

## AFLATOXINS OCCURANCE IN FEED AND METHODS OF ITS DECONTAMINATION

### Summary

Mold growth in feed leads to adverse effects associated with the reduction of its nutritional value, production of mycotoxins (toxic secondary metabolites), and allergenic spores, which are risk factors for animal and human health. Aflatoxins, synthesized especially by strains of the genus *Aspergillus* are the best known mycotoxins. The presence of aflatoxins in feed is connected with the growth of mold in the time of harvest and during storage of agricultural products, which are used in animal feed. The possibility of biotransformation of aflatoxin B<sub>1</sub> in dairy cattle and the accumulation of products of the reaction - the aflatoxin M<sub>1</sub> in milk is another threat. For many years there were conducted researches into ways of reducing mycotoxin contamination of feed, either by inhibiting the growth of fungi and thus the production of mycotoxins by them and through detoxification of material contaminated by chemical, physical and microbiological methods. The latter method seems to be the most suitable for practical use in decontamination of contaminated plant material. Researches on the biological inactivation of aflatoxins and inhibition of growth of toxigenic fungi are still held in a narrow range and comprise mainly fermentation processes. Among many microorganisms having the ability to degrade mycotoxins the lactic acid bacteria are of particular interest. Bacterial preparations for silage feed, which include the bacteria strains with the special ability to reduce the level of aflatoxins are examples of their practical application. In this paper there was proved a positive effect of bacterial starter culture on decreasing the content of aflatoxins in meadow grass silages, even above 90% with respect to its initial content.

**Key words:** feed, harvesting, storage, mould, aflotoxins, decontamination, lactic acid bacteria, nutritional value, research

## WYSTĘPOWANIE AFLATOKSYN W PASZACH I METODY ICH DEKONTAMINACJI

### Streszczenie

Rozwój pleśni w paszach niesie ze sobą negatywne skutki związane z obniżeniem jej wartości odżywczej, produkcją mikotoksyn (drugorzędowych toksycznych metabolitów) oraz alergicznych spor, które stanowią czynniki ryzyka dla zdrowia zwierząt i ludzi. Do najlepiej poznanych mikotoksyn należą aflatoksyny, syntetyzowane głównie przez szczepy z rodzaju *Aspergillus*. Obecność aflatoksyn w paszach jest związana z rozwojem pleśni w czasie zbioru oraz podczas przechowywania płodów rolnych, które wykorzystuje się w żywieniu zwierząt. Dodatkowym zagrożeniem jest możliwość biotransformacji aflatoksyny B<sub>1</sub> u bydła mlecznego i kumulacja produktów tej reakcji – aflatoksyny M<sub>1</sub> w mleku. Od wielu lat prowadzone są badania nad możliwościami ograniczenia zanieczyszczenia mikotoksynami pasz, zarówno na drodze hamowania wzrostu grzybów i tym samym produkcji przez nie mikotoksyn, jak i poprzez detoksykację materiału skażonego na drodze chemicznej, fizycznej i mikrobiologicznej. Ostatnia z wymienionych metod wydaje się metodą najbardziej przydatną do praktycznego wykorzystania w dekontaminacji skażonych surowców roślinnych. Prace badawcze dotyczące biologicznej inaktywacji aflatoksyn i hamowania rozwoju grzybów toksynotwórczych prowadzone są nadal w wąskim zakresie i obejmują przede wszystkim procesy fermentacyjne. Spośród wielu drobnoustrojów wykazujących zdolność do degradacji mikotoksyn szczególnym zainteresowaniem cieszą się bakterie fermentacji mlekowej. Przykładami praktycznego ich zastosowania są preparaty bakteryjne przeznaczone do kiszenia pasz, które zawierają szczepy bakterii o zdolności do obniżenia poziomu aflatoksyn. W pracy zaprezentowano pozytywny wpływ bakteryjnej kultury starterowej na obniżenie zawartości aflatoksyn w kiszonkach z runi łąkowej nawet powyżej 90%, w odniesieniu do jej początkowej zawartości w zielonkach.

**Słowa kluczowe:** pasze, zbiór, przechowywanie, pleśnie, aflatoksyny, dekontaminacja, bakterie kwasu mlekowego, wartość odżywcza, badania

### 1. Wprowadzenie

W 1960 roku na jednej z farm drobiu w Anglii w przeciągu paru miesięcy padło ponad 100 tys. młodych indyków na nieznaną wówczas chorobę, nazwaną „chorobą indyczą X”. Wkrótce objęła ona swoim zasięgiem także młode kaczki oraz bażanty. W szybkim czasie odkryto związek pomiędzy upadkami ptactwa a paszą, w której skład wchodziły brazylijskie orzeszki ziemne. W rok później stwierdzono, że są one porażone metabolitami pleśni *Aspergillus flavus*, które nazwano aflatoksynami [1].

Aflatoksyny to toksyczne metabolity wytwarzane przez grzyby z rodzaju *A. flavus* lub *A. parasiticus* w żywności i paszy, będące przyczyną zatruc pokarmowych, zwanych aflatoksykozami, występujących zarówno u zwierząt hodowlanych, domowych jak i ludzi [2-3]. Wyróżniamy sześć różnych aflatoksyn oznaczanych symbolami B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> oraz M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> (rys. 1). Aflatoksyny posiadają zdolność fluorescencji w świetle UV. Aflatoksyny B pod wpływem promieniowania ultrafioletowego emitują światło niebieskie (stąd oznaczane są symbolem B - ang. *blue*), a aflatoksyny G światło zielono-żółte (ang. G - *green-yellow*). Pozostałe dwa metabolity oznaczone symbolami M<sub>1</sub> oraz M<sub>2</sub> powstają

