

# Wiązanie mykotoksyn przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* *in vitro* oraz *in vivo*

ANNA BZDUCHA-WRÓBEL, MAŁGORZATA GNIEWOSZ, ANNA CHLEBOWSKA-ŚMIGIEL

Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,  
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

Otrzymano 30.05.2014

Zaakceptowano 03.10.2014

Bzducha-Wróbel A., Gniewosz M., Chlebowska-Śmigiel A.

## *In vitro* and *in vivo* mycotoxin binding through the bacteria of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species

### Summary

The work presents an analysis of the data from the literature related to the ability of mycotoxin binding by probiotic and potentially probiotic bacteria. The process of mould toxin adsorption is documented mostly for the bacteria of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus. The bacterial cell wall components play a crucial role in this process. Attention was paid on the factors that influence the efficiency of mycotoxin adsorption to bacterial cells. Along with the differences in the bacterial cell wall building and structure, also the kind and number of the microorganisms' cells used for adsorption, the pH, temperature, as well as the preliminary preparation of the biomass were discussed. The results of *in vivo* mycotoxin binding by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were presented, which confirm the ability of mentioned bacteria to adsorb toxins also in the conditions of animals' alimentary track.

**Keywords:** probiotics, micotoxins binding, cell wall components

Probiotyki znane są ze swojego dobroczynnego wpływu na organizm człowieka. Ich prozdrowotne działanie i rola w nim poszczególnych składników komórkowych są ciągle przedmiotem badań. Wśród mechanizmów, dzięki którym wpływają korzystnie na organizm gospodarza, wymieniana jest zdolność do adhezji i agregacji czy produkcji substancji przeciwbakteryjnych, takich jak: bakteriocyny, nadtlenek wodoru, kwasy organiczne. Ważny jest też wpływ bakterii probiotycznych na układ immunologiczny gospodarza (34, 41, 49). Działanie przeciwkancerogenne i przeciwmutagenne wiązane jest z właściwościami detoksykacyjnymi (24, 27). Aktywność przeciwnowotworowa może polegać na wiązaniu lub degradacji prokancerogenów lub kancerogenów, produkcji antymutagennych związków chemicznych, modulacji prokancerogennych enzymów w jelicie oraz supresji nowotworów przez aktywację odpowiedzi immunologicznej (6, 49). Potwierdzana jest możliwość wiązania przez bakterie probiotyczne szkodliwych substancji, takich jak mykotoksyny. Celem niniejszej pracy była analiza dostępnych danych literaturowych dotyczących zdolności wiązania toksycznych metabolitów pleśni przez bakterie uznane za probiotyczne i potencjalnie probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus*

i *Bifidobacterium*. Szczególną uwagę poświęcono komponentom ściany komórkowej omawianych bakterii, odgrywających zasadniczą rolę w mechanizmie detoksykacji. Odniesiono się zarówno do modeli wiązania mykotoksyn przez ww. mikroorganizmy w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, ze wskazaniem na możliwą pozytywną rolę probiotyków w zapobieganiu toksycznemu działaniu mykotoksyn na organizmy żywe.

### Charakterystyka wybranych mykotoksyn

Mykotoksyny definiowane są jako wtórne metabolity pleśni. Szacuje się, że spośród znanych obecnie ok. 1100 gatunków pleśni około 360 wytwarza toksyny. Działanie tych substancji może być fitotoksyczne, antybiotyczne lub zootoksyczne. Do najdokładniej poznanych mykotoksyn szkodliwych dla ludzi i zwierząt zaliczane są: aflatoksyny ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  i  $G_2$ ), ochratoksyna A, zearalenon, patulina, fumonizyny oraz trichoteceny, w tym m.in. deoksynivalenol, toksyna T2 oraz HT-2 (7). Głównym ograniczeniem poznawczym badań nad mykotoksynami jest nadal brak odpowiednich metod analitycznych.

