

INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA STARTER CULTURES ON OCHRATOXIN A CONTAMINATION OF MAIZE GRAIN ENSILAGES

Summary

Maize grain is a valuable fodder but often contaminated with ochratoxin A, which makes it dangerous for animals, especially for pigs. The influence of synergistic activities of selected lactic acid bacteria strains on ochratoxin A contamination of maize grain silage was evaluated. Ensilages with and without examined strains of lactic acid bacteria were made. The content of ochratoxin A was 75% lower in the ensilage treated with bacteria than in fresh grain and significantly lower than in the control ensilage.

Key words: ochratoxin A, whole maize ensilage, lactic acid bacteria, starter cultures

WPŁYW KULTUR STARTEROWYCH BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ NA OBNIŻENIE SKAŻENIA OCHRATOKSYNĄ A KISZONEGO ZIARNA KUKURYDZY

Streszczenie

Ziarno kukurydzy stanowi wartościową paszę, jednakże jego częste zanieczyszczenie ochratoksyną A stwarza zagrożenie dla zdrowia żywionych nim zwierząt, szczególnie trzody chlewnej. Zbadano wpływ synergicznego działania wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej na skażenie ochratoksyną A kiszzonek z całego ziarna kukurydzy. Wykonano kiszonkę bez i z dodatkiem badanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. W kiszonce z dodatkiem preparatu bakteryjnego zawartość ochratoksyny A była o 75% niższa niż w surowym ziarnie oraz istotnie niższa niż w kiszonce kontrolnej.

Słowa kluczowe: ochratoksyna A, kiszonka z całego ziarna kukurydzy, bakterie fermentacji mlekowej, kultury starterowe

1. Wprowadzenie

Od wielu lat kukurydza stanowi w Polsce jeden z najważniejszych surowców roślinnych stosowanych jako pasza w żywieniu zwierząt w postaci zielonki, kiszonki z całych roślin, kiszonki z kolb (CCM) oraz z ziarna. Kiszone ziarno kukurydzy to wartościowa pasza dla bydła i trzody chlewnej. Ponadto kukurydza została dopuszczona w żywieniu zwierząt w produkcji ekologicznej jako zbożowa pasza roślinna.

Ziarno kukurydzy z powodu wysokiej wilgotności podczas zbioru (30-40%) [1] bardzo często jest porażane przez grzyby pleśniowe wytwarzające mikotoksyny. Rozwijają się one już podczas wegetacji roślin (głównie pleśń z rodzaju *Fusarium*), a także w trakcie przechowywania ziarna. W umiarkowanym klimacie Polski bardzo często wykrywa się obecność ochratoksyny A (OTA) w ziarnie kukurydzy, która produkowana jest przez grzyby pleśniowe z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* [2].

Ochratoksyna A w 1993 roku została uznana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) za kancerogen klasy 2B. OTA wykazuje działanie nefrotoksyczne, a najbardziej wrażliwe na jej obecność są świnię i drób [3]. W Polsce stwierdzono, że ochratoksyna A występuje powszechnie w surowicy krwi trzody chlewnej [4], co jest związane z zanieczyszczeniem OTA pasz stosowanych w żywieniu zwierząt [5, 6]. Rozporządzenie Rady (WE) nr 1804/1999 z dnia 19 lipca 1999 r. w sprawie produkcji ekologicznej produktów rolnych przewiduje, iż pokarm dla drobiu w fazie tuczu powinien zawierać co najmniej 65% zbóż. Powszechne stosowanie ziarna kukurydzy w karmieniu drobiu, a także trzody chlewnej może zatem stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi, wskutek spożywania przez nich produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego

skażonych ochratoksyną A. Ochratoksyna wchłania się bowiem z przewodu pokarmowego i poprzez krew dystrybuowana jest do różnych tkanek i narządów, ulega kumulacji w nerkach, wątrobie, mięśniach oraz tkance tłuszczowej [7].

Ze względu na powszechne występowanie toksyn pleśniowych, w tym ochratoksyny A, oraz ich niekorzystne działanie na organizmy zwierząt i ludzi bardzo ważną jest kontrola występowania mikotoksyn, a także poszukiwanie sposobów na ich eliminację z pasz i żywności.