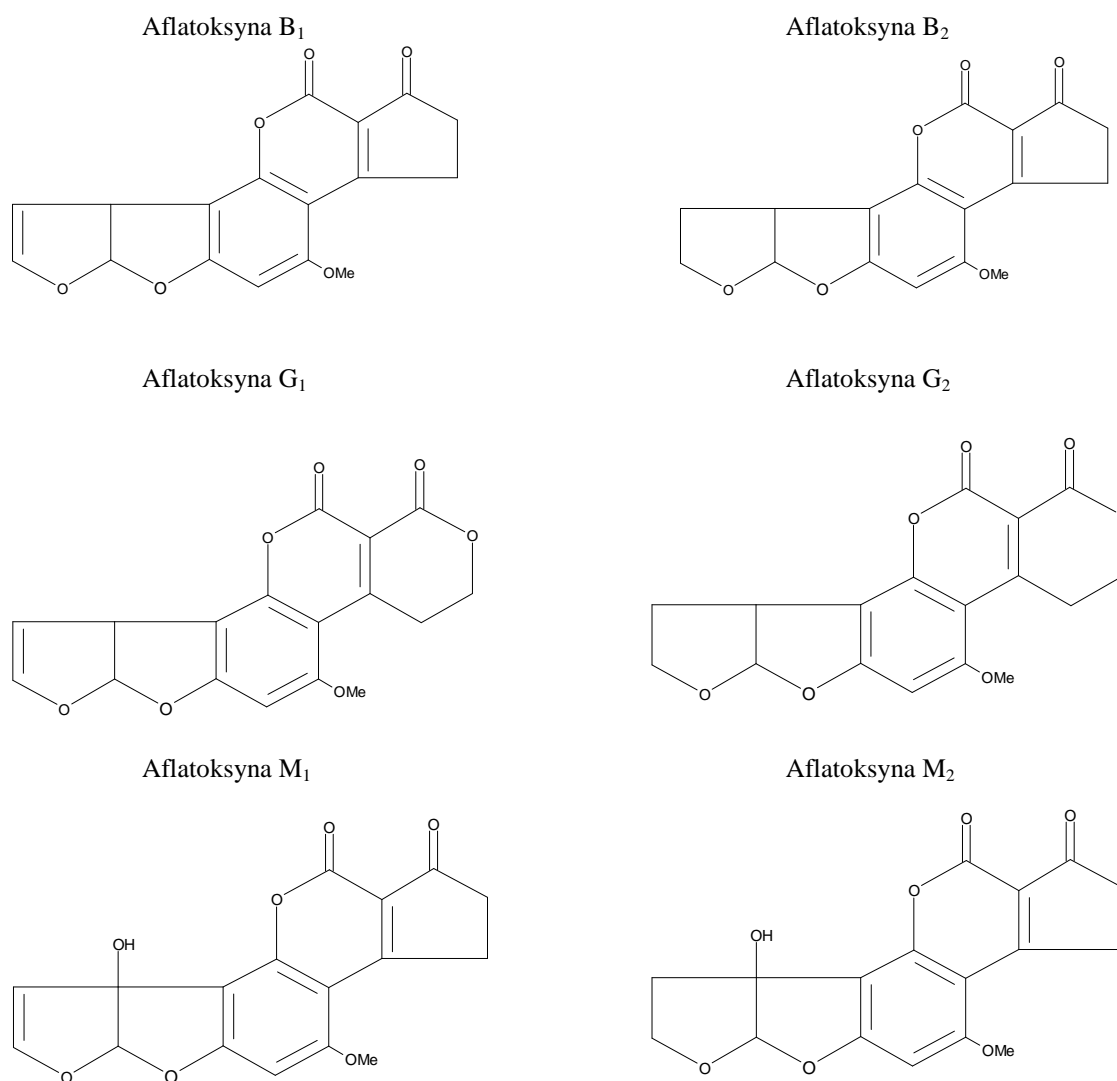
w wyniku transformacji pozostałych aflatoksyn i podlegają kumulacji w mleku (ang. *milk*). Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem zaklasyfikowała aflatoksynę B<sub>1</sub> i M<sub>1</sub> jako ludzki kancerogen [4]. Zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej nr 466/2001 dopuszczalne poziomy aflatoksyny M<sub>1</sub> w mleku surowym wynoszą: 50 ppt, natomiast w mleku przeznaczonym dla niemowląt 25 ppt. Wiele krajów wprowadziło także ograniczenia obecności aflatoksyn w paszy, w niektórych państwach maksymalnie do 50 ppb [5].

Aflatoksyny są obiektem wielu badań z uwagi na ich udowodnione działanie kancerogenne i mutagenne na zwierzętach. Pasze i żywność mogą ulec zanieczyszczeniu w każdym momencie, począwszy od rozwoju rośliny na polu, poprzez zbiór, jak też w trakcie obróbki, przechowywania i transportu produktu. Obecność mikotoksyn jest wynikiem skażenia pasz i żywności pleśniami, ale obecność pleśni w surowcu nie równa się obecności toksyn i odwrotnie. Aflatoksyny produkowane są przez pleśnie najintensywniej w warunkach wysokiej wilgotności (88-95%) i temperatury rzędu 25-27°C. Do pozostałych czynników wpływających na produkcję mikotoksyn należą: rodzaj surowca, pH, aktywność wody, konkurencja z innymi mikroorganizmami, specyficzność szczepowa, kondycja rośliny. Wiele toksyn

jest niewrażliwych na obróbkę cieplną, w wyniku czego są one stabilne w przeciętnych warunkach stosowanych podczas przetwórstwa oraz gotowania żywności i mogą pozostawać w produkcji długo po zniknięciu pleśni [1, 5-8].

Zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 roku pasza, która ma negatywne skutki dla zdrowia ludzi lub zwierząt, nie może być wprowadzona do obrotu. Zapewnienie bezpieczeństwa żywności „od pola do stołu” wymaga bezwzględnego objęcia urzędową kontrolą środków żywienia zwierząt, o czym mówi ustawa o paszach z 22 lipca 2006 roku. Dlatego też zasadnicze znaczenie ma ustalenie, które mikotoksyny oraz jak często i w jakich ilościach występują na płodach rolnych.