Grzyby toksynotwórcze mogą rozwijać się na różnych rodzajach płodów rolnych, a przez to również

w żywności i paszach. Żywność pochodzenia zwierzęcego także może stanowić źródło mykotoksyn ze względu na kumulowanie się niektórych, np. ochratoksyn A czy aflatoksyn B<sub>1</sub>, w jajach i mięsie bądź przechodzeniu toksycznych metabolitów aflatoksyn do mleka (7).

Aflatoksyny są związkami difuranokumarynowymi, rozpuszczalnymi w wodzie i opornymi na wysoką temperaturę (23, 47, 57). Syntezowane są głównie przez gatunki pleśni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*. Stanowią zanieczyszczenie przede wszystkim zbóż, orzeszków ziemnych, nasion bawełny, przypraw, suszonych owoców. Aflatoksyna B<sub>1</sub> uważana jest za najbardziej toksyczną spośród wszystkich aflatoksyn i odpowiada za nowotworzenie. Wpisana została na listę I Grupy substancji kancerogennych (44, 53). Znane jest działanie mutagenne, teratogenne i immunosupresyjne aflatoksyn. Cytochrom P450 w komórkach wątroby i innych tkanek odpowiada za metabolizm aflatoksyn i ich przekształcanie m.in. do pochodnych epoksydowych, np.: AFM1, AFQ1, i AFP1. Epoksydowe pochodne aflatoksyn B<sub>1</sub> wiążą się z białkami krwi i wątroby oraz z DNA. Oddziałując z cząsteczkami zasady guaninowej w DNA, doprowadzają do pęknięcia nici tego kwasu.

Ochratoksyny A, B i C to pochodne izokumaryny. Ochratoksyna A jest pentaketydem – pochodnym dihydrokumaryny połączonym z β-fenyloalaniną. Ochratoksyna B to dechlorowany analog ochratoksyny A, podczas gdy ochratoksyna C jest jej estrem etylowym. Substancje te słabo rozpuszczają się w wodzie. Wytwarzane są przez kilka gatunków pleśni z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium*, m.in.: *A. ochraceus*, *A. melles*, *A. niger* oraz *Penicillium verrucosum*, *P. commune* czy *P. purpurescens*. Zanieczyszczają głównie rośliny strączkowe, winogrona, rodzyunki, wino, przyprawy, ziarna kawy, a także surowce i produkty pochodzenia zwierzęcego, np. mleko krowie, wieprzowinę, wątrobę (32, 44). Za najbardziej toksyczną spośród ochratoksyn uznaje się ochratoksynę A (OTA). Podlega wchłanianiu w żołądku i jelicie cienkim. Wykazuje powinowactwo do albumin surowicy krwi, stąd może być obecna w żywności pochodzenia zwierzęcego. W organizmie przenoszona zwykle przez krew trafia do nerek, w mniejszym stopniu do wątroby, mięśni i tkanki tłuszczowej. OTA działa nefrotoksycznie, immunosupresyjnie, kancerogennie oraz teratogennie (1, 7).

Patulina jest dwupierścieniowym laktone rozpuszczalnym w wodzie. Charakteryzuje się niestabilnością w wysokim pH i opornością na działanie wysokich temperatur oraz środowisko kwaśne. Wykazuje wysokie powinowactwo do grup -SH, przez co może blokować wiele enzymów. Wytwarzają ją grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* oraz gatunek *Byssochlamys fulva*. Patuliną zanieczyszczono są głównie jabłka z mokrą zgnilizną i przetwory z nich powstające (15). Może uszkadzać wątrobę, działać kancerogennie i teratogennie.

Pleśnie *Fusarium*, np.: *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, wytwarzają toksyny fuzaryjne, do których zaliczamy m.in. trichoteceny, zearalenon i fumonizyny. Do trichotecenów należą m.in.: toksyna T-2, toksyna HT-2, diacetoksyirpenol i neosolaniol, deoksyniwalenol i jego pochodne: niwalenol i fuzarynę X. Produkowane są na roślinach zbożowych, takich jak pszenica, owies, kukurydza (7).