Znane są różne metody dekontaminacji ochratoksyny A: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Niezależnie od zastosowanej metody, musi ona spełniać podstawowe kryterium, jakim jest brak powstających innych toksycznych związków w wyniku jej zastosowania [8]. Fizyczne i chemiczne metody usuwania OTA nie są w pełni skuteczne, a ponadto dodawane do paszy w ramach tych procedur związki chemiczne mogą wpływać negatywnie na jakość pasz, a także na zdrowie żywionych nimi zwierząt. Z tego powodu coraz większego znaczenia nabierają metody biologiczne, wykorzystujące naturalne zdolności mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn ze środowiska.

Wiele gatunków bakterii i drożdży [9] oraz grzybów pleśniowych [10, 11, 12] wykazuje w badaniach *in vitro* zdolność do degradacji ochratoksyny A w ponad 95%. Przypuszcza się, że proces degradacji ochratoksyny A polega na hydrolizie wiązania peptydowego przez enzym karboksypeptydazę A - egzopeptydazę odcinającą C-końcówce aminokwasy z łańcucha polipeptydowego [13].

Zdolność do enzymatycznej hydrolizy ochratoksyny A wykryto także u bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* [14]. Z uwagi na to, że bakterie fermentacji mlekowej, stosowane w postaci kultur starterowych, mają szerokie zastosowanie w produkcji kiszonych pasz, istnieje

możliwość wykorzystania ich zdolności do obniżania zawartości ochratoksyny A w kiszonkach z ziarna kukurydzy. Zastosowanie w procesie kiszenia ziarna kukurydzy preparatu bakteryjnego, który zawiera odpowiednio dobrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej, stymulujące proces syntezy kwasu mlekowego i octowego oraz ograniczające skażenie ziarna ochratoksyną A, jest sposobem produkcji paszy bezpiecznej dla zdrowia zwierząt.

2. Cel badań

Celem badań było określenie wpływu kultury starterowej złożonej z wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej na stopień obniżenia zawartości ochratoksyny A w kiszonym ziarnie kukurydzy.

3. Założenia metodyczne

Ziarno kukurydzy wykorzystane do badań było zebrane w październiku 2010 roku i pochodziło z gospodarstwa rolnego Agrokompleks leżącego w Polskim Konopacie (woj. kujawsko-pomorskie, powiat świecki). W gospodarstwie tym wykonano kiszonki z całego ziarna kukurydzy po siedmiu dniach od jego zbioru. Ziarno o masie 10 ton zakiszane zostało w foliowych rękawach. Wykonano kiszonkę doświadczalną, do której dodano kulturę starterową bakterii fermentacji mlekowej oraz kiszonkę kontrolną bez dodatku bakterii. Kultura starterowa składała się z trzech szczepów bakterii fermentacji mlekowej: *Lactobacillus buchneri* KKP 907 p; *L. plantarum* S KKP 880 oraz *L. fermentum* N KKP 2020 p. Szczepy te należą do Kolekcji Kultur Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego i w badaniach *in vitro*, w warunkach modelowych wykazywały zdolność do redukcji ochratoksyny A w pożywce hodowlanej [15]. Kultura starterowa zastosowana została w postaci rozpuszczonego w wodzie granulatu, wyprodukowanego opatentowaną metodą opracowaną w Zakładzie Technologii Fermentacji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Koncentracja bakterii w 1 g preparatu wynosiła 1×10^9 jtk., a stosunek masowy szczepów w preparacie 1:1:1. Rozpuszczony granulatu został rozpylony na zakiszany materiał w takiej ilości, aby uzyskać koncentrację bakterii rzędu $4,0 \times 10^5$ jtk* g^{-1} ziarna.

Ziarno kukurydzy w rękawach przechowywane było w warunkach zewnętrznych od października 2010 do maja 2011 roku. Po upływie 7 miesięcy kiszenia z kilku miejsc rękawa pobrano około 1 kilogramowe próby kiszonki, które następnie połączono i wymieszano. Z tak przygotowanej próby pobrano następnie dziesięć 100-gramowych próbek w celu wykonania analiz mikrobiologicznych i fizyko-chemicznych.