W kiszonkach rozwój pleśni może nastąpić nawet w ostatnich dniach terminu przydatności do spożycia przez zwierzęta [9]. Praktyka rolnicza pokazuje, że wzrost grzybów strzępkowych jest wynikiem zbyt słabego ubicia masy kiszonej, nieszczelnego przykrycia silosu lub uszkodzenia folii, a także niewłaściwej powierzchni wybierania kiszonki w stosunku do liczby żywionych zwierząt [3]. Drobnoustroje mogą rozwijać się na powierzchni i we wnętrzu silosów lub balotów [10].



Rys. 1. Wzory strukturalne aflatoksyn  
Fig. 1. Structure of aflatoxins

Rozwój pleśni w kiszonkach powoduje zmniejszenie wartości odżywczej paszy, może skutkować produkcją toksycznych metabolitów oraz alergennych spor, które stanowią czynnik ryzyka dla zdrowia zwierząt i ludzi [9, 11]. W przypadku skażenia pasz aflatoksynami jest ona dyskwalifikowana, szczególnie, że pobrana wraz z paszą aflatoksyna B<sub>1</sub> przechodzi do mleka, gdzie metabolizowana jest do aflatoksyny M<sub>1</sub> [12].

Eliminacja lub inaktywacja aflatoksyn ze skażonych surowców może odbywać się metodami fizycznymi, chemicznymi lub biologicznymi. Do metod fizycznych możemy zaliczyć inaktywację termiczną, stosowanie promieniowania UV lub radiacyjnego oraz ekstrakcję rozpuszczalnikami. Wśród metod chemicznych wyróżnia się traktowanie chloranami i czynnikami utleniającymi. Obie wspomniane grupy technik dekontaminacji są kosztowne, mało efektywne oraz powodują straty wartości żywieniowej pasz i żywności. Ciekawą alternatywę stanowią natomiast metody biologiczne, które opierają się na zastosowaniu mikroorganizmów zdolnych do dekontaminacji mikotoksyn [1, 13-15].

Bakterie fermentacji mlekowej przez wieki stosowane były w produkcji żywności fermentowanej i fermentowanych pasz, ze względu na swoje zdolności wykorzystywania cukrów do produkcji kwasu mlekowego, a tym samym obniżania pH i zabezpieczania przed rozwojem szkodliwej mikroflory. Ponadto grupa tych mikroorganizmów posiada status GRAS (ang. *Generally Recognized As Safe*) [16-17]. Tradycja wykorzystywania bakterii fermentacji mlekowej do konserwowania żywności, w połączeniu ze współczesną wiedzą na temat pozytywnego ich działania na zdrowie ludzi i zwierząt jako organizmów o potencjalnym działaniu probiotycznym, gwarantuje ich wszechstronne wykorzystywanie do utrwalania szerokiej gamy produktów żywnościowych i pasz [18].

W innych badaniach stwierdzono, że szczepy pochodzące z rodzaju *Lactobacillus* sp., a zwłaszcza z gatunku *L. plantarum* wytwarzają metabolity o silnym działaniu antypleśniowym oraz wykazują szczególne zdolności do usuwania aflatoksyny B<sub>1</sub> z fermentowanych produktów mleczarskich, produktów zbożowych i pasz objętościowych [19, 20]. Niektóre szczepy bakterii fermentacji mlekowej hamują równocześnie wzrost pleśni oraz tworzenie przez nie mikotoksyn [21-23]. W wyniku badań prowadzonych pod kierunkiem El-Nezamii in. [14, 24], udowodniono, że dwa szczepy *L. rhamnosus*, były zdolne do obniżenia poziomu aflatoksyny B<sub>1</sub> w podłożu o 80%, a stopień biodegradacji był zależny od temperatury i początkowej ilości inokulum. Według tych autorów usuwanie toksyny ze środowiska przez szczepy z rodzaju *Lactobacillus* jest wynikiem jej wiązania fizycznego do ściany komórkowej bakterii [25]. Nie można też wykluczyć mechanizmu przemiany chemicznej aflatoksyny B<sub>1</sub> spowodowanej zakwaszeniem środowiska lub będącej wynikiem transformacji z udziałem enzymów bakteryjnych [26-29].

Karunaratne i in. [30], badali hamowanie rozwoju pleśni i syntezy aflatoksyn przez bakterie *Lactobacillus* sp. W badaniach testowali trzy szczepy *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* i *L. plantarum* oraz handlową kulturę starterową do kiszenia pasz składającą się z tych samych gatunków bakterii. Wszystkie badane szczepy hamowały wzrost pleśni i syntezę aflatoksyn w kiszonkach ze zbóż, natomiast nie zaobserwowano tego zjawiska w hodowli szczepów w płynnym podłożu syntetycznym. Na podstawie wyników badań pu-

blikowanych w 2007 roku, dotyczących zdolności wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, do usuwania aflatoksyny B<sub>1</sub> z przechowywanych produktów mleczarskich jak surowe mleko, jogurt i sery, stwierdzono, że zdolność tą posiadają zarówno żywe jak i martwe komórki bakterii. Z produktów mleczarskich wyizolowano 42 szczepy bakterii fermentacji mlekowej, z których 12 należących do gatunków *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus* wykazywało zdolność do wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> [31]. Bueno i in. [32] zasugerowali, że mikroorganizmy charakteryzują się podobnymi wartościami stałej szybkości reakcji wiązania mikotoksyn, ale różnią się liczbą miejsc jej wiązania. Wyniki badań dotyczące zdolności do usuwania ze środowiska aflatoksyny B<sub>1</sub> przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej i drożdży *S. cerevisiae*, wskazują na krótki czas reakcji wiązania aflatoksyny przez te mikroorganizmy (około 1 min) oraz fizyczny charakter wiązania między aflatoksyną B<sub>1</sub> a powierzchnią mikroorganizmu. Ilość usuwanej aflatoksyny B<sub>1</sub> ze środowiska była zależna od jej zawartości i ilości wprowadzanych bakterii lub drożdży [32].