Zearalenon, wykazujący działanie estrogenne, określany jest mianem niesterydowego estrogeny. Zwany jest również toksyną F-2. Jest nierozpuszczalny w wodzie i termolabilny. Ulega metabolizmowi w wątrobie do α-zearalenolu. Produkowany jest na roślinach zbożowych, motylkowych przez *Fusarium graminearum*. U roślin wywołuje zaburzenia procesu generatywnego, a u zwierząt potrafi uszkadzać narządy rozrodcze i powodować zakłócenia reprodukcyjne. Działa ponadto genotoksycznie (1).

Deoksyniwalenol (DON) to tetracykliczny seskwiterpen, posiadający dwie reaktywne grupy: sprzężoną grupę ketonową i epoksydową. Deoksyniwalenol w komórkach wiąże się z podjednostką rybosomu (60S), co skutkuje zahamowaniem translacji. Związek ten ma duży wpływ na system immunologiczny i powoduje silne objawy zatrucia ze strony przewodu pokarmowego (55).

Fumonizyny stanowią główne zanieczyszczenia pasz kukurydzianych, ale wykrywane są również w mleku, bowiem przenikają do płynów ustrojowych. Produkowane są głównie przez *Fusarium verticillioides*, *F. moniliforme* i *F. proliferatum*. Są strukturalnie podobne do sfingolipidów, przez co uszkadzają szlak biosyntezy sfingozyny – składnika mózgu. Działają neurotoksycznie. U wielu zwierząt powodują uszkodzenia wątroby, a u pewnych gatunków działają wybiórczo w stosunku do narządu, np.: uszkadzają serce świń, a nerki owiec i szczurów (2).

W krajach Unii Europejskiej wymagania dotyczące maksymalnego dopuszczalnego poziomu zanieczyszczeń określonych grup towarowych aflatoksynami, ochratoksyną A, deoksyniwalenolem, zearalenonem, patuliną, fumonizyną B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> oraz toksynami T2 i HT-2 określa Rozporządzenie Komisji UE nr 1881 z 2006 r. Narażenie ludzi i zwierząt na mykotoksyny związane jest przede wszystkim z pobraniem tych substancji drogą pokarmową, co może prowadzić do przewlekłego zatrucia organizmu lub bardzo rzadko do zatrucia ostrego. Zanieczyszczenie żywności i pasz mykotoksynami to problem globalny. Według Shetty i Jespersen (52), u ponad 98% przebadanej ludności krajów wschodnioafrykańskich stwierdzono połączenia aflatoksyny z DNA, jednocześnie częste skażenia aflatoksynami potwierdzone są w Chinach, Indiach, Brazylii czy niektórych stanach USA (7). Skażenie mykotoksynami żywności i pasz stanowi duży problem również w krajach UE, czego potwierdzeniem jest liczba powiadomień alarmowych w systemie wczesnego ostrzegania o niebezpiecznej żywności

i paszach (RASFF). Analiza ilościowego wykazu zgłoszeń, dotyczących wykrycia mykotoksyn w żywności i paszach do systemu RASFF w krajach UE w latach 2003-2012, przy spadkowej tendencji liczby zgłoszeń, potwierdza wysoki odsetek alertów. W 2012 r. na ogólną liczbę 3432 zgłoszeń notyfikacyjnych przekazanych do RASFF, ok. 326 dotyczyło pasz, w tym ok. 24% (79 zgłoszeń) zanieczyszczenia ich mykotoksynami. Najczęstszą przyczyną skażeń były aflatoksyny (48).

