., i Butrón, A. (2014). Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.004>
- Castellá, G., Bragulat, M. R., i Cabañes, F. J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4707–4710. <https://doi.org/10.1021/jf981236d>

- Champeil, A., Doré, T., i Fourbet, J. F. (2004). *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. *Plant Science*, 166(6), 1389–1415. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.004>
- Champeil, A., Fourbet, J. F., Doré, T., & Rossignol, L. (2004). Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23(6), 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.011>
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., i Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636–1643. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1636>
- Chelkowski, J., Lew, H., i Pettersson, H. (1994). *Fusarium Poae* (Peck) Wollenw. — Occurrence in maize ears, nivalenol production and mycotoxin accumulation in cobs. *Mycotoxin Research*, 10(2), 116–120. <https://doi.org/10.1007/BF03192261>
- Chen Y.-S., Yanagida F., i Shinohara T. (2005). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*, 40(3), 195–200. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x>
- Chen, J., Mirocha, C. J., Xie, W., Hogge, L., i Olson, D. (1992). Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3928–3931.
- Ciegler, A., Lillehoj, E. B., Peterson, R. E., i Hall, H. H. (1966). Microbial Detoxification of Aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14(6), 934–939.
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., i Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Clements, M. J., i White, D. G. (2004). Identifying sources of resistance to aflatoxin and fumonisin contamination in corn grain. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 23(2–3), 381–396. <https://doi.org/10.1081/TXR-200027865>
- Commane, D. M., Shortt, C. T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R. M., i Rowland, I. R. (2005). Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. *Nutrition and Cancer*, 51(1), 102–109. [https://doi.org/10.1207/s15327914nc5101\\_14](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5101_14)
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., i Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., i Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le Lait*, 85(3), 193–204. <https://doi.org/10.1051/lait:2005007>
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., i Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 253–256. <https://doi.org/10.1007/s002530051285>

- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., i García, H. S. (2014). Antifungal activity of *Lactobacilli* and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology*, 173, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016>
- Cortinovis, C., Pizzo, F., Spicer, L. J., i Caloni, F. (2013). *Fusarium* mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals—A review. *Theriogenology*, 80(6), 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.018>
- Covarelli, L., Beccari, G., i Salvi, S. (2011). Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2365–2369. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.047>
- Crowley, S., Mahony, J., i Sinderen, D. van. (2013). Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiologica*, 58(4), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0209-3>
- Dacasto, M., Rolando, P., Nachtmann, C., Ceppa, L., i Nebbia, C. (1995). Zearalenone mycotoxicosis in piglets suckling sows fed contaminated grain. *Veterinary and Human Toxicology*, 37(4), 359–361.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., i Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.003>
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., i Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- Dall'Asta, C., Dall'Erta, A., Mantovani, P., Massi, A., i Galaverna, G. (2012). Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat. *World Mycotoxin Journal*, 6(1), 83–91. <https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1463>
- Dang, T. D. T., Vermeulen, A., Ragaert, P., i Devlieghere, F. (2009). A peculiar stimulatory effect of acetic and lactic acid on growth and fermentative metabolism of *Zygosaccharomyces bailii*. *Food Microbiology*, 26(3), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.002>
- Davies, J., i Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davoodi, S., Behbahani, M., Shirani, E., i Mohabatkar, H. (2016). Influence of sucrose, glucose, stevia leaf and stevioside on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 40(4), 275–279. <https://doi.org/10.1007/s40995-016-0088-6>
- De Nijs, M., Sizoo, E. A., Vermunt, A. E. M., Notermans, S. H. W., i Van Egmond, H. P. (1998). The occurrence of fumonisin B1 in maize-containing foods in the Netherlands. *Food Additives & Contaminants*, 15(4), 385–388. <https://doi.org/10.1080/02652039809374656>
- De Wolf, E. D., Madden, L. V., i Lipps, P. E. (2003). Risk assessment models for wheat fusarium head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology*, 93(4), 428–435. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.428>



- Devirgiliis, C., Zinno, P., i Perozzi, G. (2013). Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00301>
- Dhamale, K. S., Sonawane, P. D., Jaybhaye, A. S., i Chand, P. (2015). Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial activity and in vitro, in vivo studies of LAB activity on *Fusarium oxysporum* infected tomato seeds. *International Journal of Advance Research*, 3(5), 954-963.
- Dieuleveux, V., Lemarinier, S., i Gueguen, M. (1998). Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 40(3), 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00031-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00031-2)
- Dill-Macky, R., i Jones, R. K. (2000). The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 84(1), 71-76. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.1.71>
- Dogi C.A., Fochesato A., Armando R., Pribull B., Souza M.M.S., da Silva Coelho I., Cavaglieri L. (2013). Selection of lactic acid bacteria to promote an efficient silage fermentation capable of inhibiting the activity of *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1650–1660. <https://doi.org/10.1111/jam.12173>
- Doko, M. B., i Visconti, A. (1994). Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives & Contaminants*, 11(4), 433-439. <https://doi.org/10.1080/02652039409374245>
- Doohan, F. M., Brennan, J., i Cooke, B. M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 755–768. <https://doi.org/10.1023/A:1026090626994>
- Dorszewski, P., Grabowicz, M., Szterk, P., Grajewski, J. i Twarużek, M. (2013). Wpływ fermentacji na status mikrobiologiczny i mikologiczny kiszonki z lucerny. *Medycyna Weterynaryjna*, 69(10), 622 – 625.
- Doyle, M. P., Applebaum, R. S., Brackett, R. E., i Marth, E. H. (1982). Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection*, 45(10), 964–971. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.10.964>
- Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H., i Van Wikselaar P. G. (2001). Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56(4), 330–343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x>
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 16-34.
- Driehuis, F., Elferink, S., i Spoelstra, S. (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), 583–594.
- Driehuis, F., i Oude Elferink, S.J.W.H. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety. *Veterinary Quarterly*, 22(4), 212–216. [doi:10.1080/01652176.2000.9695061](https://doi.org/10.1080/01652176.2000.9695061)
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., i Thévenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006>

- Eckard, S., Wettstein, F. E., Forrer, H.-R., i Vogelgsang, S. (2011). Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins*, 3(8), 949–967. <https://doi.org/10.3390/toxins3080949>
- Edwards, S. (2011). Zearalenone risk in European wheat. *World Mycotoxin Journal*, 4(4), 433–438. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1293>
- Edwards, S. G. (2004). Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.022>
- Edwards, S. G. (2009a). Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional oats. *Food Additives i Contaminants: Part A*, 26(7), 1063–1069. <https://doi.org/10.1080/02652030902788953>
- Edwards, S. G. (2009b). Fusarium mycotoxin content of UK organic and conventional wheat. *Food Additives i Contaminants: Part A*, 26(4), 496–506. <https://doi.org/10.1080/02652030802530679>
- EFSA, 2012. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance, *EFSA Journal*, 10(6), Parma. <http://www.efsa.europa.eu> [Dostęp: 12.03.2016]
- Egmond, H.P., Jonger, M.A., 2004, Current regulation governing mycotoxin limits in food. In: Magan, N., Olsen, M. (eds), *Mycotoxins in food. Detection and control*, CRC Press, Woodhead Publishin Limited, England, 49–68
- Eklund, T. (1989). Organic acids and esters. W G. W. Gould (Red.), *Mechanisms of action of food preservation procedure* (s. 161 – 200). New York: Elsevier.
- El-Nezami, H., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. i Mykkänen, H. (2002). Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminant*, 19(7), 680–686. <https://doi.org/10.1080/02652030210134236>
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. i Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 321 – 326. doi: 10.1080/02652030210134236
- El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., i Ahokas, J. (2000). Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection*, 63(4), 549-552. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.4.549>
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., i Mykkänen, H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative á-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3545–3549. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3545-3549.2002>
- Ennahar, S., Cai, Y., i Fujita, Y. (2003). Phylogenetic Diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S Ribosomal DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 444–451. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.444-451.2003>
- Eriksen, G. S., i Pettersson, H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114(1), 205–239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.08.008>
- Faligowska, A. i Selwet, M. (2012). Jakość i stan higieniczny kiszzonek z łubinu żółtego w zależności od terminu zbioru surowca i dodatków kiszonkarskich. *Nauka Przyroda Technologie*, 6(1), 1-10

- Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W. F. O., i Wingfield, M. J. (2003). Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in africa. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 570–579. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1110>
- Fandohan, P., Zoumenou, D., Hounhouigan, D. J., Marasas, W. F. O., Wingfield, M. J., i Hell, K. (2005). Fate of aflatoxins and fumonisins during the processing of maize into food products in Benin. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.007>
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M.-H., Moal, V. L.-L., i Servin, A. L. (2005). pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008–6013. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6008-6013.2005>
- Fazekas, B., Bajmócy, E., Glávits, R., Fenyvesi, A., i Tanyi, J. (1998). Fumonisin B1 contamination of maize and experimental acute fumonisin toxicosis in pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45(1-10), 171–181. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00780.x>
- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., i Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia *BioMed Research International*, 2013, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2013/405708>
- Filya, I. (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1080–1086. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02081.x>
- Filya, I., i Sucu, E. (2010). The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass and Forage Science*, 65(4), 446-455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2010.00763.x>
- Fink-Gremmels, J., i Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3), 326–341. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.008>
- Franco, T.S., Garcia S., Hirooka E.Y., Ono Y.S., i dos Santos J.S. (2011). Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 739–748. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05074.x>
- Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N. H. H., i Simonsson, M. (2008). Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods*, 73(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.007>
- Fredlund, E., Gidlund, A., Sulyok, M., Börjesson, T., Krska, R., Olsen, M., i Lindblad, M. (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats — Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.026>