W świeżym jak i kiszonym ziarnie kukurydzy oznaczono następujące parametry:

- pH - metodą potencjometryczną,
- sucha masa – wg normy PN-ISO 6496:2002,
- liczba bakterii fermentacji mlekowej – wg normy PN-ISO 15214:2002,
- liczba grzybów pleśniowych – wg normy PN-ISO 7954:1999,
- identyfikacja grzybów pleśniowych – na podstawie obserwacji mikroskopowych oraz wyglądu grzybni powietrznej wyhodowanej na pożywce stałej, opierając się na opisie wg. Fassatiowej [15],

- ochratoksyna A – immunoenzymatyczny test ELISA przy użyciu komercyjnego zestawu firmy r-Biopharm,
- kwasy mlekowy, octowy, masłowy – metoda enzymatyczna przy użyciu komercyjnego zestawu firmy r-Biopharm,
- kwasy propionowy i 1-propanol – metoda chromatografii gazowej z zastosowaniem kolumnienek SP C18 (Supelco) do oczyszczania próbek.

W celu oceny zmian zawartości ochratoksyny A w czasie kiszenia, wykonano dziesięć kiszonek doświadczalnych z całego ziarna kukurydzy w skali laboratoryjnej. Świeże ziarno (to samo jak w doświadczeniu w skali produkcyjnej) o masie 5 kg ubito w foliowych workach, które dodatkowo owinięto jeszcze trzema warstwami folii. Do kiszonek dodano opisany wyżej preparat bakteryjny w postaci roztworu wodnego rozpylonego na zakiszany materiał. Na 1 g kiszonki wprowadzono ok. 4×10^5 jtk. Kiszonki przechowywane były w temperaturze pokojowej, a fermentację mlekową prowadzono przez 3, 5, 7, 10 i 13 tygodni. Po upływie odpowiedniego czasu kiszenia, otwierano po dwie kiszonki i analizowano w nich zawartość ochratoksyny A.

Analiza statystyczna wyników obejmowała analizę wariancji doświadczenia jednoczynnikowego. Szczegółowego porównania średnich i wyodrębnienia grup jednorodnych dokonano, stosując test Tukey'a. Przyjęty poziom istotności wyniósł 0,05. Analizę przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA 8.

4. Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań dokonano mikrobiologicznej oraz fizyko-chemicznej analizy próby ziarna kukurydzy przeznaczonego do doświadczeń (tab. 1).

Tab. 1. Mikrobiologiczna oraz fizyko-chemiczna analiza ziarna kukurydzy

Table 1. Microbiological and physico-chemical analysis of maize grain

Parametry Parameters	Świeże ziarno Fresh grain
Wilgotność (%) / Moisture	35,5
Liczebność grzybów pleśniowych (jtk* g^{-1}) Number of moulds	$4,5 \times 10^5$
Ochratoksyna A (ng* kg^{-1}) Content of ochratoxin A	2200,0

Badane ziarno w momencie zbioru zawierało 35,5% wilgotności. Przy takiej wilgotności ziarna następuje bardzo szybki rozwój mikroflory niepożądaną, czyli bakterii i grzybów pleśniowych. Powinno ono zaraz po omłocie zostać zakonserwowane na przykład poprzez zakiszenie [16]. Wyizolowane i zidentyfikowane w ziarnie grzyby pleśniowe należały do rodzajów: *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Cladosporium sp.* i *Fusarium sp.* Zawartość ochratoksyny A w badanym ziarnie kukurydzy wynosiła 2200 ng*kg^{-1} . Zalecenia Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. (2006/576/WE) wskazują, iż w paszach o zawartości wilgoci wynoszącej 12%, wartość orientacyjna ochratoksyny A nie powinna przekraczać $250 \text{ } \mu\text{g*kg}^{-1}$ w przypadku zbóż i produktów zbożowych przeznaczonych do żywienia zwierząt, przy czym w przypadku mieszanek paszowych pełnoporcjowych i uzupełniających dla świń wartość orientacyjna dla OTA wynosi $50 \text{ } \mu\text{g*kg}^{-1}$, a dla drobiu $100 \text{ } \mu\text{g*kg}^{-1}$.

Kiszonka wykonana z dodatkiem preparatu bakteryjnego charakteryzowała się niższym pH, wyższą zawartością suchej masy, znacznie wyższą zawartością kwasu propionowego i 1-propanolu oraz wyższą zawartością kwasu mlekowego w stosunku do kwasu octowego w porównaniu z kiszonką kontrolną (w kiszonce kontrolnej więcej było kwasu octowego w stosunku do kwasu mlekowego). W obu kiszonkach wzrost grzybów pleśniowych został zahamowany. W kiszonce z dodatkiem preparatu bakteryjnego zawartość ochratoksyny A była niższa niż w kiszonce kontrolnej i wynosiła 550 ng*kg⁻¹, czyli o 75% mniej niż w surowym ziarnie. Analiza wariancji wykazała, iż uzyskane średnie wyników oznaczeń OTA w kiszonce kontrolnej i w kiszonce z dodatkiem bakterii różniły się istotnie statystycznie.