Pomimo przedstawionych przez niektórych badaczy hipotez fizycznego charakteru wiązania mikotoksyn, w tym aflatoksyny B<sub>1</sub>, przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej, dokładny mechanizm ich eliminacji nie jest w pełni poznany. Z kolei opublikowane w 2008 roku wyniki wskazują na istotną rolę enzymów bakterii (dehydrogenaz) w procesie przemiany toksycznej formy aflatoksyn do form niestabilnych i dalej do związków nietoksycznych [33].

Aflatoksyny B<sub>1</sub> obecne w paszach są kumulowane przez krowy i wydzielane do mleka w postaci aflatoksyny M<sub>1</sub>. Ze względu na istnienie efektu *carry-over* skażone mleko może być źródłem tej mikotoksyny dla ludzi spożywających zanieczyszczone produkty mleczne [34-35]. W naszych warunkach klimatycznych aflatoksyny mogą być wytwarzana gniazdowo, na przykład w określonych warstwach silosów ogrzewanych przez słońce lub w zagrzany sianie. Dlatego – być może – jeden z metabolitów aflatoksyny B<sub>1</sub>, a mianowicie aflatoksyna M<sub>1</sub> obecna była w 23,6% próbek mleka, ocenianych w 1995 r. w woj. krakowskim. Badania prowadzone w 2011 roku wykazały, że w próbkach mleka pobranych z pięciu badanych gospodarstw oznaczono aflatoksynę M<sub>1</sub> [36]. Obecność tej mikotoksyny na poziomie 8,45-8,60 ppt wykryto w dwóch z czterech badanych próbek mleka pochodzących z gospodarstwa kontrolnego i w dwóch na osiem badanych próbek mleka na poziomie poniżej 5,00 ppt [37]. Bardziej niebezpieczne wydają się być wyniki badań wykonanych na SGGW w Warszawie, stwierdzono, że AFM<sub>1</sub> obecna była w 17,3% próbek z 238 badanych próbek mleka kobycego. Oznacza to, że niemowlęta otrzymują czasami dawkę tej mikotoksyny [36].

Elgerbi i in. [12], badali zdolność 8 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* i *Lactococcus* oraz 4 szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* do eliminacji aflatoksyny M<sub>1</sub> z mleka oraz z buforu fosforanowego. Obniżenie poziomu toksyny z mleka UHT przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* było większe w odniesieniu do bakterii *Bifidobacterium* sp. Spośród badanych szczepów najbardziej efektywne w eliminacji mikotoksyny były te należące do gatunku *L. bulgaricus* (80,5% eliminacji aflatoksyny M<sub>1</sub> z mleka). W buforze fosforanowym z dodatkiem aflatoksyny M<sub>1</sub> szczepy z rodzaju *Lactobacillus* sp. usuwały około 70%, a szczepy *Bifidobacterium* sp. około 40%, w tych samych warunkach doświadczeń. Z kolei Corassin i in. [36] badali zdolność drożdży *S. cerevisiae* oraz bakterii *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp. *bulga-*

*ricus* oraz *L. lactis*. do fizycznego wiązania AFM<sub>1</sub> w mleku, po inaktywacji termicznej mikroorganizmów. Autorzy wykazali, że 10-krotnie więcej toksyny są w stanie wiązać komórki drożdży. Dodatkowo dowiedziono fizyczny charakter tego wiązania [38]. Wyniki badań nad ograniczeniem zanieczyszczenia żywności i pasz mikotoksynami, wskazują na możliwość hamowania ich syntezy przez wybrane mikroorganizmy w procesach biotechnologicznych. Spośród wielu drobnoustrojów wykazujących zdolność do hamowania rozwoju pleśni szczególne zainteresowanie budzą bakterie fermentacji mlekowej [21, 30, 45]. Zdolnością do hamowania rozwoju pleśni toksynotwórczych i obniżania zawartości syntezowanych przez pleśnie aflatoksyn charakteryzują się niektóre szczepy z gatunków: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. acidophilus* i *L. casei* [19, 21, 31, 46].

Prace badawcze dotyczące biologicznej inaktywacji aflatoksyn i hamowania rozwoju pleśni toksynotwórczych prowadzone są nadal w znacznej mierze na poziomie laboratoryjnym. Ciekawy przegląd dotyczący aktualnych postępów w zakresie zastosowania szczepów bakterii fermentacji mlekowej i drożdży *S. cerevisiae* zaprezentowali Oliveira i in. [1]. Obecnie prowadzone badania obejmują przede wszystkim procesy fizycznej adsorpcji mikotoksyn ze środowiska (mleka, buforu PBS) oraz w mniejszym stopniu procesów fermentacyjnych [1, 39]. Jednym ze światowych trendów badawczych są próby ograniczenia wchłaniania mikotoksyn z przewodu pokarmowego zwierząt z wykorzystaniem preparatów składających się z probiotycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Jak dotąd próby te znajdują się w fazie badań, choć istnieją doniesienia o redukcji aflatoksyny B<sub>1</sub> w przewodzie pokarmowym kurczaków [40]. Stosowanie pasz porażonych grzybami zmieszanych z kulturami bakterii izolowanych z przewodu pokarmowego drobiu może powodować obniżenie deoksyniwalenonu o 55%. Dobroczynny wpływ bakterii tłumaczy się m.in. zwiększaniem w pokarmie ilości enzymów, co ułatwia trawienie i chelatowanie mikotoksyn [41]. Podawanie dwóch szczepów z rodzaju *Lactobacillus* ludziom w postaci preparatu probiotycznego obniżyło absorpcję aflatoksyny B<sub>1</sub> [42]. Pojawiają się próby zastosowania wyselekcjonowanych kultur bakterii fermentacji mlekowej w procesie słodowania i warzenia piwa celem zahamowania wzrostu pleśni oraz produkcji przez nie mikotoksyn [43]. Obiecujące są wyniki badań Kankaanpää i in. [44] nad zdolnościami szczepu *L. rhamnosus* GG do adhezji do komórek linii Caco-2, które wskazują że wiązanie komórek bakterii z aflatoksyną B<sub>1</sub> skutkuje zmniejszeniem zdolności tych komórek do adherencji do nabłonka jelita. Dzięki temu mikotoksyny zaadsorbowane na powierzchni komórek bakterii mogą zostać usunięte z organizmu. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej zastępują powoli antybiotykowe promotory wzrostu oraz ograniczają kolonizację drobnoustrojów patogennych w jelitach. Wielu naukowców widzi alternatywną metodę poprawy zdrowia ludzi i zwierząt w zastosowaniu preparatów bakterii fermentacji mlekowej [39].