- Freese, E., Sheu, C. W., i Galliers, E. (1973). Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241(5388), 321–325. <https://doi.org/10.1038/241321a0>
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., i Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9727–9732. <https://doi.org/10.1021/jf0718906>
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. i Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1398 – 1407, doi:10.1016/j.fct.2007.10.008
- Fuchsy, E., Binder, E.M., Heidler, D., i Krskay, R. (2002). Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Additives and Contaminants*, 19(4), 379 – 386. doi:10.1080/0265203011009115 4
- Galhardo, M., Júnior, E. H. B., Soares, L. M. V., Furlani, R. P. Z., i Birgel, E. H. (1997). Poisoning by Diacetoxyscirpenol in cattle fed citrus pulp in the state of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 34(2), 90–91.
- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., i Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3479–3484. <https://doi.org/10.1021/jf060179i>
- Gerez, C. L., Torres, M. J., Font de Valdez, G., i Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>
- Ghraiiri, T., Manai M., Berjeaud J.M., i Frère J. (2004). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 621–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02347.x>
- Giassi, V., Kiritani, C., i Kupper, K. C. (2016). Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. *Microbiological Research*, 190, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.006>
- Goliński, P., Waśkiewicz, A., Wiśniewska, H., Kiecana, I., Mielniczuk, E., Gromadzka, K.,..... i Rymaniak, E. (2010). Reaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to infection with *Fusarium* spp.: mycotoxin contamination in grain and chaff. *Food Additives and Contaminants*, 27(7), 1015-1024. <https://doi.org/10.1080/19440041003702208>
- Gollop, N., Zakin V., i Weinberg Z.G. (2004). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), 662–666. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02504.x>
- Gomaa, M. N. E., Ayesh, A. M., Galil, M. M. A., i Naguib, K. (1997). Effect of high pressure ammoniation procedure on the detoxification of aflatoxins. *Mycotoxin Research*, 13(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/BF02945059>
- González-Osnaya, L., Cortés, C., Soriano, J. M., Moltó, J. C., i Manes, J. (2011). Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food Chemistry*, 124(1), 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.002>

- Gouze, M.-E., Laffitte, J., Pinton, P., Dedieux, G., Galinier, A., Thouvenot, J.-P., Galtier, P. (2007). Effect of subacute oral doses of nivalenol on immune and metabolic defence systems in mice. *Veterinary Research*, 38(4), 635–646. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007022>
- Gräfenhan, T., Schroers, H.-J., Nirenberg, H. I., i Seifert, K. A. (2011). An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology*, 68, 79–113. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.04>
- Grajewski, J., Potkański, A., Raczkowska-Werwinska, K., Twarużek, M., Miklaszewska, B., Grabowska, M., Gubała, A. i Selwet, M. (2007). Jakość higieniczna kiszonki z kukurydzy zakiszanej z dodatkiem biologicznym lub chemicznym. *Medycyna Weterynaryjna*, 63(2), 205–208
- Gromadzka, K., Górna, K., Chełkowski, J., i Waśkiewicz, A. (2016). Mycotoxins and related *Fusarium* species in preharvest maize ear rot in Poland. *Plant Soil And Environment*, 62(8), 348–354. <https://doi.org/10.17221/119/2016-PSE>
- Grzegorzczak, M., Szalewicz, A., Żarowska, B., Połomska, X., Wątorek, W., i Wojtatowicz, M. (2015). Drobnoustroje w biologicznej ochronie roślin przed chorobami grzybowymi. *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia*, 14(2), 19–42.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., Reyes-Gavilán, D. L., G, C., i Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Guo, J., Brosnan, B., Furey, A., Arendt, E., Murphy, P., i Coffey, A. (2012). Antifungal activity of *Lactobacillus* against *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Epidermophyton floccosum*. *Bioengineered*, 3(2), 104–113. <https://doi.org/10.4161/bbug.19624>
- Gutleb, A. C., Caloni, F., Giraud, F., Cortinovic, C., Pizzo, F., Hoffmann, L., Pasquali, M. (2015). Detection of multiple mycotoxin occurrences in soy animal feed by traditional mycological identification combined with molecular species identification. *Toxicology Reports*, 2, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.01.006>
- Gwiazdowska, D. (2014). *Poprawa jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i pasz poprzez mikrobiologiczną eliminację mikotoksyn fuzaryjnych*. Poznań: Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, s. 75-107, 115-158
- Gwiazdowski, R. (2016). Ocena możliwości zastosowania bakterii *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 oraz *Lactobacillus plantarum* L2 w ochronie rzepaku ozimego przed chorobami. *Rozprawy Naukowe Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego, Zeszyt 31*, 50 –68, 82.
- Gwiazdowski, R., Gwiazdowska, D., Juś, K. i Waśkiewicz, A. (2015). Ocena możliwości usuwania zearalenonu przez bakterie glebowe z rodzaju *Rhodococcus*. *Progress In Plant Protection*, 55(2): 237 – 241. doi: 10.14199/ppp-2015-040
- Gwiazdowski, R., Kluczynska, K., i Gwiazdowska, D. (2013). Fungistatic activity of lactic acid bacteria isolated from silage. *Progress in Plant Protection*, 53(3).
- Hamed, H. A., Moustafa, Y. A., i Abdel-Aziz, S. M. (2011). *In vivo* Efficacy of Lactic Acid Bacteria in Biological Control against *Fusarium oxysporum* for Protection of Tomato Plant. *Life Science Journal*, 8(4), 462–468.

- Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W. W., Zhang, B., i Jia, Y. (2015). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Italian Journal of Food Science*, 27(3), 282-289. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v270>
- Haschek, W. M., i Voss, K. A. (2013). Mycotoxins. *W Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* (3. wyd., s. 1187–1258). Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00039-X>
- Haschek, W. M., Voss, K. A., i Beasley, V. R. (2002). Selected mycotoxins affecting animal and human health. *W Handbook of Toxicologic Pathology* (s. 645–699). Academic Press.
- Haskard, C., Binnion, C. i Ahokas, J. (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 128(1), 39 – 49. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00186-1)
- Hatab, S., Yue, T. i Mohamad, O. (2012). Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 77(4), 238 – 241. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02615.x
- Hell, K., i Mutegi, C. (2011). Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 5(5), 459-466. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.009>
- Hooker, D. C., Schaafsma, A. W., i Tamburic-Ilincic, L. (2002). Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Disease*, 86(6), 611–619. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.611>
- House, J. D., Nyachoti, C. M., i Abramson, D. (2003). Deoxynivalenol removal from barley intended as swine feed through the use of an abrasive pearling procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5172–5175. <https://doi.org/10.1021/jf034244p>
- Howden, B. P., Johnson, P. D. R., Ward, P. B., Stinear, T. P., i Davies, J. K. (2006). Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3039–3047. <https://doi.org/10.1128/AAC.00422-06>
- Hu, C., i Qi, Y. (2010). Effect of compost and chemical fertilizer on soil nematode community in a Chinese maize field. *European Journal of Soil Biology*, 46(3), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.04.002>
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., i Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730-739. doi:10.1128/AEM.02105-06
- Husain, A., Hassan, Z., Huda-Faujan, N., i Mohd Nizam Lani. (2017). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from soil rhizosphere on fusarium species infected chilli seeds. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 29(1), 182–202.
- Hussain, T., Javaid, T., Parr, J. F., Jilani, G., i Haq, M. A. (1999). Rice and wheat production in Pakistan with Effective Microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, 14(1), 30–36. <https://doi.org/10.1017/S0889189300007980>
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., i Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122(2), 179–188.

- Jajić, I., Jurić, V., i Abramović, B. (2008). First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. *Food Control*, 19(6), 545-550. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.05.009>
- Janiec, W., i Krupińska, J. (2002). *Farmakodynamika : podręcznik dla studentów farmacji (V)*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie „PZWL” Sp. z o.o.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc’h, A., i Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 28(11), 1590–1609. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.595377>
- Javaid, A. (2011). Effects of Biofertilizers Combined with Different Soil Amendments on Potted Rice Plants. *Chilean journal of agricultural research*, 71(1), 157–163. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000100019>
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A., i Jalaludin, S. (1996). Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 23(2), 67–71.
- Jones, D. L. (1998). Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, 205(1), 25–44. <https://doi.org/10.1023/A:1004356007312>
- Jouany, J. P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3), 342–362. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009>
- Juan, C., Ritieni, A., i Mañes, J. (2013). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chemistry*, 141(3), 1747–1755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.061>
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele, V., i Bartkevics, V. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT*, 89, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.061>
- Jurjevic, Z., Wilson, D. M., Wilson, J. P., Geiser, D. M., Juba, J. H., Mubatanhema, W., Rains, G. C. (2005). *Fusarium* species of the Gibberella fujikuroi complex and fumonisin contamination of pearl millet and corn in Georgia, USA. *Mycopathologia*, 159(3), 401–406. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-1050-2>
- Juś, K., Gwiazdowska, i Waśkiewicz, A. (2016). Wykorzystanie bakterii glebowych z rodzaju *Brevibacillus* do dekontaminacji zearalenonu. *Studia Oeconomica Posnaniensia*, 4(6), 27–39. <https://doi.org/10.18559/SOEP.2016.6.2>
- Kabra, J.J. (1983). Medium chain fatty acids and esters. W Davidson, M.P i Branen, A.L. (Red.), *Antimicrobials in foods* (s. 109 – 140). New York: Mercel Dekker.
- Kanora, A., i Maes, D. (2009). The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Veterinarni Medicina*, 54(12), 565–576.
- Kapturowska, A. U., Zielińska, K. J., i Stecka, K. M. (2012). Ocena jakości mleka surowego w powiązaniu z jakością kiszonych pasz objętościowych w wybranych gospodarstwach ekologicznych. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, Vol. 57(nr 3), 194–197.
- Kapturowska, A. U., Zielińska, K. J., Stecka, K., i Kupryś, M. (2010). Ocena skażenia pasz ochratoksyną a i metody ich dekontaminacji. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, Vol. 55(nr 3), 156–163.

- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., i Meile, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.009>
- Kizerwetter-Swida, M., i Binek, M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 54(4), 287–294.
- Klewicka E., i Klewicki R. (2009). In vitro fermentation of galactosyl derivatives of polyols by *Lactobacillus* strains. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(1), 65–70. <https://doi.org/doi.org/10.17221/176/2008-CJFS>
- Klewicka, E., i Lipińska, L. (2016). Aktywność przeciugrzybowa bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*. *Żywność - Nauka Technologia Jakość*, 104(1), 17–31. <https://doi.org/10.15193/zntj/2016/104/098>
- Kluczyńska, K. A. (2013). Antagonistyczne oddziaływanie izolatów bakterii fermentacji mlekowej ze środowiska naturalnego wobec toksynotwórczych grzybów z rodzaju *Fusarium*. *Studia Oeconomica Posnaniensia*, 1(12/261).
- Konappa, N. M., Maria, M., Uzma, F., Krishnamurthy, S., Nayaka, S. C., Niranjana, S. R., i Chowdappa, S. (2016). Lactic acid bacteria mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt. *Scientia Horticulturae*, 207, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.029>
- Koraichi, F., Videmann, B., Mazallon, M., Benahmed, M., Prouillac, C., i Lecoœur, S. (2012). Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. *Toxicology Letters*, 211(3), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.04.001>
- Kotowicz, N. K., Frąc, M., i Lipiec, J. (2014). The importance of *Fusarium* fungi in wheat cultivation – pathogenicity and mycotoxins production: A Review. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(2), 3326–3343.
- Kpodo, K., Thrane, U., i Hald, B. (2000). *Fusaria* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *International journal of food microbiology*, 61(2-3), 147-157. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00370-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00370-6)
- Kubena, L. F., Edrington, T. S., Harvey, R. B., Buckley, S. A., Phillips, T. D., Rottinghaus, G. E., i Casper, H. H. (1997). Individual and combined effects of fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poultry Science*, 76(9), 1239–1247. <https://doi.org/10.1093/ps/76.9.1239>
- Kukier, E., Goldsztejn, M., Grenda, T., Kwiatek, K., Wasyl, D. i Hoszowski, A. (2012). Microbiological quality of compound feed used in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56(3), 349-354. doi: 10.2478/v10213-012-0061-x
- Kukier, E., Kwiatek, K., Goldsztejn, M., i Grenda, T. (2015). Mikroflora pasz. *Życie Weterynaryjne*, 90(01).
- Kukier, E., Kwiatek, K., Grenda, T., i Goldsztejn, M. (2014). Mikroflora kiszzonek. *Życie Weterynaryjne*, 89(12), 51-54
- Kumar, A., i Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486–1513. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>



- Kung, L., Taylor, C. C., Lynch, M. P., i Neylon, J. M. (2003). The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *86*(1), 336–343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73611-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X)
- Kuzdraliński, A., Solarska, E., i Muszyńska, M. (2013). Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control*, *29*(1), 22–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.003>
- Kwiatkiewicz, K. i Kukier, E. (2008). Zanieczyszczenia mikrobiologiczne pasz. *Medycyna Weterynaryjna*, *64*(1), 24 – 26
- Labuda, R., Parich, A., Berthiller, F., i Tancinová, D. (2005b). Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.005>
- Labuda, R., Parich, A., Vekiru, E., i Tancinová, D. (2005a). Incidence of fumonisins, moniliformin and *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, *12*(1), 81–86.
- Lafta, H., Jarallah, E. M., i Darwash, A. (2014). Antibacterial activity of fermented camel milk using two lactic acid bacteria. *Journal of University of Babylon*, *22*(9), 2382–2377.
- Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegård, M., i Smith, D. L. (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry*, *111*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.03.015>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., i Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 4084–4090. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090.2000>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., i Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 634–640. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.634-640.2003>
- Lazzaro, I., Falavigna, C., Dall’Asta, C., Proctor, R. H., Galaverna, G., i Battilani, P. (2012). Fumonisin B, A and C profile and masking in *Fusarium verticillioides* strains on fumonisin-inducing and maize-based media. *International Journal of Food Microbiology*, *159*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.013>
- Ledzion, E., Postupolski, J., Rybińska, K., Krupińska – Jaworska, J., Szczęśna, M., Karłowski, K. (2010). System RASFF jako element strategii bezpieczeństwa żywności w zakresie mikotoksyn, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, *43*(4), 533–538
- Leite, A. M. O., Miguel, M. a. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B., i Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, *98*(6), 3622–3632. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9265>
- Lemmens, M., Steiner, B., Sulyok, M., Nicholson, P., Mesterhazy, A., i Buerstmayr, H. (2016). Masked mycotoxins: does breeding for enhanced *Fusarium* head blight resistance result in more deoxynivalenol-

- 3-glucoside in new wheat varieties? *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 741–754.  
<https://doi.org/10.3920/WMJ2015.2029>
- Lew, H., Adler, A., i Edinger, W. (1991). Moniliformin and the european corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Mycotoxin Research*, 7(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/BF03192189>
- Li, X., Jiang, B., i Pan, B. (2007). Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 29(4), 593–597.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-006-9275-4>
- Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., i Ariff, A. B. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33–37.
- Lillehoj, E.B., Ciegler, A. i Hall, H.H. (1997). Aflatoxin B1 uptake by *Favobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *Journal of Bacteriology*, 93(1), 464 – 471
- Lind, H., Jonsson, H., i Schnürer, J. (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 157–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.020>
- Lindblad, M., Börjesson, T., Hietaniemi, V., i Elen, O. (2012). Statistical analysis of agronomical factors and weather conditions influencing deoxynivalenol levels in oats in Scandinavia. *Food Additives i Contaminants: Part A*, 29(10), 1566–1571. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.647335>
- Lipińska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., Sójka, M., i Nowak, A. (2016). Antifungal activity of *Lactobacillus* sp. bacteria in the presence of xylitol and galactosyl-xylitol *BioMed Research International*, 2016, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/5897486>
- Liu, D. L., Yao, D. S., Liang, R., Ma, L., Cheng, W. Q., i Gu, L. Q. (1998). Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 36(7), 563–574.
- Liu, D.-L., Yao, D.-S., Liang, Y.-Q., Zhou, T.-H., Song, Y.-P., Zhao, L., i Ma, L. (2001). Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 461–466. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00161-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00161-7)
- Liu, Y., Chang, C.-C. H., Marsh, G. M., i Wu, F. (2012). Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 48(14), 2125–2136. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.009>
- Liu, Y., i Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 818–824. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901388>
- Łukanowski, A., i Sadowski, C., (2002). Occurrence of *Fusarium* on grain and heads of winter wheat cultivate in organic, integrated, conventional systems and monoculture. *Journal of Applied Genetics*, 43, 73.
- Madhavan, H.N., i Sowmiya, M. (2011). Mechanisms of development of antibiotic resistance in bacteria among clinical specimens. *Journal of Clinical and Biomedical Science*, 1(2), 42–48.
- Magan, N., i Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1), 131–139.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034>

- Magnusson, J. (2003). *Antifungal activity of lactic acid bacteria* (Doctor's dissertation). Department of Microbiology. Swedish University of Agricultural Science.
- Magnusson, J., i Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 1–5. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.1-5.2001>
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., i Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 129–135 [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)
- Mankevičienė, A., Butkutė, B., Dabkevičius, Z., i Supronienė, S. (2007). *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian cereals from the 2004-2005 harvests. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14(1), 103-107
- Manova, R., i Mladenova, R. (2009). Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. *Food control*, 20(4), 362-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.06.001>
- Marasas, W. F. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 2), 239–243.
- Marchwińska, K. (2016). *Projektowanie dodatków paszowych z wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej* (Praca doktorska). Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Poznań.
- Marciňáková, M., Simonová, M., Stropfová, V., i Lauková, A. (2005). Occurrence of structural enterocin genes among silage enterococci. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 49(4), 387–39.
- Marroquín-Cardona, A. G., Johnson, N. M., Phillips, T. D., i Hayes, A. W. (2014). Mycotoxins in a changing global environment--a review. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 69, 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.025>
- Martinis, E. C. P. D., Públio, M. R. P., Santarosa, P. R., i Freitas, F. Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 32–37. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100008>
- Martins, M. L., i Martins, H. M. (2001). Determination of deoxynivalenol in wheat-based breakfast cereals marketed in Portugal. *Journal of food protection*, 64(11), 1848-1850. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.11.1848>
- Mathur, S., i Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Mazur, E. (2002). Principles for rational use of antibiotics. *Medycyna Rodzinna*, (2), 89–92.
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., i Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802–814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., i Van Sanford, D. (2012). A Unified Effort to Fight an Enemy of Wheat and Barley: *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease*, 96(12), 1712–1728. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE>
- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A. I., i Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control*, 97, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.006>

- Mendes, G. da R. L., Reis, T. A. dos, Corrêa, B., Badiale-Furlong, E. (2015). Mycobiota and occurrence of Fumonisin B1 in wheat harvested in Southern Brazil. *Ciência Rural*, 45(6), 1050–1057. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140005>
- Méndez-Albores, A., Del Río-García, J. C., i Moreno-Martínez, E. (2007). Decontamination of aflatoxin duckling feed with aqueous citric acid treatment. *Animal Feed Science and Technology*, 135(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.07.009>
- Miller, J. D. (2008). Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives i Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure i Risk Assessment*, 25(2), 219–230. <https://doi.org/10.1080/02652030701744520>
- Mohammadi, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Kachuei, R., Gholami-Shabani, M., i Razzaghi-Abyaneh, M. (2016). *Giberella fujikuroi* species complex isolated from maize and wheat in Iran: distribution, molecular identification and fumonisin B1 in vitro biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1333–1340. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7227>
- Mokoena, M.P., Chelule, P.K. i Gqaleni, N. (2005). Reduction of fumonisin B1 and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2095 – 2099. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2095>
- Moretti, A.N. (2009). Taxonomy of Fusarium genus: A continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke*, 2009(117), 7–13. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN0917007M>
- Moselhy, M. A., Borba, J. P., i Borba, A. E. S. (2015). Improving the nutritive value, in vitro digestibility and aerobic stability of *Hedychium gardnerianum* silage through application of additives at ensiling time. *Animal Feed Science and Technology*, 206, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.05.001>
- Mu, W., Yang, Y., Jia, J., Zhang, T., i Jiang, B. (2010). Production of 4-hydroxyphenyllactic acid by *Lactobacillus sp.* SK007 fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 369–371. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.005>
- Muhalidin, B.J., Hassan, Z., i Sadon S.K. (2011a). Antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasi* D5 on selected foods. *Journal of Food Science*, 76(7), M493–M499. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x>
- Muhalidin, B.J., Hassan, Z., i Sadon, S.K. (2011b). Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi. *Annals. Food Science and Technology*, 12, 45–57.
- Müller, C. E. (2009). Influence of harvest date of primary growth on microbial flora of grass herbage and haylage, and on fermentation and aerobic stability of haylage conserved in laboratory silos. *Grass and Forage Science*, 64(3), 328–338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2009.00695.x>
- Munkvold, G. P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 99-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.0955.10>
- Nagaraja, H., Chennappa, G., Rakesh, S., Naik, M. K., Amaresh, Y. S., i Sreenivasa, M. Y. (2016). Antifungal activity of *Azotobacter nigricans* against trichothecene-producing *Fusarium species* associated with cereals. *Food Science and Biotechnology*, 25(4), 1197–1204. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0190-8>

- Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S., i Thonart, P. (2011). Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* Genus isolated from food. *Journal of Food Science*, 76(6), M305–M311. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02257.x>
- Neme, K., i Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78, 412-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
- Nguyen, P. A., Strub, C., Fontana, A., i Schorr-Galindo, S. (2017). Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*, 104, 10-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.004>
- Ni, K., Minh, T.T., Tu, T.T.M., Tsuruta, T., Pang, H., i Nishino, N. (2017). Comparative microbiota assessment of wilted Italian ryegrass, whole crop corn, and wilted alfalfa silage using denaturing gradient gel electrophoresis and next-generation sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1385–1394. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7900-2>
- Ni, K., Wang, Y., Cai, Y., i Pang, H. (2015). Natural lactic acid bacteria population and silage fermentation of whole-crop wheat, natural lactic acid bacteria population and silage fermentation of whole-crop wheat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(8), 1123–1132. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0955>
- Niderkorn, V., Boudra, H., i Morgavi, D. P. (2006). Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 849–856. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x>
- O'Brien, M., Egan, D., O'kiely, P., Forristal, P. D., Doohan, F. M., i Fuller, H. T. (2008). Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycological Research*, 112(8), 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.023>
- Obst, A., Lepschy-von Gleissenthal, J., i Beck, R. (1997). On the etiology of *Fusarium* head blight of wheat in south Germany-Preceding crops, weather conditions for inoculum production and head infection, proneness of the crop to infection and mycotoxin production. *Cereal Research Communications*, 25(2), 699-703. <http://www.jstor.org/stable/23786850> [Dostęp: 25.07.2017]
- Oguntoyinbo, F. A., i Narbad, A. (2015). Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented cereal foods. *Journal of Functional Foods*, 17, 621–631. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.022>
- Oliveira, P. M., Zannini, E., i Arendt, E. K. (2014). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiology*, 37, 78–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.003>
- Olofsson, T.C, Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., i Vásquez, A. (2016). Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. *International Wound Journal*, 13(5), 668–679. <https://doi.org/10.1111/iwj.12345>
- Özaktan, H., i Bora, T. (2004). Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain Eh 24. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3), 224–229. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000200010>

- Özcelik, S., Kuley, E., i Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O., i Spoelstra, S.F. (2006). Microbiology of Ensiling. *Silage Science and Technology, Agronomy Monogra* (silagesciencean), 31–93. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>
- Palacios, S.A., Erazo, J.G., Ciasca, B., Lattanzio, V.M.T., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., i Torres, A. M. (2017). Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat from Argentina. *Food Chemistry*, 230, 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.085>
- Palacios, S.A., Ramirez, M.L., Cabrera Z.M., Farnochi, M.C., Zappacosta, D., Chiacchiera, S.M., ... Torres, A.M. (2011). Occurrence of *Fusarium spp.* and *Fumonisin* in durum wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12264–12269. <https://doi.org/10.1021/jf204035y>
- Pang, H., Tan, Z., Qin, G., Wang, Y., Li, Z., Jin, Q., i Cai, Y. (2012). Phenotypic and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from forage crops and grasses in the Tibetan Plateau. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 50(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1284-5>
- Pang, H., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., i Cai, Y. (2011). Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. *Systematic and applied microbiology*, 34(3), 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.10.003>
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., i Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, 10, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>
- Parvin, S., Wang, C., Li, Y., i Nishino, N. (2010). Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. *Animal Feed Science and Technology*.
- Pascale, M., Visconti, A., i Chelkowski, J. (2002). Ear rot susceptibility and mycotoxin contamination of maize hybrids inoculated with *Fusarium* species under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 645–651. <https://doi.org/10.1023/A:1020622812246>
- Patel, A., Shah, N., Ambalam, P., Prajapati, J. B., Holst, O., i Ljungh, A. (2013). Antimicrobial profile of lactic acid bacteria isolated from vegetables and indigenous fermented foods of India against clinical pathogens using microdilution method. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 26(9), 759–764. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.09.007>
- Patel, S. A., i Parikh, S. C. (2016). Isolation and screening of probiotic potential lactic acid bacteria from local dairy products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(11), 490–498. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.511.057>
- Patharajan, S., Reddy, K. R. N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M. L., i Garibaldi, A. (2011). Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, 22(2), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.024>
- Patriarca, A., i Fernández Pinto, V. (2017). Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.011>

- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A., i Arendt, E. K. (2012). Chapter 5 - "Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. W J. Henry (Red.), *Advances in Food and Nutrition Research* (T. 66, s. 217–238). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Pérez-Sánchez T, Balcázar J L, García Y, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I. (2011). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, 34(7), 499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01260.x>
- Perkowski, J., Kiecana, I., i Kaczmarek, Z. (2003). Natural occurrence and distribution of *Fusarium* toxins in contaminated barley cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4), 331-339. <https://doi.org/10.1023/A:1023547210060>
- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P. i Lebrihi, A. (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin a detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1495 – 1502. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03700.x
- Peyer, L. C., Axel, C., Lynch, K. M., Zannini, E., Jacob, F., i Arendt, E. K. (2016). Inhibition of *Fusarium culmorum* by carboxylic acids released from lactic acid bacteria in a barley malt substrate. *Food Control*, 69, 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.010>
- Piard, J. C., i Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait*, 71(5), 525–541. <https://doi.org/10.1051/lait:1991541>
- Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., i Brandelli, A. (2015). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.055>
- Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S., i Ahokas, J. (2000). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin m1 in a food model. *Journal of Food Protection*, 63(5), 645–650. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.645>
- Pinton, P., i Oswald, I. P. (2014). Effect of deoxynivalenol and other type b trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins*, 6(5), 1615–1643. <https://doi.org/10.3390/toxins6051615>
- Piotrowska, M., Nowak, A., i Czyżowska, A. (2013). Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *European Food Research and Technology*, 236(3), 441–447. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1908-3>
- Piotrowska, M., i Żakowska, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*, 54(4), 279–286.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C., i Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 731-742. <https://doi.org/10.1023/A:1026034509247>
- Pistol, G. C., Gras, M. A., Marin, D. E., Israel-Roming, F., Stancu, M., i Taranu, I. (2014). Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro- and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF-κB signalling molecules in pigs. *British Journal of Nutrition*, 111(3), 452–464. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002675>

- Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., i Piva, A. (1995). Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research*, 15(5), 767–776. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00042-H](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)00042-H)
- Piwoń, A. (2013). Rynek pasz przemysłowych w Polsce w latach 2005–2011. *Journal of Agribusiness and Rural Development*, 3(29), 111–119
- Placinta, C. M., D’Mello, J. P. F., i Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium mycotoxins*. *Animal Feed Science and Technology*, 78(1), 21–37. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00278-8)
- Pleadin, J., Vahčić, N., Perši, N., Ševelj, D., Markov, K., i Frece, J. (2013). *Fusarium mycotoxins’* occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*, 32(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.002>
- Pleadin, J., Vulić, A., Zadavec, M., Lešić, T., Benić, M., Jaki Tkalec, V., i Vahčić, N. (2017). Presence of *Fusarium mycotoxins* in feedstuffs and cow milk sampled from Croatian farms during 2015. *Mljekarstvo : Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje i Prerade Mlijeka*, 67(2), 102–111. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0202>
- Podkówka Z., Podkówka W., i Jermak B. (9th–11th September). The effect of *Lactobacillus buchneri* on fermentation and aerobic stability of maize silage. (s. 124–125). *XIth International Scientific Symposium „Forage Conservation”*, Nitra 2003, Slovak Republic.
- Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., i Immanuel, G. (2010). Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 379–386. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0127-1>
- Puri, K. D., Saucedo, E. S., i Zhong, S. (2012). Molecular characterization of *Fusarium* head blight pathogens sampled from a naturally infected disease nursery used for wheat breeding programs in China. *Plant Disease*, 96(9), 1280–1285. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0713-RE>
- Purwin, C., Lipiński, K., i Pysera, B. (2012). Jakość higieniczna kiszzonek. *Życie Weterynaryjne*, 87(1), 37–40.
- Rafai, P., Bata, A., Jakab, L., i Vanyi, A. (2000). Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 17(9), 799–808. <https://doi.org/10.1080/026520300415354>
- Raju, M. V. L. N., i Devegowda, G. (2000). Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Science*, 41(5), 640–650. <https://doi.org/10.1080/713654986>
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., i Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010>
- RASFF (2006–2016), Annual Reports, [https://ec.europa.eu/food/safety/rasff\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en)
- Rasmussen, P. H., Ghorbani, F., i Berg, T. (2003). Deoxynivalenol and other *Fusarium toxins* in wheat and rye flours on the Danish market. *Food Additives and Contaminants*, 20(4), 396–404. <https://doi.org/10.1080/0265203031000082495>



- Ratanapibulsawat, C., Kroujkaew, P., Sadahiro, O., i Nitisinprasert, S. (2005). Screening and characterization of lactic acid bacteria producing antimicrobial substance against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Science*, 39, 284–293.
- Reddy, K. R. N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H. K., Abel, C. A., i Shier, W. T. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29(1), 3–26. <https://doi.org/10.3109/15569541003598553>
- Reddy, N. S. National D. R. I., i Ranganathan, B. (1985). Effect of time, temperature and pH on growth and production of antimicrobial substances by *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis* S1-67/C. *Milchwissenschaft (Germany, F.R.)*. Pobrano z <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DE854V051>
- Reich, L. J., i Kung, L. (2010). Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Animal Feed Science and Technology*, 159(3), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.002>
- Reinhold, L., i Reinhardt, K. (2011). Mycotoxins in foods in Lower Saxony (Germany): results of official control analyses performed in 2009. *Mycotoxin Research*, 27(2), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s12550-011-0086-7>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., i Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Reyes-Escogido, L., Balam-Chi, M., Rodríguez-Buenfil, I., Valdés, J., Kameyama, L., i Martínez-Pérez, F. (2010). Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(4), 465–474. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9462-0>
- Rotter, B. A., Prelusky, D. B., i Pestka, J. J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48(1), 1–34. <https://doi.org/10.1080/713851046>
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., i van Sinderen, D. (2007). Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 915–923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03619.x>
- Roy, U., Batish, V. K., Grover, S., i Neelakantan, S. (1996). Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 32(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01101-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01101-4)
- ROZPORZĄDZENIE (WE) NR 178/2002 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:035:0007:0008:PL:PDF>
- ROZPORZĄDZENIE (WE) Nr 183/2005 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz. <https://publications.europa.eu/pl/publication-detail/-/publication/4c15cbe8-0ebd-4552-8f06-8fc8d114ba13/language-pl>

- ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 105/2010 z dnia 5 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do ochratoxyny A. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:035:0007:0008:PL:PDF>
- ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 1126/2007 z dnia 28 września 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i produktach z kukurydzy. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:255:0014:0017:PL:PDF>
- ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:PL:PDF>
- Rubert, J., Soriano, J. M., Mañes, J., i Soler, C. (2013). Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 56, 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.039>
- Rybińska, K., Postupolski, J. A. C. E. K., Ledzion, E., Kurpińska-Jaworska, J., i Szczęśna, M. (2008). Programy monitoringowe realizowane przez Państwową Inspekcję Sanitarną w zakresie zanieczyszczenia wybranych środków spożywczych mikotoksynami. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 59(1), 1-7.
- Ryan, L. A., Zannini, E., Dal, F. B., Pawłowska, A., Koehler, P., i Arendt, E. K. (2011). *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036>
- Rzepakowska, A., Zielińska, D., i Kołożyn-Krajewska, D. (2014). Antybiotykooporność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pochodzących z żywności, jako kryterium stawiane probiotykom. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 578.
- Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., i Wei, C. I. (1990). Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53(6), 489–501. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.6.489>
- Sanchis, V., Abadias, M., Oncins, L., Sala, N., Viñas, I., i Canela, R. (1994). Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn-based products from the Spanish market. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2147-2148
- Sathe, S.J., Nawani, N.N., Dhakephalkar, P. K., i Kapadnis, B.P. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2622–2628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>
- Schenck, J., i Müller, C. E. (2014). Microbial composition before and after conservation of grass-dominated haylage harvested early, middle, and late in the season. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(5), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.11.005>
- Schlegel, H. G. (2004). *Mikrobiologia ogólna* (T. 4). Warszawa: PWN.
- Schnürer, J., i Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science i Technology*, 16(1), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>

- Schollenberger, M., Müller, H. M., i Drochner, W. (2003). Deoxynivalenol contents in foodstuffs of organical and conventional production. *Mycotoxin research*, 19(1), 39-42. <https://doi.org/10.1007/BF02940090>
- Schollenberger, M., Müller, H. M., Rühle, M., Suchy, S., Planck, S., i Drochner, W. (2005). Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 97(3), 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.001>
- Schumacher, J., Mullen, J., Shelby, R., Lenz, S., Ruffin, D. C., i Kempainen, B. W. (1995). An investigation of the role of *Fusarium moniliforme* in duodenitis/proximal jejunitis of horses. *Veterinary and Human Toxicology*, 37(1), 39-45.
- Scott, P. M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food Additives i Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure i Risk Assessment*, 29(2), 242-248. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.546000>
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martin-González, M. F., & García, H. S. (2013). Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control*, 31(1), 202-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.023>
- Shao, Y., Zhang, W., Guo, H., Pan, L., Zhang, H., i Sun, T. (2015). Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 50, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.003>
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., i Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>
- Shetty, P. H., Hald, B., i Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.013>
- Shetty, P. H., i Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*, 17(2), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.004>
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q., i Guan, S. (2014). Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), 1094-1105. <https://doi.org/10.3390/ijerph110101094>
- Shim, Y. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Seo, D. K., Lee, S. C., Kwon, P. I. K. (2012). A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science*, 53(4), 482-490. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.690508>
- Shrestha, A., Kim, B. S., i Park, D. H. (2014). Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. *Biocontrol Science and Technology*, 24(7), 763-779. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.894495>

- Silva, L. J. G., Lino, C. M., Pena, A., i Moltó, J. C. (2007). Occurrence of fumonisins B1 and B2 in Portuguese maize and maize-based foods intended for human consumption. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), 381-390. <https://doi.org/10.1080/02652030601003811>
- Singer, R. S., Finch, R., Wegener, H. C., Bywater, R., Walters, J., i Lipsitch, M. (2003). Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(1), 47-51. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00490-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00490-0)
- Sip, A., Krasowska, M., Więckowicz, M., i Grajek, W. (2009). Metody skriningu bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1(62), 5–26.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., i Kenne, L. (2003). Antifungal 3-Hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7554–7557. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003>
- Šliková, S., Gavurníková, S., Šudyová, V., i Gregová, E. (2014). Occurrence of deoxynivalenol in wheat in Slovakia during 2010 and 2011. *Toxins*, 5(8), 1353–1361. <https://doi.org/10.3390/toxins5081353>
- Smith, D. L., Praslickova, D., i Ilangumaran, G. (2015). Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00722>
- Smith, D. L., Subramanian, S., Lamont, J. R., i Bywater-Ekegård, M. (2015). Signaling in the phytomicrobiome: breadth and potential. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00709>
- Sobiczewski, P. (2010). Bakterie w ochronie roślin przed agrofagami – znaczenie gospodarcze i biotechnologia. *Progress in Plant Protection*, 50(3): 1064-1071
- Stanciu, O., Banc, R., Cozma, A., Filip, L., Miere, D., Mañes, J., i Loghin, F. (2015). Occurrence of fusarium mycotoxins in wheat from Europe – A Review. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 19(1), 35–60. <https://doi.org/10.1515/aucft-2015-0005>
- Stanković, S., Lević, J., Ivanović, D., Krnjaja, V., Stanković, G., i Tančić, S. (2012). Fumonisin B1 and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. *Food Control*, 23(2), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.003>
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Oswald, I. P. (2012). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed—focus on Europe. *Toxins*, 4(10), 788–809. <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>
- Stumpf, R., Dos Santos, J., Gomes, L. B., Silva, C. N., Tessmann, D. J., Ferreira, F. D., Del Ponte, E. M. (2013). Fusarium species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 44(1), 89–95. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100012>
- Suchorzyńska, M., i Misiewicz, A. (2009). Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju Fusarium i ich wykrywanie technikami PCR. *Postępy Mikrobiologii*, 48(3), 221 – 230.
- Suterska, A. M., Zielińska, K. J., Grzybowski, R. A., Stecka, K. M., Miecznikowski, A. H., i Kupryś, M. P. (2009). Wpływ wybranych szczepów z rodzaju *Lactobacillus* na ograniczenie skażenia pleśniami i ochratoksyną A kiszzonek z runi łąkowej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 54(4), 125-129

- Szosland-Fałtyn, A., i Królasik, J. (2015). Zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej do kontroli wzrostu pleśni toksynotwórczych oraz usuwania mikotoksyn z produkt ów mlecznych. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, (nr 1), 91–94.
- Škrbić, B., Godula, M., Đurišić-Mladenović, N., i Živančev, J. (2011). Multi-mycotoxin analysis by UHPLC-HESI-MS/MS: a preliminary survey of Serbian wheat flour. *Agronomy Research*, 9, 461-468
- Taheri, H., Tab, F., eh, Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M., i Shariati, P. (2009). Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5833–5837. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1062>
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., i Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00162-9)
- Thakur, R. L., i Roy, U. (2009). Antibacterial activity of *Leuconostoc lactis* isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production. *Research Journal of Microbiology*, 4(3), 122–131. <https://doi.org/10.3923/jm.2009.122.131>
- Tiemann, U., i Dänicke, S. (2007). In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Additives and Contaminants*, 24(3), 306–314. <https://doi.org/10.1080/02652030601053626>
- Toplaghaltsyan, A., Bazukyan, I., i Trchounian, A. (2017). The effects of different carbon sources on the antifungal activity by lactic acid bacteria. *Current Microbiology*, 74(2), 168–174. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1168-8>
- Toś – Luty, S. (2001). W *Ryzyko zdrowotne stosowania pestycydów – problemy teoretyczne i praktyczne*. (s. 7-21,44-51,87). Lublin: Instytut Medycyny Wsi.
- Tralamazza, S. M., Bemvenuti, R. H., Zorzete, P., de Souza Garcia, F., i Corrêa, B. (2016). Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. *Food Chemistry*, 196, 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.063>
- Trombete, F., Barros, A., Vieira, M., Saldanha, T., Venâncio, A., i Fraga, M. (2016). Simultaneous determination of deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside and nivalenol in wheat grains by hplc-pda with immunoaffinity column cleanup. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2579–2586. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0450-5>
- Twarużek, M., Grajewski, J., i Błajet-Kosicka, A. (2012). Skażenia grzybami i występowanie toksyn *Fusarium* w ziarnie kukurydzy w latach 2009-2011 w Polsce. *Progress in Plant Protection*, 52(4), 1064-1069
- Upadhaya, S. D., Park, M. A., i Ha, J. K. (2010). Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review, mycotoxins and their biotransformation in the Rumen: A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1250–1260. <https://doi.org/2010.23.9.1250>
- Usleber, E., Straka, M., i Terplan, G. (1994). Enzyme immunoassay for fumonisin B1 applied to corn-based food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(6), 1392-1396. doi:10.1021/jf00042a027
- Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., i Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 233(2), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.02.020>