Spadek zawartości ochratoksyny A w kiszonym ziarnie, niezależnie od zastosowania bakteryjnego inokulantu, może wynikać z zahamowania wzrostu grzybów pleśniowych w kwaśnym środowisku kiszonki. Niższa zawartość miko-

toksyny w kiszonce z dodatkiem preparatu bakteryjnego w porównaniu do kiszonki kontrolnej może świadczyć o specyficznej aktywności badanych szczepów wobec ochratoksyny A.

Na rysunku przedstawiono zmiany zawartości ochratoksyny A w kiszonkach z ziarna kukurydzy wykonanych w skali laboratoryjnej. Zawartość ochratoksyny A obniżyła się w czasie fermentacji i po 13 tygodniach kiszenia wynosiła 400 ng*kg⁻¹, czyli była niższa o ponad 80% w stosunku do początkowej zawartości mikotoksyny w ziarnie (2200 ng*kg⁻¹).

Obniżanie zawartości OTA przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jest cechą zależną od szczepu [17], zatem zastosowanie w postaci preparatów do kiszenia, wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach obniżania stężenia ochratoksyny A, jest sposobem zabezpieczenia kiszonego ziarna kukurydzy przed skażeniem.

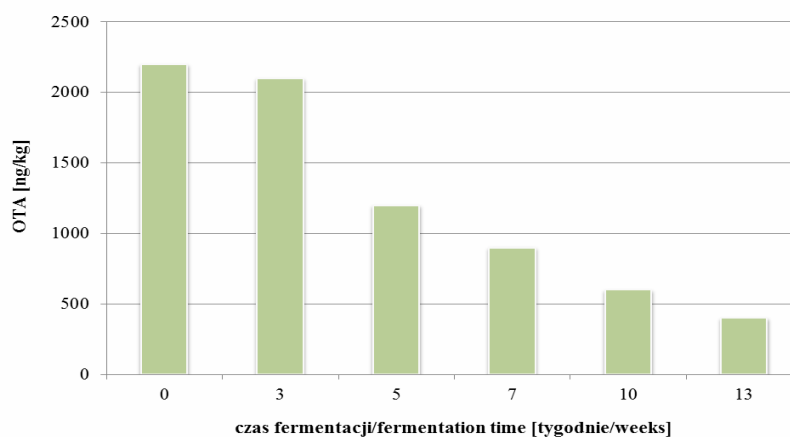
Tab. 2. Charakterystyka mikrobiologiczna oraz fizyko-chemiczna kiszonek z całego ziarna kukurydzy
Table 2. Microbiological and physico-chemical characterization of whole maize grain ensilages

Parametry Parameters	Kiszonka kontrolna Control ensilages	Kiszonka z dodatkiem preparatu bakteryjnego Ensilages with bacterial preparation addition
pH <i>pH</i>	4,9	4,3
Sucha masa (%) <i>Dry matter</i>	65,2	71,3
Kwas mlekowy (g*kg ⁻¹ s.m.) <i>Lactic acid in 1 kg of dry matter</i>	5,6	10,2
Kwas octowy (g*kg ⁻¹ s.m.) <i>Acetic acid in 1 kg of dry matter</i>	10,0	7,2
Kwas masłowy (g*kg ⁻¹ s.m.) <i>Butyric acid in 1 kg of dry matter</i>	n.w.*	n.w.*
1-propanol (g*kg ⁻¹ s.m.) <i>1-propanole in 1 kg of dry matter</i>	n.w.*	1,7
Kwas propionowy (g*kg ⁻¹ s.m.) <i>Propionic acid in 1kg of dry matter</i>	0,7	8,2
Ochratoksyna A (ng*kg ⁻¹) <i>Ochratoxin A</i>	760,0 ^b	550,0 ^a
Liczebność grzybów pleśniowych (jtk*g ⁻¹) <i>Number of moulds</i>	b.w.**	b.w.**

*n.w. - poniżej granicy wykrywalności

**b.w. - brak wzrostu

a,b – grupy jednorodne



Rys. Zmiana zawartości ochratoksyny A w kiszonym ziarnie kukurydzy inokulowanym bakteriami fermentacji mlekowej
Fig. Change of ochratoxin A content in ensilaged maize grain treated with lactic acid bacteria