Dotychczasowe badania nad możliwością obniżania adsorpcji aflatoksyn w przewodzie pokarmowym są niejednoznaczne i trudno jest ocenić przyszłą przydatność omawianej grupy drobnoustrojów w tym procesie. Dostępne dane pozwalają jednak pozytywnie ocenić szczepy bakterii fermentacji mlekowej o zdolnościach do dekontaminacji mikotoksyn jako kultury starterowe w procesie kiszenia pasz

i żywności zwiększające jakość fermentowanych produktów.

Mechanizm działania bakterii nie jest jeszcze w pełni poznany. Hamowanie rozwoju bakterii tlenowych, drożdży i pleśni prawdopodobnie jest wynikiem synergicznego działania wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej metabolitów takich jak: bakteriocyny, kwas mlekowy i octowy, nadtlenek wodoru, peroksydaza mleczanowa, lizozym, reuteryna i glikol propylenowy, które hamują rozwój bakterii tlenowych oraz pleśni w tym z rodzaju *Aspergillus* [20, 47]. Jako że kiszonki powstają w procesie spontanicznej fermentacji mlekowej prowadzonej w warunkach beztlenowych [10], stosowanie kultur starterowych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, charakteryzujących się zdolnością do obniżania poziomu aflatoksyn, może się okazać optymalną metodą dekontaminacji skażonej paszy.

Przykładami praktycznego zastosowania mikroorganizmów są biopreparaty szczepów bakterii fermentacji mlekowej przeznaczone do kiszenia pasz (runi łąkowej, kukurydzy), hamujące rozwój pleśni oraz drożdży, poprawiające stabilność tlenową kiszonek [16].

Grupa naukowców z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie opracowała technologię produkcji różnorodnych preparatów bakteryjnych i bakteryjno-enzymatycznych, które poprawiają jakość i trwałość tlenową kiszonek oraz ograniczają do minimum straty ich wartości energetycznej [48], a w ciągu kilku ostatnich lat prowadzone są prace nad opracowaniem preparatów antimikotoksynowych [49].

## 2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie poziomu skażenia pleśniami i aflatoksynami runi łąkowej i kiszonek z niej sporządzonych; jak również określenie wpływu kultury starterowej zawierającej wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej na obniżanie zawartości aflatoksyn i hamowanie rozwoju pleśni w procesie kiszenia.

## 3. Założenia metodyczne

Badania prowadzono w gospodarstwach rolnych na terenie województwa mazowieckiego oraz warmińsko-mazurskiego. We wszystkich gospodarstwach kiszonki sporządzano w postaci balotów o masie około od 500 do 900 kg. Z przewiedniętych zielonek o zawartości suchej masy od 32 do 80% sporządzano kiszonki/sianokiszonki, bez dodatków i z dodatkiem preparatu bakteryjnego. Ruń łąkową przeznaczoną do sporządzenia kiszonek doświadczalnych, przed balotowaniem, spryskiwano roztworem wodnym preparatu bakteryjnego, który składał się z wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej: *L. plantarum* KKP 593 p, *L. plantarum* KKP 788 p, *L. buchneri* KKP 907 p. Dawka preparatu wynosiła 5 g na tonę roślin (o mianie bakterii 5 x 10<sup>9</sup> j.t.k./g). Czas kiszenia zielonki wynosił od 9 do 12 tygodni. Po upływie tego czasu pobierano próbki kiszonek i poddawano analizie fizykochemicznej i mikrobiologicznej.

Ocenę jakości kiszonek i sianokiszonek wykonano na podstawie skali Fliega-Zimmera wg opisu PodkóWKi [50]. Zawartość kwasów organicznych w kiszonkach oznaczono metodami enzymatycznymi przy użyciu testów Boehringer Mannheim, a suchą masę metodą wagową wg normy (PN-ISO 6496:2002). Liczbę pleśni w runi łąkowej, sianoki-

szonkach i kiszonkach oznaczono na pożywcze agarowej z dichloranem i 18% dodatkiem glicerolu (DG 18), zgodnie z normą PN ISO 21527-2: 2009 część 2. Oznaczenia aflatoksyn wykonano metodą immunoenzymatyczną ELISA - testami Ridascreeen, Biopharm AG, według instrukcji producenta przy użyciu fotometru STAT FAX.

#### 4. Wyniki badań

W pierwszym etapie badań oceniono jakość kiszonek/sianokiszonek kontrolnych i doświadczalnych metodą Fliega-Zimmera (tab. 1).