Mykotoksyny są odporne na większość czynników fizykochemicznych, dlatego całkowita dekontaminacja skażenia tymi substancjami jest praktycznie niemożliwa. Tradycyjne metody obniżania zawartości mykotoksyn w surowcach polegają np. na, nie zawsze skutecznej, inaktywacji termicznej. Stosuje się także promieniowanie UV,  $\gamma$  oraz mikrofalowe (27). Możliwa jest ponadto immobilizacja mykotoksyn na adsorbentach z minerałów zeolitowych, glinokrzemianów czy węgla aktywnego. Chemiczne metody zmniejszenia poziomu mykotoksyn polegają na traktowaniu surowców związkami amonowymi, wodorosiarczynowymi lub ozonizacji czy ekstrakcji mykotoksyn rozpuszczalnikami organicznymi. Metody chemiczne nie są dozwolone do stosowania w żywności. Alternatywnym rozwiązaniem dla powyższych metod oczyszczania może być zastosowanie probiotyków jako biologicznych adsorbentów. Ponieważ toksyny pleśni wciąż stanowią powszechne zanieczyszczenie surowców i produktów pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego, rola probiotyków w ich detoksyfikacji wydaje się interesująca. Najlepszą perspektywą w tym przypadku może być spożywanie probiotyków lub odpowiednich izolatów ścian komórkowych z dietą czy dodawanie bakterii mlekowych do pasz jako sposób na ograniczanie absorpcji, a przez to dostępności mykotoksyn podczas pasażu treści pokarmowej w jelitach (27, 45, 54, 60). Mikroorganizmy probiotyczne zdolne są do wiązania wielu mykotoksyn. Proces wiązania mykotoksyn przez bakterie probiotyczne, na przykładzie aflatoksyn, ochratoksyn, toksyn fuzaryjnych oraz patuliny, omówiony zostanie w dalszej części artykułu.

Za wiązanie, a tym samym inaktywację toksyn pleśniowych przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, odpowiadają składowe ich ściany komórkowej (26, 28). W jej skład wchodzi różne polisacharydy, w większości związane kowalencyjnie z peptydoglikanem, oraz białka (4, 9, 10, 27, 50). Do polisacharydów ściany bakterii Gram-dodatnich zaliczane są kwasy: tejchojowe, lipotejchojowe, tejchuronowe oraz tzw. polisacharydy neutralne (kowalencyjnie związane z mureiną składniki otoczek, luźno związane ze ścianą śluzu oraz egzopolisacharydy wydzielane do środowiska) (50, 51).

Kwasy tejchojowe i lipotejchojowe to polimery anionowe (fosforany poliglicerolu lub polirybitolu) o zróżnicowanej strukturze. Mogą być to również polimery glikozylowanych fosforanów polioli, podstawionych glukozą i/lub estryfikowanych aminokwasami

(4, 10). Występujące u różnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* mogą różnić się składem cukrów oraz liczbą reszt fosforowych (51). Omawiane polimery charakteryzują się silnymi właściwościami polielektrolitycznymi, co wynika z obecności kwasowych grup fosforanowych (10). W cząsteczce kwasów tejchuronowych, nie zawierających reszt fosforanowych, występują kwasowe pochodne cukrów (kwasy uronowe lub glukuronowe), warunkujące ładunek ujemny. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mogą wytwarzać kwasy tejchojowe i tejchuronowe jednocześnie bądź zawierać w ścianie tylko jeden ich rodzaj (9, 51). Nie każdy szczep wytwarza w ścianie kwasy lipotejchojowe (51). Wszystkie omówione polimery odpowiadają za hydrofobowość ściany, a ze względu na ładunek cząsteczki mogą uczestniczyć w oddziaływaniach międzycząsteczkowych (9, 27).

W strukturze peptydoglikanu występują krótkie peptydy łączące łańcuchy polisacharydowe mureiny w sieć (10, 28). Bakterie fermentacji mlekowej mogą charakteryzować się odmienną sekwencją aminokwasów lub też zawierać zupełnie inne aminokwasy w peptydach ściany, co ma wpływ na zdolność wiązania mykotoksyn (39, 51). W miejscu lizyny może występować ornityna (np. u *Lactobacillus fermentum*) bądź kwas diaminomasłowy. W przypadku bakterii *L. casei* i *L. plantarum* końcowy aminokwas D-alanina zastąpiony jest przez D-mleczan. Długość mostków peptydowych, jak i łańcuchów cukrowych również może być zróżnicowana (28). Możliwe są modyfikacje monomerów N-acetyloglukozoaminy lub kwasu N-acetylmuraminowego w peptydoglikanie (usunięcie grupy acetylowej, 6-O-acetylacja kwasu N-acetylmuraminowego, zastąpienie węgla C6 w kwasie N-acetylmuraminowym kwasem tejchojowym lub tejchuronowym) (51).