5. Podsumowanie i wnioski

W wyniku badań określono pozytywny wpływ synergicznego działania następujących szczepów bakterii: *Lactobacillus buchneri* KKP 907 p; *L. plantarum* S KKP 880 oraz *L. fermentum* N KKP 2020 p na poprawę jakości kiszonki z całego ziarna kukurydzy i obniżenie zawartości ochratoksyny A. Na podstawie uzyskanych wyników badań sformułowano następujące wnioski:

1. Pod wpływem synergicznego działania badanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w warunkach laboratoryjnych uzyskano w 13 tygodniu kiszenia obniżenie zawartości ochratoksyny A o 80% jej początkowej zawartości.
2. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia produkcyjnego, w procesie 7-miesięcznego kiszenia ziarna kukurydzy w rękawach foliowych, pod wpływem bakterii fermentacji mlekowej, nastąpiło obniżenie w nim zawartości ochratoksyny A. W czasie kiszenia z zastosowaniem preparatu składającego się ze szczepów bakterii o zdolności do obniżania poziomu ochratoksyny A jej zawartość spadła średnio o 75% w stosunku do zawartości w wyjściowym ziarnie kukurydzy, z którego przygotowano kiszonkę.
3. Zastosowanie wybranych kultur szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus* o zdolnościach antymikotoksynowych wpływa na obniżenie zawartości ochratoksyny A w kiszonym ziarnie kukurydzy w porównaniu do kiszonek uzyskanych bez dodatku kultury bakteryjnej.

6. Bibliografia

- [1] Zielińska K., Miecznikowski A.: Kultury starterowe bakterii fermentacji mlekowej do kiszenia pasz-od selekcji szczepów do aplikacji. Monografia Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, 2008.
- [2] Duarte S., Pena A., Lino C.: A revive on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. Food Microbiology, 2010., 27, 187-198.
- [3] Baranowski A., Richter W. I. F., Grzybowski G.: Wybrane mikotoksyny występujące w paszach gospodarskich. Prace i materiały zootechniczne. Monografie i rozprawy. Jastrzębiec, 2003, 4, 57-77.
- [4] Bancewicz E., Jarczyk A., Jędrzycki R.: Ochratoksyna w surowiczy trzody chlewnej. Biuletyn Naukowy, 2000.
- [5] Jędrzycki R., Bancewicz E.: Występowanie ochratoksyny A w paszach i komponentach paszowych w rejonie Warmii i Mazur. Biuletyn Naukowy, 2000.
- [6] Rosa C., Keller K., Keller L., Gonzales Pereyra M., Pereyra C., Dalcerio A., Cavaglieri L., Lopes C.: Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State. Brazil", Toxicon, 2009, 53, 283-288.
- [7] Grajewski J: Możliwości inaktywacji ochratoksyny A w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* u kurcząt. Wydawnictwo Akademii Bydgoskiej im. Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz, 2003.
- [8] Śliżewska K.: Najlepsze metody walki ze skutkami działania mikotoksyn. Hodowca Drobiu, 2010, 4/10, 20-24.
- [9] Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S.: Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46, 1398-1407.
- [10] Abrunhosa L., Santos L., Venancio A.: Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzymes of *Aspergillus niger*. Food Biotechnology, 2006, Vol. 20, 231-242.
- [11] Varga J., Peteri Z., Tabori K., Teren J., Vágvölgyi C.: Degradation of ochratoxin and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates", International Journal of Food Microbiology, 2005, vol. 99, 321-328.
- [12] Péteri Z., Téren J., Vágvölgyi C., Varga J.: Ochratoxin degradation and adsorption by astaxanthin-producing Yeasts. Food Microbiology (May), 2007.
- [13] Stander M., Henke E., Bornscheuer U., Steyn P.: Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48 (11), 5736-5739.
- [14] Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S.: Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46, 1398-1407.
- [15] Kapturowska A., Stecka K., Zielińska K., Kupryś M.: Ocena zdolności szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do obniżania zawartości ochratoksyny A w warunkach modelowych". Monografia „Wielokierunkowość Badań w Rolnictwie i Leśnictwie", red. Barbara Wiśniowska-Kielian, Wyd. UR w Krakowie, 2010, t. 1, 107-112.
- [16] Fassatiou O.: Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1983.
- [17] Piotrowska M., Żakowska Z.: The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria. Polish Journal of Microbiology, 2005, 54, 279-286.