Kiszonki/sianokiszonki kontrolne charakteryzowały się zawartością suchej masy od 32,0 do 78,2% i oceną jakości zadawalającą lub dobrą. Kiszonki/sianokiszonki z dodatkiem preparatu odznaczały się wyższą jakością ocenioną jako bardzo dobra, przy zawartości suchej masy od 33,0 do 77,9%. Pozytywny wpływ preparatu bakteryjnego przejawiał się w każdym z gospodarstw poprawą jakości fizykochemicznej kiszonek.

W następnym etapie badań określono wpływ kultury starterowej preparatu bakteryjnego na hamowanie rozwoju

pleśni w czasie kiszenia oraz oznaczono poziom skażenia runi łąkowej i kiszonek/sianokiszonek aflatoksynami. Runi łąkowa, po przewiednięciu, charakteryzowała się liczbą pleśni od  $3,0 \times 10^4$  j.t.k./g do  $4,0 \times 10^5$  j.t.k./g (tab. 1). W kiszonkach/sianokiszonkach kontrolnych oznaczono liczbę pleśni od  $10^4$  do  $10^2$  j.t.k./g. W czasie kiszenia, pod wpływem działania kultury starterowej bakterii fermentacji mlekowej w kiszonkach doświadczalnych liczba j.t.k. pleśni obniżyła się od 100- do 10 000 razy, w tym w badanych kiszonkach pochodzących z 5 na 10 gospodarstw liczba pleśni obniżyła się do wartości  $10^1$  j.t.k./g.

W badanych gospodarstwach określono także poziom skażenia runi łąkowej aflatoksynami oraz wpływ działania preparatu w czasie kiszenia na obniżenie ich zawartości w suchej masie kiszonek/sianokiszonek.

Zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> w runi łąkowej wynosiła od 3,3 do 19,7 ppb, a suma aflatoksyn (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) od 8,2 do 29,6 ppb (tab. 1). W kiszonkach/sianokiszonkach w procesie kiszenia materiału roślinnego, bez dodatku preparatu, podobnie jak liczba pleśni, obniżeniu uległa także zawartość: aflatoksyny B<sub>1</sub> średnio o około 60% i sumy aflatoksyn średnio o 30%, w stosunku do runi łąkowej.

Tab. 1. Skażenie pleśniami i aflatoksynami runi łąkowej oraz kiszonek/sianokiszonek z runi łąkowej sporządzonych z dodatkiem i bez dodatku preparatu bakteryjnego

Table 1. Molds and aflatoxins contamination of meadow grass and meadow grass silages treated and untreated with bacterial preparation

Nr gospodarstwa No. of farm	Materiał roślinny Plant material	Sucha masa, % Dry matter, %	Liczba j.t.k. pleśni/g kiszonki Number of molds, cfu/ g of silage	Zawartość mikotoksyn w suchej masie, Content of mycotoxins in dry matter, μg/kg (ppb)		Ocena jakości wg skali Fliega – Zimmera Quality according to Flieg-Zimmer scale
				aflatoksyna B <sub>1</sub> aflatoxin B <sub>1</sub>	aflatoksyny B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> aflatoxins B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	
1	runi łąkowa	47,8	$2 \times 10^5$	8,5	15,2	---
	kiszonka kontrolna	46,8	$2 \times 10^3$	4,8	13,4	dobra
	kiszonka doświadczalna	56,9	$2 \times 10^1$	2,0	7,7	bardzo dobra
2	runi łąkowa	43,5	$2 \times 10^5$	18,2	28,6	---
	kiszonka kontrolna	45,0	$2 \times 10^2$	3,7	11,0	dobra
	kiszonka doświadczalna	44,5	$1 \times 10^1$	<1	6,8	bardzo dobra
3	runi łąkowa	73,4	$4 \times 10^5$	19,7	28,9	---
	kiszonka kontrolna	78,2	$2 \times 10^2$	4,8	14,9	dobra
	kiszonka doświadczalna	77,9	$1 \times 10^1$	1,9	8,5	bardzo dobra
4	runi łąkowa	50,2	$3 \times 10^4$	5,2	10,1	---
	kiszonka kontrolna	49,2	$3 \times 10^4$	4,8	16,8	dobra
	kiszonka doświadczalna	56,8	$1 \times 10^2$	<1	6,7	bardzo dobra
5	runi łąkowa	58,7	$1 \times 10^5$	18,6	29,6	---
	kiszonka kontrolna	66,8	$6 \times 10^4$	3,1	12,9	zadawalająca
	kiszonka doświadczalna	60,0	$2 \times 10^3$	1,5	5,9	bardzo dobra
6	runi łąkowa	31,4	$8 \times 10^4$	9,6	18,2	---
	kiszonka kontrolna	32,0	$9 \times 10^4$	4,1	15,8	dobra
	kiszonka doświadczalna	33,0	$2 \times 10^2$	2,0	5,8	bardzo dobra
7	runi łąkowa	47,2	$6 \times 10^4$	9,0	17,8	---
	kiszonka kontrolna	49,7	$6 \times 10^2$	3,4	11,2	dobra
	kiszonka doświadczalna	43,6	$2 \times 10^1$	2,7	9,2	bardzo dobra
8	runi łąkowa	59,7	$8 \times 10^4$	5,6	12,8	---
	kiszonka kontrolna	55,5	$2 \times 10^3$	3,2	11,2	dobra
	kiszonka doświadczalna	54,2	Brak	1,7	6,3	bardzo dobra
9	runi łąkowa	56,7	$6 \times 10^4$	4,2	9,6	---
	kiszonka kontrolna	56,2	$1 \times 10^3$	3,4	9,9	zadawalająca
	kiszonka doświadczalna	45,8	$1 \times 10^2$	1,6	3,1	bardzo dobra
10	runi łąkowa	47,0	$4 \times 10^4$	3,3	8,2	---
	kiszonka kontrolna	46,2	$3 \times 10^3$	2,2	8,8	dobra
	kiszonka doświadczalna	39,6	$3 \times 10^2$	<1	3,0	bardzo dobra

Pod wpływem działania wyselekcjonowanych szczepów bakterii, zawartych w preparacie bakteryjnym poziom toksyn w kiszonkach/sianokiszonkach doświadczalnych obniżył się średnio: aflatoksyny B<sub>1</sub> o 81% i sumy aflatoksyn o 61%, w stosunku do materiału wyjściowego. W czterech gospodarstwach zaobserwowano nawet ponad 90,0% spadku zawartości aflatoksyny B<sub>1</sub>.