Ściana bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* zbudowana jest z kwasu muraminowego, N-acetylo-D-glukozoaminy oraz ornityny, kwasu asparaginowego, glutaminowego, alaniny i seryny (aminokwasów budujących krótkie peptydy) występujących w stosunku: 1 : 1 : 1 : 1 : 3 : 2 : 1 (10). Ze ścianą bifidobakterii związane są egzopolisacharydy wykazujące charakter heteropolisacharydów złożonych z galaktozy, glukozy i ramnozy (10, 37, 58). Stwierdzono międzyszczepowe zróżnicowanie zawartości neutralnych polisacharydów ściany oraz reszt fosforowych u omawianych bakterii (20).

Na powierzchni ściany bakterii Gram-dodatnich zlokalizowane są różne białka. Są to m.in. białka adhezyjne, wiążące z nabłonkiem i śluzem jelitowym, białka piliny oddziałujące z komórkami gospodarza i inne (4). Najbardziej zewnętrzną warstwą ściany bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest tzw. warstwa S zbudowana z białek lub glikoprotein (4, 46). Białka warstwy S zbudowane są najczęściej z aminokwasów hydrofobowych, aminokwasów kwasowych (kwas

asparaginowy, glutaminowy, lizyna), przy jednoczesnej niewielkiej zawartości aminokwasów siarkowych (46). Wytwarzanie białek warstwy S jest zależne od warunków wzrostu bakterii, tj. temperatury, pH, składu podłoża hodowlanego i stresu oksydacyjnego (31, 46).

Ze ścianą bakterii z rodzaju *Lactobacillus* mogą być kowalencyjnie lub niekowalencyjnie związane egzopolisacharydy o neutralnym lub kwaśnym charakterze i zróżnicowanym składzie (glukoza, galaktoza, ramnoza, N-acetyloglukozoamina, N-acetylogalakozoamina, reszty kwasu glukuronowego, pirogronowego, grupy fosforowe, acetylowe i inne (51). Ze względu na ich występowanie na powierzchni komórki w znaczących ilościach, mogą istotnie wpływać na właściwości komórki, np. hydrofobowość (4).

### **Rola składników ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w wiązaniu mykotoksyn**

Wykazano, że mechanizmem odpowiedzialnym za eliminację zearalenonu i jego pochodnej  $\alpha$ -zearalenonu przez różne szczepy bakterii *L. rhamnosus* była adsorpcja toksyn do ściany komórkowej bakterii, a nie absorpcja do wnętrza komórki (12).

Różnice w organizacji budowy strukturalnej ściany bakterii probiotycznych i jej składzie chemicznym mogą wpływać na wydajność wiązania mykotoksyn przez te mikroorganizmy (9, 27, 39, 43). Omawiana struktura powierzchniowa zawiera wiele miejsc swoistego wiązania (m.in. grupy OH polisacharydów, grupy karboksylowe i aminowe aminokwasów), które mogą wchodzić w interakcje międzycząsteczkowe (16).