- van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., i Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039>
- van der Fels-Klerx, H., i Stratakou, I. (2010). T-2 toxin and HT-2 toxin in grain and grain-based commodities in Europe: occurrence, factors affecting occurrence, co-occurrence and toxicological effects. *World Mycotoxin Journal*, 3(4), 349–367. <https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1237>
- van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 389(1), 147-157. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1317-9>
- van Reenen, C. A., i Dicks, L. M. (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193(3), 157-168. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0668-3>
- Vardon, P. J., McLaughlin, C., i Nardinelli, C. (2003). Potential economic costs of mycotoxins in the United States. W *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems (Task force report)* (s. 136–142). Ames, Iowa, USA: Council for Agricultural Science and Technology.
- Varga, J., Péteria, Z., Táboria, K., Téren, J. i Vágvölgyi, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 321 – 328. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.034
- Vermeulen, N., Gánzle, M. G., i Vogel, R. F. (2006). Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3832–3839. <https://doi.org/10.1021/jf052733e>
- Versantvoort, C. H., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C. J., i Sips, A. J. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Vlková, E., Rada, V., Popelářová, P., Trojanová, I., i Killer, J. (2006). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livestock Science*, 105(1), 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.04.011>
- Völkl, A., Vogler, B., Schollenberger, M., i Karlovsky, P. (2004). Microbial detoxification of mycotoxin deoxynivalenol. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2), 147 – 156. doi: 10.1002/jobm.200310353
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Whitman, W. (Red.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (2. wyd., T. 3). New York: Springer-Verlag.
- Waalwijk, C., Heide, R. van der, Vries, I. de, Lee, T. van der, Schoen, C., Corainville, G. C., Kema, G. H. J. (2004). Quantitative detection of *Fusarium* Species in wheat using taqman. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5–6), 481–494. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032387.52385.13>
- Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., De Gelder, L., i Haesaert, G. (2015). Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2284–2302. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7565>

- Wang, H., Sun, Y., Chen, C., Sun, Z., Zhou, Y., Shen, F., Dai, Y. (2013). Genome shuffling of *Lactobacillus plantarum* for improving antifungal activity. *Food Control*, 32(2), 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.020>
- Wang, L.-Y., Xie, Y.-S., Cui, Y.-Y., Xu, J., He, W., Chen, H.-G., i Guo, J.-H. (2015). Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against fusarium root rot and fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 177, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.005>
- Wang, Y., Liu, S., Zheng, H., He, C., i Zhang, H. (2013). T-2 toxin, zearalenone and fumonisin B1 in feedstuffs from China. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 6(2), 116–122. <https://doi.org/10.1080/19393210.2013.764506>
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., i Ryu, H.-W. (2005). Optimum conditions for the biological production of lactic acid by a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus sp.* RKY2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1007/BF02931178>
- WHO, (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization. [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1) [Dostęp: 10.09.2017r.]
- WHO, (2000). Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B<sub>1</sub>, w Marasas, W.F.O., Miller, J.D., Riley, R.T., i Visconti, A. (eds.). *World Health Organization*, 1 -87. [http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc\\_219\\_rev\\_1.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_219_rev_1.pdf) [Dostęp: 12.07.2017r.]
- Wild, C. P., Miller, J. D., i Groopman, J. D. (2015). Mycotoxin control in low-and middle-income countries. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Working Group Report, 9, 31-42.
- Wójcicki, Z. (2008). Zadania dla nauki i techniki w zakresie pozyskiwania bezpiecznej żywności. *Problemy Inżynierii Rolniczej, R. 16, nr 1*, 5–12.
- Woolford Michael K. (1975). Microbiological screening of the straight chain fatty acids (c1-c12) as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(2), 219–228. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740260213>
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., i Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118-132. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>
- Wróbel, B. (2012a). Jakość kiszonek z runi łąkowej z dodatkiem biologicznych stymulatorów fermentacji. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, T. 12, z. 3*, 211–225.
- Wróbel, B. (2012b). Wpływ stopnia przewiednięcia runi łąkowej na jakość i wartość pokarmową kiszonek w belach cylindrycznych. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 57(4), 199-204.
- Yazici, S., i Velioglu Y.S. (2002). Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-D-pantothenate on the patulin content of apple juice concentrate. *Food/Nahrung*, 46(4), 256–257. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20020701\)46:4<256:AID-FOOD256>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20020701)46:4<256:AID-FOOD256>3.0.CO;2-A)
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Bertin, G., Jeminet, G., i Jouany, J.-P. (2004). Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-Glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1195–1200. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1195>

- Yli-Mattila, T. (2010). Ecology and evolution of toxigenic fusarium species in cereals in Northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 7–18.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Jestoi, M., Parikka, P., Hietaniemi, V., Gagkaeva, T., Rizzo, A. (2008). Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(4), 243–260. <https://doi.org/10.1080/03235400600680659>
- Young, J. C., Trenholm, H. L., Friend, D. W., i Prelusky, D. B. (1987). Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(2), 259–261. <https://doi.org/10.1021/jf00074a023>
- Yuan, X., Guo, G., Wen, A., Desta, S. T., Wang, J., Wang, Y., i Shao, T. (2015). The effect of different additives on the fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.06.001>
- Zaied, C., Zouaoui, N., Bacha, H., i Abid, S. (2012). Natural occurrence of zearalenone in Tunisian wheat grains. *Food Control*, 25(2), 773–777. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.012>
- Zalán, Z., Hudáček, J., Štětina, J., Chumchalová, J., i Halász, A. (2010). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *European Food Research and Technology*, 230(3), 395. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1179-9>
- Zhang, J., Guo, G., Chen, L., Li, J., Yuan, X., Yu, C., i Shao, T. (2014). Effect of applying lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality and aerobic stability of oats-common vetch mixed silage on the Tibetan plateau. *Animal Science Journal*, 86(6), 595-602. <https://doi.org/10.1111/asj.12340>
- Zhou, Y., P. Drouin, P., Lafrenière, C. (2016). Effect of temperature (5–25° C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of applied microbiology*, 121(3), 657-671. <https://doi.org/10.1111/jam.13198>
- Zhu, Y., Hassan, Y. I., Watts, C., i Zhou, T. (2016). Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology*, 216, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.030>
- Zielińska, K., Fabiszewska, A., i Stefańska, I. (2015). Different aspects of *Lactobacillus* inoculants on the improvement of quality and safety of alfalfa silage. *Chilean journal of agricultural research*, 75(3), 298–306. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000400005>
- Zielińska, K., Fabiszewska, A., Stecka, K., i Wróbel, B. (2013). Rola bakterii fermentacji mlekowej w poprawie jakości mikrobiologicznej kiszzonek z runi łąkowej w gospodarstwach ekologicznych. *Woda-Środowisko- Obszary Wiejskie*, 13(1), 171-182
- Zubek, S. (2001) Zastosowanie mikroorganizmów glebowych do aktywnej ochrony roślin rolnych. *Wiadomości Botaniczne*, 45(3/4), 31-33



## Wykaz tabel, wykresów, rysunków i fotografii

### Tabele

Tabela 1. Mykotoksyny wytwarzane przez ważniejsze gatunki grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	15
Tabela 2. Występowanie deoksyniwalenolu w wybranych surowcach i produktach na terenie Europy .....	17
Tabela 3. Występowanie zearalenonu w wybranych surowcach i produktach na terenie Europy .	19
Tabela 4. Występowanie fumonizyn w wybranych surowcach i produktach na terenie Europy ....	21
Tabela 5. Wpływ ważniejszych mykotoksyn fuzaryjnych na ludzi i zwierzęta hodowlane .....	24
Tabela 6. Przegląd preparatów handlowych do zakiszania, zawierających w składzie bakterie fermentacji mlekowej .....	40
Tabela 7. Wykaz bakterii wskaźnikowych wraz z warunkami ich inkubacji i zastosowanym podłożem agarowym.....	53
Tabela 8. Wykaz antybiotyków zastosowanych w doświadczeniu .....	57
Tabela 9. Ilość poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej, w zależności od wariantu doświadczenia, na 1 cm <sup>3</sup> roztworu .....	62
Tabela 10. Skład poszczególnych roztworów symulujących kolejne odcinki układu pokarmowego zwierząt monogastrycznych.....	63
Tabela 11. Wartości graniczne określające stopień wrażliwości badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego na poszczególne antybiotyki .....	67
Tabela 12. Charakterystyka starterów wykorzystanych do reakcji PCR .....	70
Tabela 13. Program PCR ustawiony do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA.....	70
Tabela 14. Warunki w jakich prowadzono doświadczenie w zależności od założonego wariantu..	74
Tabela 15. Opis zastosowanych wariantów podczas zakiszania lucerny .....	77
Tabela 16. Ilość bakterii fermentacji mlekowej w materiale izolacyjnym oraz liczba i warunki inkubacji izolatów w ramach poszczególnych serii .....	80
Tabela 17. Aktywność fungistatyczna bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z kiszonek paszowych względem wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	85
Tabela 18. Zestawienie izolatów bakterii fermentacji mlekowej spełniających/niespełniających założonych kryteriów aktywności fungistatycznej dla poszczególnych serii .....	90
Tabela 19. Zakres aktywności antibakteryjnej wybranych izolatów z sianokiszonki .....	98
Tabela 20. Zakres aktywności antibakteryjnej wybranych izolatów z kiszonki z kukurydzy .....	100
Tabela 21. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki na wybrane antybiotyki .....	116
Tabela 22. Wrażliwość izolatów bakterii fermentacji mlekowej z kiszonki z kukurydzy na wybrane antybiotyki .....	117
Tabela 23. Charakterystyka fenotypowa i genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszonki i kiszonki z kukurydzy I.....	126
Tabela 24. Charakterystyka fenotypowa i genotypowa wybranych izolatów bakterii fermentacji mlekowej z kiszonki z kukurydzy II i III .....	127
Tabela 25. Wpływ czasu inkubacji oraz rodzaju komórek na wiązanie zearalenonu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej.....	138
Tabela 26. Wpływ czasu inkubacji oraz rodzaju komórek na wiązanie deoksyniwalenolu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej.....	140
Tabela 27. Wpływ stężenia zearalenonu i deoksyniwalenolu na ich wiązanie przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej.....	141
Tabela 28. Wpływ temperatury inkubacji na wiązanie zearalenonu i deoksyniwalenolu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej.....	142

Tabela 29. Wpływ pH środowiska na wiązanie zearalenonu i deoksyniwalenolu przez wybrane bakterie fermentacji mlekowej .....	144
Tabela 30. Stabilność kompleksu bakterie-zearalenon podczas pasażu przez symulowany układ pokarmowy zwierząt monogastrycznych.....	147
Tabela 31. Jakość higieniczna kiszzonek z lucerny oraz zawartość mykotoksyn w zależności od zastosowanego wariantu inokulacji materiału roślinnego przed zakiszaniem .....	150
Tabela 32. Aktywność fungistatyczna szczepu <i>Lactobacillus paracasei</i> JKK009 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	169
Tabela 33. Aktywność fungistatyczna szczepu <i>Lactobacillus pentosus</i> PKK100 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	171
Tabela 34. Aktywność fungistatyczna szczepu <i>Lactobacillus plantarum</i> MLK304 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	173
Tabela 35. Aktywność fungistatyczna szczepu <i>Lactobacillus buchneri</i> MYK220 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	175
Tabela 36. Aktywność fungistatyczna szczepu <i>Lactobacillus buchneri</i> MLK324 hodowanego na przygotowanych podłożach, wobec wybranych grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> .....	177