Po zakończeniu kiszenia z dodatkiem preparatu bakteryjnego średnia zawartość, w badanych kiszonkach/sianokiszonkach, aflatoksyny B<sub>1</sub> kształtowała się na poziomie 1,6 ppb i sumy aflatoksyn na poziomie 6,0 ppb.

W stosunku do średniego poziomu badanych toksyn w kiszonkach/sianokiszonkach kontrolnych w efekcie działania preparatu nastąpiło obniżenie ich zawartości odpowiednio o 58% i 48%.

## 5. Podsumowanie

Kiszonki z runi łąkowej stanowią często podstawową paszę dla bydła. Skarmianie kiszzonek porażonych pleśniami toksynotwórczymi oraz aflatoksynami może być zagrożeniem dla zdrowia zwierząt, a w następstwie efektu „carry over” ludzi.

Przedstawione wyniki wskazują na istnienie problemu skażenia runi łąkowej pleśniami, które w sprzyjających dla ich rozwoju warunkach temperatury i wilgotności syntetyzują aflatoksyny..

W gospodarstwach doświadczalnych zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> w runi łąkowej wynosiła się od 3,3 do 19,7 ppb, a zawartość sumy aflatoksyn (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) od 8,2 do 29,6 ppb. W czasie procesu kiszenia rozwijające się bakterie fermentacji mlekowej, naturalnie bytujące na roślinach, ograniczały zarówno rozwój pleśni jak i obniżały zawartość badanych aflatoksyn.

Zastosowanie do kiszenia runi łąkowej preparatu zawierającego szczepy bakterii fermentacji mlekowej o szczególnych zdolnościach hamowania rozwoju pleśni toksynotwórczych i obniżania poziomu aflatoksyn spowodowało istotne obniżenie ich zawartości, zarówno w stosunku do poziomu skażenia runi łąkowej jak i skażenia kiszzonek kontrolnych, sporządzonych bez dodatku preparatu.

W przyszłości konieczne, do opracowania i zastosowania kultur starterowych przeznaczonych do detoksykacji pasz, jest prowadzenie badań nad poszukiwaniem nowych aktywnie działających szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, poznawanie mechanizmu ich działania oraz określenie warunków środowiska, w jakich ich wpływ na obniżanie zawartości aflatoksyn do poziomu bezpiecznego dla zdrowia zwierząt i ludzi będzie wysoko efektywny.

## 6. Bibliografia

- [1] Oliveira C.A.F., Bovo F., Corassin C.H., Jager A.V., Reddy K. R.: Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in food stuffs. W: Aflatoxins - recent advances and future prospects, Razzaghi-Abyaneh M. (Ed.) 2013, <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/recent-trends-in-microbiological-decontamination-of-aflatoxins-in-foodstuffs>.
- [2] Chełkowski J.: Mikotoksyny, wytwarzające je grzyby i mikotoksykozy. Wydawnictwo SGGW-AR, 1985.
- [3] Grajewski J.: Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Zagrożenia dla człowieka i zwierząt. Wyd. Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz, 2006.
- [4] IARC International Agency for Research on Cancer- World Health Organization. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. 2002, 82, 171.

- [5] Abbas, H. K.: Aflatoxin and food safety. Boca Raton, Taylor and Francis, 2005.
- [6] Grajewski J., Składanowska B., Drymel W., Szczepaniak K., Twarużek M.: Mikrobiologiczne i mikotoksykologiczne skażenia wybranych surowców i mieszanek pasz treściwych. IV Konferencja Naukowa „Mikotoksyny w żywności i paszach”, 1998, 155-159.
- [7] Chełkowski J.: Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Elsevier, Amsterdam, 1991.
- [8] Park, D.L., Liang, B.: Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. Trends Food Sci. Technol., 1993, 41-334.
- [9] Richard E., Heutte N., Sage L., Pottier D., Bouchart V., Lebailly P., Garon D.: Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. Food Chem. Toxicol., 2007, Vol. 45, 2420-2425.
- [10] Amigot S.L., Fulgueira C.L., Bottai H., Basilico J.C.: New parameters to evaluate forage quality. Postharvest Biol. Technol., 2006, Vol. 41, 215-224.
- [11] Garon D., Richard E., Sage L., Bouchart V., Pottier D., Lebailly P.: Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. J. Appl. Food Chem., 2006, Vol. 54, 3479-3484.
- [12] Elgerbi A.M., Aidoo K. E., Candlish A.A.G., Williams A.G.: Effects of lactic acid bacteria and bifidobacteria on levels of aflatoxin M1 in milk and phosphate bufor. Milchwissenschaft, 2006, Vol. 61(2); 197-199.
- [13] Line, J.E., Brackett R.E.: Factors affecting aflatoxin B1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. J. Food Protection, 1995, Vol. 58(1), 91-94.
- [14] El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B<sub>1</sub>. Food Chem. Toxicol., 1998a, Vol. 36, 321.
- [15] Fazeli, M. R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M.R., Pouragahi S., Vaghari E.: Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. J. Food Protection, 2009, Vol. 72(1), 189-192.
- [16] Magnusson J., Schnürer J.: Antifungal lactic acid bacteria as bio-preservatives. Trends Food Sci. Technol. 2005, Vol. 16, 70-78.
- [17] Boberg A., Jacobson K., Ström K., Schnürer J.: Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. Appl. Environ. Microbiol., 2007, Vol. 73 (17), 5547-5552.
- [18] Kabak B., Dobson A.W., Var I.: Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2006, Vol. 46 (8), 593-612.
- [19] Ogunbanwo S.T., Enitan A.M., Emeya P., Okanlawon B.M.: Influence of lactic acid bacteria on fungal growth and aflatoxin production in ogi, an indigenous fermented food. Adv. Food Sci., 2005, Vol. 27(4), 189-184.
- [20] Zinedine A., Faïd M., Benlemlih M.: In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. Int. J. Agric. Biol., 2005, Vol. 7(1), 67-70.
- [21] Gourama H., Bullerman L. B.: Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J. Food Prot., 1995, Vol. 58, 1249-1256.
- [22] Gourama H., Bullerman L. B.: Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. Int. J. Food Microbiol., 1997, Vol. 34, 131-143.
- [23] Wiseman D. W., Marth E.H.: Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. Mycopathologia, 1981, Vol. 73, 49-56.
- [24] El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. J. Food Sci., 1998b, Vol. 61 (4), 466.
- [25] El-Nezami H., Salminen S., Ahokas J.: Biological control of food carcinogens with use of *Lactobacillus* GG. Nutr. Today. Suppl., 1996, Vol. 31 (6), 41.
- [26] Megalla S.E., Hafez A.H.: Detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> acidogenous yoghurt. Mycopathologia, 1982, 77, 89-91.