W pracy Lahtinen i wsp. (33) oceniano zdolność żywych komórek *L. rhamnosus* GG, izolatów ściany komórkowej zawierających peptydoglikan oraz egzopolisacharydów tego szczepu do wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub>. Stwierdzono, że polimery zewnątrzkomórkowe oraz białka powierzchniowe nie wiązały aflatoksyny z roztworu doświadczonego, podczas gdy peptydoglikan adsorbował ją na poziomie 81%. Na podstawie wyników zespołu Niderkorn i wsp. (39) wskazano, że fumonizyny także podlegały wiązaniu do peptydoglikanu, nie zaś do powierzchniowych białek, lipidów czy polisacharydów ściany bakterii *L. paraplantarum* i *L. lactis* subsp. *cremoris* (szczep dziki i mutant). Stwierdzono, że mutant *L. lactis*, z defektem wytwarzania kwasów lipotejchojowych, wiązał znacznie więcej toksyny w porównaniu z jego dzikim odpowiednikiem. Obecność lub brak egzopolisacharydów pozostawała bez wpływu na stopień wiązania badanych substancji toksycznych. Podobną zależność potwierdzono w odniesieniu do gatunków *L. reuterii* i *L. casei* Shiota (27).

Mutanty *L. lactis* z zaburzonym działaniem transpeptydaz, skutkującym zmianą struktury peptydoglikanu ściany komórkowej, wiązały toksynę mniej wydajnie (33). Również traktowanie biomasy *L. reuterii* i *L. casei* Shiota polikationem B i polimiksyną B

obniżało wydajność wiązania toksyny, podobnie jak deficyt zawartości kwasów tejchojowych w ścianie bakterii kwasu mlekowego (27). Wysoką zdolność wiązania zachowały izolaty ścian komórkowych. Wyniki te wskazują, że poza mureiną, również mające ładunek ujemny kwasy tejchojowe zwiększały adsorpcję aflatoksyny. Haskard i wsp. (22) podają, że w mechanizmie wiązania mykotoksyn znaczące są wiązania niekowalencyjne, m.in. wiązania wodorowe, siły van der Waalsa oraz oddziaływania hydrofobowe.

### **Czynniki wpływające na skuteczność i stopień wiązania mykotoksyn *in vitro* przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium***

Skuteczność wiązania mykotoksyn przez bakterie zależy od wielu czynników, w tym od szczepu, liczebności bakterii, stężenia mykotoksyny, temperatury, pH, czasu inkubacji czy sposobu przygotowania biomasy komórkowej.

### **Szczep bakterii a skuteczność wiązania mykotoksyn**

W grupie szczepów *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus rhamnosus* GG i LC-705, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 oraz *Lactobacillus casei* Shiota) testowanych przez El-Nezami i wsp. (11) aflatoksynę B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) z roztworu najskuteczniej usuwały szczepy *Lactobacillus rhamnosus* GG i LC-705 (~80% AFB<sub>1</sub>). Pozostałe wiązały jedynie od 20-50% AFB<sub>1</sub>. W badaniach Čvek i wsp. (8) z dwóch przebadanych szczepów (*Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) i *L. plantarum* A1) skuteczniejszy w wiązaniu zearalenonu okazał się *Lactobacillus rhamnosus* GG (8). Byun i Yoon (5) badali zdolność wiązania aflatoksyn G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> i B<sub>2</sub> przez 13 szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. Poziom wiązania aflatoksyny G<sub>1</sub> wahał się w granicach 33-53%. Najefektywniejszymi adsorbentami okazały się bakterie *L. acidophilus* CU 028 i *L. brevis* CU 06, usuwające z roztworu ok. 50% mykotoksyny. Aflatoksyna G<sub>2</sub> była wiązana za poziomie 46-68%, przy czym najwięcej usuwały jej szczepy *L. acidophilus* CU 028 (68%) i *L. casei* YIT 9018 (57%). Wszystkie gatunki z rodzaju *Lactobacillus* eliminowały od 38% do 56% początkowej zawartości aflatoksyny B<sub>2</sub>. Najbardziej wydajne były pod tym względem *L. acidophilus* CU 028 (56%) oraz *L. helveticus* CU 631 (53%). Z kolei Kabak i Var (30) podają, że bakterie *L. acidophilus* NCC 68 były nieskuteczne w adsorpcji aflatoksyny M<sub>1</sub>.

Spośród 26 szczepów bakterii badanych przez Niderkorn i wsp. (38) trzy różne szczepy *Lactococcus lactis* eliminowały całkowicie obecność fumonizyny B<sub>2</sub>, podczas gdy *Lactobacillus rhamnosus* wiązał 55% deoksynivalenolu.