## Wykresy

Wykres 1. Liczba powiadomień do systemu RASFF dotyczących obecności mykotoksyn .....	36
Wykres 2. Aktywność antybakteryjna badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej w zależności od siły oddziaływania .....	95
Wykres 3. Zawartość kwasu mlekowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kiszzonek paszowych.....	107
Wykres 4. Zawartość kwasu octowego i propionowego w hodowlach izolatów bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z kiszzonek paszowych .....	108
Wykres 5. Średnica zahamowania wzrostu izolatów bakterii fermentacji mlekowej z sianokiszsonki przez wybrane antybiotyki.....	114
Wykres 6. Średnica zahamowania wzrostu izolatów bakterii fermentacji mlekowej z kiszsonki z kukurydzy przez wybrane antybiotyki.....	115
Wykres 7. Procentowa redukcja ergosterolu w ziarnie pszenicy przez wyselekcjonowane bakterie z rodzaju <i>Lactobacillus</i> .....	130
Wykres 8. Procentowa redukcja toksyn fuzaryjnych przez wyselekcjonowane bakterie z rodzaju <i>Lactobacillus</i> w ziarnie pszenicy zakażonym <i>F. graminearum</i> .....	131
Wykres 9. Procentowa redukcja toksyn fuzaryjnych przez wyselekcjonowane bakterie z rodzaju <i>Lactobacillus</i> w ziarnie pszenicy zakażonym <i>F. culmorum</i> .....	133
Wykres 10. Krzywa wzrostu <i>L. paracasei</i> JKK 009 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS.....	157
Wykres 11. Krzywa wzrostu <i>L. paracasei</i> JKK 009 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS .....	158
Wykres 12. Krzywa wzrostu <i>L. paracasei</i> JKK 009 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS .....	158
Wykres 13. Krzywa wzrostu <i>L. pentosus</i> PKK 100 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS.....	159
Wykres 14. Krzywa wzrostu <i>L. pentosus</i> PKK 100 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS .....	160
Wykres 15. Krzywa wzrostu <i>L. pentosus</i> PKK 100 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS .....	160

Wykres 16. Krzywa wzrostu <i>L. plantarum</i> MLK 304 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS.....	161
Wykres 17. Krzywa wzrostu <i>L. plantarum</i> MLK 304 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS .....	162
Wykres 18. Krzywa wzrostu <i>L. plantarum</i> MLK 304 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS .....	162
Wykres 19. Krzywa wzrostu <i>L. buchneri</i> MLK 324 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS.....	163
Wykres 20. Krzywa wzrostu <i>L. buchneri</i> MLK 324 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS .....	164
Wykres 21. Krzywa wzrostu <i>L. buchneri</i> MLK 324 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS .....	164
Wykres 22. Krzywa wzrostu <i>L. buchneri</i> MYK 220 na podłożach na bazie tryptonu i ekstraktu mięsnego oraz na podłożu MRS.....	165
Wykres 23. Krzywa wzrostu <i>L. buchneri</i> MYK 220 na podłożach na bazie serwatki oraz na podłożu MRS .....	166
Wykres 24. Krzywa wzrostu <i>L. buchneri</i> MYK 220 na podłożach na bazie ekstraktu roślinnego po produkcji melasy oraz na podłożu MRS .....	166

## Rysunki

Rysunek 1. Izolacja bakterii fermentacji mlekowej z kiszzonek paszowych - Etap 1.....	47
Rysunek 2. Selekcja izolatów bakterii fermentacji mlekowej na podstawie wybranych właściwości - Etap 2 .....	48
Rysunek 3. Identyfikacja genetyczna wyselekcjonowanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej - Etap 3 .....	49
Rysunek 4. Określenie kierunku praktycznego zastosowania wyizolowanych bakterii fermentacji mlekowej - Etap 4.....	51
Rysunek 5. Optymalizacja składu podłoża w kierunku zintensyfikowania właściwości fungistatycznych badanych izolatów bakterii kwasu mlekowego – Etap 5 .....	52
Rysunek 6. Etapy izolacji DNA z komórek izolatów bakterii kwasu mlekowego.....	69
Rysunek 7. Schemat transferu bakterii fermentacji mlekowej przez symulowany układ pokarmowy zwierząt monogastrycznych.....	76

## Fotografie

Fotografia 1. Posiew ilościowy z kiszzonek kukurydzy II w kierunku bakterii fermentacji mlekowej na podłożu MRS (A), oraz posiew redukcyjny izolatu MLK 304 (B).....	81
Fotografia 2. Widok pojedynczych kolonii bakteryjnych na podłożu MRS, otrzymanych z posiewów ilościowych kiszzonek kukurydzy I (A) i kiszzonek kukurydzy III (B) .....	82
Fotografia 3. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. avenaceum</i> (A) oraz <i>F. equiseti</i> (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii JSK: a – JSK022, b – JSK030, c – JSK024, d – JSK031, e – JSK027, f – JSK036, .....	86
Fotografia 4. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. equiseti</i> przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii JKK oraz PKK: a – JKK001, b – JKK002, c – JKK003, d – JKK005, e – JKK008, f – JKK009, g – PKK100, h – PKK103, i – PKK 104 .....	88
Fotografia 5. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. avenaceum</i> (A) i <i>F. graminearum</i> (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – MYK213, b – MYK214, c – MYK206, d – MYK201, e – MYK203, f – MYK204, g – MYK220, h – MYK221, i – MYK218, j – MYK219, k – MYK217 .....	89

Fotografia 6. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. avenaceum</i> (A) i <i>F. graminearum</i> (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – MLK305, b – MLK307, c – MLK306, d – MLK303, e – MLK302, f – MLK304, g – PKK100, h – PKK103, i – PKK 104, j – MLK316, k – MLK317; MLK318.....	90
Fotografia 7. Strefy zahamowania wzrostu <i>S. enterica</i> ser. Enteritidis przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej: a – MYK 210, b – MLK 315, c – MLK 320, d – MLK 316, e – MLK 322, f – MLK 313 i g – MLK 324 .....	96
Fotografia 8. Strefy zahamowania wzrostu <i>S. aureus</i> (A) i <i>E. coli</i> (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – 304, b – 305 i c – 306 .....	97
Fotografia 9. Strefy zahamowania wzrostu <i>P. aeruginosa</i> (A) i <i>C. jejuni</i> (B) przez izolaty bakterii fermentacji mlekowej z serii MLK: a – 021, b – 22 i c – 023, d - 024, e - 025 i seri JKK: f - 009, g - 010.....	97
Fotografia 10. Strefy zahamowania wzrostu izolatów JSK 021 (A-B), JSK 038 (C) i JSK 029 (D) przez wybrane antybiotyki: AML – amoksycylina, AMP – ampicylina, P – penicylina, TE – tetracyklina, OB – kloksacylina, N - neomycyna .....	114
Fotografia 11. Strefy zahamowania wzrostu izolatów MYK 220 021 (A-B) i JKK 009 (C-D) przez wybrane antybiotyki: AML – amoksycylina, AMP – ampicylina, P – penicilina, TE – tetracyklina, OB – kloksacylina, N - neomycyna .....	115
Fotografia 12. Obraz rozdziału elektroforetycznego A: genomowego DNA, gdzie M – marker wielkości DNA, oraz B: produktów PCR o długości 1500 pz, gdzie M – marker wielkości, 1 – 10 – izolaty bakterii fermentacji mlekowej (kolejno JKS 021, PSK 201, JKK 006, JKK 009, PKK, PKK 100, MYK 210, MYK 220, MLK 304, MLK 306 i MLK 324 .....	124
Fotografia 13. Analiza sekwencji zamplifikowanego genu 16S rRNA w programie FinchTV 1.4.0	124
Fotografia 14. Analiza sekwencji z amplifikowanego genu 16S rRNA w programie GeneDoc 2.7.000 .....	125
Fotografia 15. Zdjęcia z doświadczenia związanego z przygotowaniem kiszonki z lucerny zaprawionej badanymi szczepami bakterii fermentacji mlekowej: A – silosy z kiszonką z lucerny przed otwarciem oraz B – kiszonka z lucerny tuż po wyciągnięciu z silosu .....	149
Fotografia 16. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. graminearum</i> , przez hodowle <i>L. paracasei</i> JKK009 na pożywce TM3 (A) oraz TM5 (B) w zależności od czasu prowadzenia hodowli: a i d – 24 h; b i e – 48 h; .....	170
Fotografia 17. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. graminearum</i> (A) oraz <i>F. culmorum</i> (B) przez hodowle <i>L. pentosus</i> PKK100 na przygotowanych podłożach: a – TM5, 24 h; b – TM5, 48 h; c – S3, 48 h.....	172
Fotografia 18. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. graminearum</i> hodowle <i>L. plantarum</i> MLK304 na podłożu TM5 (A) oraz S3 (B) w zależności od czasu prowadzenia hodowli: a i c – 48 h; b i d – 72 h .....	174
Fotografia 19. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. graminearum</i> (A) oraz <i>F. culmorum</i> (B) przez hodowle <i>L. buchneri</i> MYK220 na przygotowanych podłożach: a – TM4, 24 h; b – TM4, 48 h; c – S5, 24 h.....	176
Fotografia 20. Strefy zahamowania wzrostu <i>F. graminearum</i> hodowle <i>L. buchneri</i> MLK324 na podłożu TM5 (A) oraz S5 (B) w zależności od czasu prowadzenia hodowli: a i d – 24 h; b i e – 48 h; c i f – 72 h .....	178

## Załącznik

**Właściwości fungistatyczne bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z sianokiszonki, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* – seria JSK i PSK.**