- [27] Megalla S.E, Mohran M.A.: Fate of aflatoxin B<sub>1</sub> in fermented dairy products. *Mycopathologia*, 1984, 88, 27-29
- [28] Jeremija Lj., Rašić J.L., Škrinjar M., Markov S.: Decrease of aflatoxin B<sub>1</sub> in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia*, 1991, Vol. 113, 117-119.
- [29] Rašić J.L., Škrinjar M., Markov S.: Decrease of aflatoxin B<sub>1</sub> in yoghurt and acidified milk. *Mycopathologia*, 1996, 113, 117-119.
- [30] Karunaratne A., Wezenberg E., Bullerman L.B.: Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus spp.* *J. Food Prot.*, 1990, Vol. 53, 230-236.
- [31] Shahin A.A.M.: Removal of aflatoxin B<sub>1</sub> from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *Int. J. Agric. Biol.*, 2007, Vol. 9 (1), 71-75.
- [32] Bueno D.J., Casale C.H., Pizzolitto R.P., Salvano M.A. Oliver G.: Physical adsorption of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J. Food Prot.*, 2007, Vol. 70(9), 2148-2154.
- [33] Sauno E., Kameyama M., Nakajima H., Yale K.: Purification and gene cloning of a dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* that catalyzes a reaction involved in aflatoxin biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2008, Vol. 72 (3), 724-734.
- [34] Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva G.: On the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and dairy products, *Food Chem. Toxicol.*, 2009, Vol. 47, 984-991.
- [35] Van Egmond, H.P.: Aflatoxin M<sub>1</sub>: occurrence, toxicity, regulation. *Mycotoxins in dairy products*. Elsevier Applied Science, London and New York, 1989, 11-55.
- [36] Jarczyk A., Bancewicz E.: Mikotoksyny, aktualny problem. *Farmer*, 2006, Vol. 24.
- [37] Kapturowska A.U., Zielińska K.J., Stecka K.M.: Ocena jakości mleka surowego w powiązaniu z jakością kiszonych pasz objętościowych w wybranych gospodarstwach ekologicznych. *J. Res. Appl. Agric. Engng*, 2012, Vol. 57(3), 194-197.
- [38] Corassin C.H., Bovo F., Rosim R.E., Oliveira C.A.F.: Efficiency of *Saccharomyces* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M<sub>1</sub> in UHT skim milk. *Food Control*, 2013, Vol. 31, 80-83.
- [39] Grajewski J.: Możliwości inaktywacji ochratoxyny A w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* u kurcząt. *Wyd. Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz*, 2003.
- [40] El-Nezami H.S., Mykkanen H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B<sub>1</sub> from the chicken duodenum. *J. Food Protection*, 2000, Vol. 63, 549-552.
- [41] Kluczek J. P., Kojder A.: *Mikotoksyny w zarysie*. Wyd. Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy, Bydgoszcz, 2000.
- [42] El-Nezami H.S., Polychronaki N.N., Ma J., Zhu H., Ling W., Salminen E.K., Juvonen R.O., Salminen S.J.: Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern china. *Am. J. Clinical Nutr.*, 2006, Vol. 83, 1199-1203.
- [43] Rouse S., Van Sinderen D.: Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J. Food Protection*, 2008, Vol. 71 (8), 1724-1733.
- [44] Kankaanpää P., Tuomola E., El-Nezami H., Ahokas J., Salminen S. J.: Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in Caco-2 model. *J. Food Protection*, 2000, Vol. 63(3), 412-414.
- [45] Luchesse R.H., Haerigan W.F.: Growth of and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and at different initial pH values. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990, Vol. 69, 512-519.
- [46] Byun J.R., Yoon Y.H.: Binding of aflatoxin G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and B<sub>2</sub> by probiotic *Lactobacillus spp.* *Asian Australasian J. Animal Sci.*, 2003, Vol. 16, (11), 1686-1689, 19.
- [47] Kung L. Jr. et al.: The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 2003, Vol. 86 (1), 336-343.
- [48] Zielińska K., Miecznikowski A.: *Kultury starterowe bakterii fermentacji mlekowej do kisenia pasz - od selekcji szczepów do aplikacji*. Monografia, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa, 2008.
- [49] Zielińska K., Sutarska A., Miecznikowski A., Stecka K., Kupryś M.: *Szczep bakterii Lactobacillus fermentum N*. Patent RP PL 211530. 08.06.2009.
- [50] Podkówka W.: *Post. Nauk Roln.*, 1960, Vol. 3, 55.