Fuchs i wsp. (15) przetestowali 30 szczepów bakterii pod względem skuteczności wiązania ochratoksyny A. Najefektywniejszy okazał się *L. acidophilus* VM20, wiążący 97% toksyny.

Peltonen i wsp. (43) badali wiązanie aflatoksyny B<sub>1</sub> przez bakterie *B. lactis* (E-94508, CSCC 5094, CSCC 1906) oraz *B. longum* CSCC 5304 i *B. animalis* CSCC 1941, natomiast Oatley i wsp. (40) przez szczepy *Bifidobacterium* spp. Bf6, *B. adolescentis* 14, *B. bifidum* BGN4, *B. spp.* CH4, *B. longum* JR20 i *B. spp.* JO3. Badane bakterie wiązały między 18% a 49% początkowej zawartości mykotoksyny. Najskuteczniejsze okazały się *B. lactis* CSCC 1906, *B. animalis* CSCC 1941 i *B. bifidum* BGN4. Wyniki prac Kabak i Var (30) potwierdziły wydajną adsorpcję aflatoksyny M<sub>1</sub> do komórek *B. bifidum* Bb13. Bakterie *B. animalis* VM12 wiązały najefektywniej paulinę, adsorbując 82% toksyny (15).

Kabak i Ozbej (29) sugerują, że zróżnicowanie międzyszczepowe w zdolności wiązania aflatoksyn przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium* wynika albo z występowania kompletnie innych miejsc wiązania toksyn w ścianie komórek szczepów, albo, co bardziej prawdopodobne, występowania tylko niewielkich różnic w budowie tych samych miejsc wiążących. Wiązanie aflatoksyn do komórek bakterii wynika przede wszystkim z interakcji hydrofobowych, zatem hydrofobowość powierzchni komórek może determinować wiązanie tych substancji (40).

Minimalna liczba bakterii z rodzaju *Lactobacillus* efektywnie wiążąca aflatoksynę B<sub>1</sub>, fumonizyny (B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>), deoksyniwalenol (DON) i zearalenon (ZEN) była na poziomie od ok.  $1 \times 10^9$  jtk/cm<sup>3</sup> do ok.  $2 \times 10^{11}$  jtk/cm<sup>3</sup> (11, 13, 15, 38). Stopień wiązania toksyny wzrósł z 20% do 75%, odpowiednio, po zwiększeniu koncentracji komórek z  $10^8$  jtk/cm<sup>3</sup> do  $10^{10}$  jtk/cm<sup>3</sup> (38). Čvek i wsp. (8) odnotowali natomiast ok. 99% stopień adsorpcji zearalenonu przy liczbie komórek *L. plantarum* A1 wynoszącej  $10^8$  jtk/cm<sup>3</sup>, a przy stężeniu  $10^4$  jtk/cm<sup>3</sup> ok. 95%. W przypadku *L. rhamnosus* GG było to, odpowiednio, ok. 85% i ok. 71%.

Wyniki Kabak i Var (30) wskazują, że najwięcej aflatoksyny ulegało związaniu, gdy liczebność *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* oraz dwóch szczepów *B. bifidum* sięgała  $10^8$  jtk/cm<sup>3</sup>. Przy koncentracji  $10^7$  jtk/cm<sup>3</sup> wydajność wiązania znacząco malała. Bakterie *B. lactis* (szczepy E-94508, CSCC 5094, CSCC 1906) oraz *B. longum* CSCC 5304 i *B. animalis* CSCC 1941 wiązały aflatoksynę B<sub>1</sub> z wydajnością 18-49% przy stężeniu komórek  $10^{10}$ /cm<sup>3</sup> (43).