Numer izolatu	<i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
<b>Seria JSK</b>				
JSK 021	+	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	+
JSK 022	12,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00	17,33 ± 0,58	+
JSK 023	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	+
JSK 024	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	+
JSK 025	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	+
JSK 026	11,00 ± 0,00	+	14,33 ± 0,58	+
JSK 027	0,00 ± 0,00	+	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
JSK 028	12,33 ± 2,31	0,00 ± 0,00	16,67 ± 0,58	+
JSK 029	13,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	15,33 ± 0,58	+
JSK 030	12,00 ± 0,00	+	15,33 ± 0,58	+
JSK 031	12,00 ± 0,00	+	17,67 ± 1,15	+
JSK 033	12,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
JSK 036	12,00 ± 1,73	11,33 ± 0,58	+	0,00 ± 0,00
JSK 037	12,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	+	+
JSK 038	11,67 ± 1,15	0,00 ± 0,00	+	+
<b>Seria PSK</b>				
PSK 201	12,00 ± 0,00	13,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	11,33 ± 0,58
PSK 202	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PSK 203	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PSK 204	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	+
PSK 205	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00
PSK 206	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PSK 207	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

+ - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

**Właściwości fungistatyczne bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* – seria JKK i PKK.**

Numer izolatu	<i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
<b>Seria JKK</b>				
JKK001	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00
JKK002	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
JKK003	0,00 ± 0,00	12,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
JKK004	11,00 ± 0,00	13,33 ± 0,58	15,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00
JKK005	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,33 ± 0,58	+
JKK006	12,00 ± 0,00	13,00 ± 1,00	12,00 ± 1,00	+
JKK008	12,00 ± 0,00	13,33 ± 1,53	15,00 ± 1,00	11,00 ± 0,00
JKK009	12,00 ± 0,00	13,00 ± 2,00	14,00 ± 1,00	11,00 ± 0,00
JKK010	12,00 ± 0,00	12,68 ± 0,58	13,33 ± 1,53	0,00 ± 0,00
JKK011	12,00 ± 0,00	14,68 ± 0,58	12,67 ± 0,58	11,68 ± 0,58

Numer izolatu	<i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
<b>Seria PKK</b>				
PKK100	12,33 ± 0,58	12,33 ± 0,58	11,00 ± 0,00	12,33 ± 1,55
PKK101	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,68 ± 1,15	0,00 ± 0,00
PKK102	11,00 ± 0,00	+	13,33 ± 1,53	11,00 ± 0,00
PKK103	11,00 ± 0,00	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PKK104	11,00 ± 0,00	+	13,68 ± 2,31	12,33 ± 1,53

+ - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

**Właściwości fungistatyczne bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* – seria AK.**

Numer izolatu	<i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
AK 01	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 02	12,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	11,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00
AK 12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 13	0,00 ± 0,00	+	13,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 14	0,00 ± 0,00	+	13,67 ± 1,00	0,00 ± 0,00
AK 15	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00
AK 16	+	0,00 ± 0,00	16,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 17	+	0,00 ± 0,00	17,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 18	0,00 ± 0,00	+	13,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 19	+	0,00 ± 0,00	13,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00
AK 20	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16,00 ± 1,73	+
AK 21	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00
AK 22	12,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00
AK 23	13,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 25	14,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	17,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00
AK 26	15,00 ± 2,00	0,00 ± 0,00	15,67 ± 1,15	0,00 ± 0,00
AK 27	15,00 ± 2,00	0,00 ± 0,00	17,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00
AK 28	16,33 ± 2,31	0,00 ± 0,00	18,67 ± 1,53	0,00 ± 0,00
AK 29	16,00 ± 2,65	0,00 ± 0,00	20,67 ± 1,53	+
AK 31	12,33 ± 0,58	0,00 ± 0,00	15,00 ± 1,41	0,00 ± 0,00
AK 32	12,67 ± 1,15	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 33	13,67 ± 1,15	0,00 ± 0,00	12,67 ± 1,53	0,00 ± 0,00
AK 34	11,67 ± 0,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
AK 35	14,33 ± 1,15	0,00 ± 0,00	13,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00
AK 36	16,00 ± 1,73	0,00 ± 0,00	15,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00

+ - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

**Właściwości fungistatyczne bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* – seria MYK.**

Numer izolatu	<i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
MYK 201	11,00 ± 0,00	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MYK 202	11,00 ± 0,00	+	13,00 ± 1,41	13,50 ± 0,71
MYK 203	11,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00
MYK 204	11,50 ± 0,71	+	17,00 ± 4,24	22,00 ± 2,83
MYK 205	+	+	11,00 ± 0,00	12,50 ± 2,12
MYK 206	+	0,00 ± 0,00	13,00 ± 2,83	27,00 ± 4,24
MYK 207	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00
MYK 208	12,50 ± 0,71	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MYK 209	0,00 ± 0,00	+	15,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71
MYK 210	11,00 ± 0,00	+	15,50 ± 0,71	14,00 ± 1,41
MYK 211	11,00 ± 0,00	+	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00
MYK 212	11,00 ± 0,00	+	14,00 ± 1,41	15,50 ± 0,71
MYK 213	+	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MYK 214	11,50 ± 0,71	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MYK 215	+	0,00 ± 0,00	15,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71
MYK 216	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	13,50 ± 2,12
MYK 217	11,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MYK 218	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,50 ± 2,12	15,00 ± 1,41
MYK 219	11,50 ± 0,71	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MYK 220	11,00 ± 0,00	+	16,00 ± 2,83	11,50 ± 0,71
MYK 221	12,00 ± 0,00	+	20,00 ± 0,00	15,50 ± 3,54
MYK 222	11,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

+ - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych

**Właściwości fungistatyczne bakterii fermentacji mlekowej, wyizolowanych z kiszonki z kukurydzy, wobec wybranych grzybów z rodzaju *Fusarium* – seria MLK.**

Numer izolatu	<i>F. equiseti</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. graminearum</i>
MLK 301	12,50 ± 0,71	+	16,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00
MLK 302	12,50 ± 0,71	+	13,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 303	12,00 ± 1,41	11,00 ± 0,00	19,00 ± 1,41	16,00 ± 4,24
MLK 304	12,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	20,50 ± 0,71	18,50 ± 2,12
MLK 305	12,00 ± 1,41	+	14,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 306	12,50 ± 0,71	+	19,00 ± 1,41	17,50 ± 3,54
MLK 307	0,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 308	12,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 309	12,00 ± 1,41	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 310	11,00 ± 0,00	+	11,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00
MLK 311	11,00 ± 0,00	+	12,50 ± 2,12	21,00 ± 1,41
MLK 312	+	+	12,00 ± 1,41	29,00 ± 1,41
MLK 313	11,50 ± 0,71	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 314	11,50 ± 0,71	+	11,00 ± 0,00	11,50 ± 0,71
MLK 315	11,50 ± 0,71	+	11,00 ± 0,00	10,50 ± 0,71
MLK 316	11,50 ± 0,71	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 317	12,00 ± 1,41	+	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 318	12,00 ± 1,41	+	16,00 ± 2,83	21,00 ± 1,41
MLK 319	11,00 ± 0,00	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 320	11,50 ± 0,71	+	0,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00
MLK 321	11,50 ± 0,71	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 322	12,00 ± 1,41	+	+	0,00 ± 0,00
MLK 323	11,50 ± 0,71	+	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
MLK 324	12,50 ± 0,71	+	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00

+ - zmiana barwy grzybni wgłębnej/zredukowana grzybnia powierzchniowa

Źródło: na podstawie badań własnych



## Wykaz dorobku naukowego

### Publikacje w czasopismach

- Gwiazdowski, R., Gwiazdowska, D., Juś, K., Bednarek-Bartsch, A., i Danielewicz, B. (2013). Wstępna charakterystyka fungistatycznych metabolitów wytwarzanych przez *Paenibacillus* sp. *Progress in Plant Protection*, 53(3), 533-537.
- Gwiazdowski, R., Gwiazdowska, D., Juś, K. i Waśkiewicz, A. (2015). Ocena możliwości usuwania zearalenonu przez bakterie glebowe z rodzaju *Rhodococcus*. *Progress In Plant Protection*, 55(2): 237–241. doi: 10.14199/ppp-2015-040
- Gwiazdowska, D., Juś, K., Jasnowska-Matecka, J., i Kluczyńska, K. (2015). The impact of polyphenols on *Bifidobacterium* growth. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 895–901 [http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015\\_1154](http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1154)
- Juś, K., Gwiazdowska, D., i Waśkiewicz, A. (2016). Wykorzystanie bakterii glebowych z rodzaju *Brevibacillus* do dekontaminacji zearalenonu. *Studia Oeconomica Posnaniensia*, 4(6), 27–39. <https://doi.org/10.18559/SOEP.2016.6.2>
- Perczak, A., Juś, K., Marchwińska, K., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A., Goliński, P., (2016). Degradation of zearalenone by essential oils under *in vitro* conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7(1224), 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2016.01224

### Rozdziały w monografiach naukowych

- Borowicz, J., Kasperski, K., Gwiazdowska, D., Tichoniuk, M., Wojciechowska, P., Juś, K., (2015). Antibacterial activity of chemical compounds used for active packaging w: Krzysztof Juś, Joanna Jasnowska-Matecka, Olga Bińczak (red.), *Current Trends In Commodity Science - New Trends in Food Quality, Packaging and Consumer Behavior*, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Poznań, 99-108.
- Juś, K., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K., (2016). Antibacterial properties and MIC determination of nanoparticles colloidal water w: Zieliński R., Żuchowski J. (red.), *Quality assessment of selected industrial products: Ocena jakości wybranych wyrobów przemysłowych*, Instytut Technologii Eksploatacji - PIB, Radom, 117-124.
- Marchwińska, K., Gwiazdowska, D., Juś, K., (2016). Antybakteryjne właściwości bakterii fermentacji mlekowej pochodzących z mikrobioty jelitowej prosiąt ssących w: Żuchowski J., Zieliński R. (red.), *Food quality evaluation = Ocena jakości żywności*, Instytut Technologii Eksploatacji - PIB, Radom, s. 207-215.
- Juś, K., (2016). Biologiczna kontrola grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* poprzez wykorzystanie bakterii *Paenibacillus* sp. w: Monika Panfil (red.), *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce: Mikrobiologia i ekologia*, Młodzi Naukowcy, Poznań, s. 79-86