### Rodzaj mykotoksyny i jej stężenie a skuteczność wiązania toksyn pleśniowych

W badaniach Fuchs i wsp. (15) odnotowano, że przy stężeniu patuliny 100 µg/cm<sup>3</sup> wiązanie toksyny zachodziło z niższą wydajnością w porównaniu z dawką 50 µg/cm<sup>3</sup>. Odwrotną zależność stwierdzono w przypadku ochratoksyny A oraz aflatoksyny B<sub>1</sub> (11, 15, 34). Zaobserwowano również, że wyższe stężenie aflatoksyny w roztworze utrudniało desorpcję cząstek toksyny od powierzchni komórek bakterii (34).

Natomiast wg Kabak i Var (30) oraz Kabak i Ozbej (29) stężenie aflatoksyn M<sub>1</sub> i B<sub>1</sub> nie wpływało na skuteczność wiązania tych substancji przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, niezależnie od matrycy (bufor, mleko, surowce roślinne). Przykładowo, bakterie *L. acidophilus* NCFM 150b ograniczały dostępność aflatoksyny B<sub>1</sub> na poziomie 34,6%, 34,1% i 33,5% z orzechów ziemnych zanieczyszczonych, odpowiednio, 1,9, 4,8 i 9,7 mg toksyny/kg (29).

Biodostępność aflatoksyn (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub>) określano w różnych produktach żywnościowych zanieczyszczonych tymi toksynami (29). Sprawdzano stopień ograniczania absorpcji toksyny przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w układzie modelowym *in vitro* symulującym etapy trawienia w przewodzie pokarmowym (jama ustna, żołądek i jelito cienkie). Obecność bakterii *B. longum*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium* szczep 420, *L. acidophilus* NCFM 150b i *L. casei* Shirota przyczyniała się do redukcji dostępności aflatoksyn. Najskuteczniej ograniczały absorpcję toksyny bakterie *L. acidophilus* NCFM 150b (redukcja rzędu ok. 30-36%), a najslabiej szczep *L. casei* Shirota (ok. 18-25%). W tym przypadku biodostępność toksyny była zależna od rodzaju zanieczyszczonej matrycy. Przykładowo, w kukurydzy odnotowano najslabszą adsorpcję aflatoksyn do komórek, a więc najwyższą jej biodostępność. Wydajniejsze wiązanie toksyny do komórek bakterii zachodziło natomiast m.in. z orzechów ziemnych, pistacji, orzechów laskowych i suszonych fig.

Wykazano, że fumonizyna B<sub>2</sub> była wiązana skuteczniej w porównaniu do fumonizyny B<sub>1</sub>, co można tłumaczyć występowaniem dodatkowej grupy hydroksylowej w cząsteczce tej drugiej. Wysunięto przypuszczenie, że grupy hydroksylowe w cząsteczce mykotoksyny nie biorą udziału w jej wiązaniu do powierzchni bakterii lub wpływają negatywnie na strukturę przestrzenną całej cząsteczki, stanowiąc zawadę przestrzenną (39). Zdolność wiązania fumonizyny o zablokowanej chemicznie grupie aminowej sugeruje, że grupa ta nie jest zaangażowana w wiązanie toksyny, w przeciwieństwie do fragmentów kwasu propano-1,2,3-trikarboksylowego w cząsteczce toksyny (39).

W badaniach Yiannikouris i wsp. (56) stwierdzono, że wiązanie jednej cząsteczki mykotoksyny do komórek mikroorganizmów pomaga w związaniu kolejnych, co wynikało ze zjawiska kooperacji i zachodzących interakcji międzycząsteczkowych. Cytowane badania prowadzono na drożdżach, ale podobny mechanizm może występować także podczas wiązania toksyn ze składnikami ścian bakterii. Potwierdza to, że przestrzenna budowa ściany komórkowej mikroorganizmów jest bardzo ważna w adsorpcji toksyny. W procesie adsorpcji ważną rolę odgrywają również: masa molowa, stereochemia cząsteczki toksyny oraz właściwości hydrofobowe i hydrofilowe.

### Wpływ wybranych czynników środowiskowych (temperatury, pH, siły jonowej) na stopień wiązania mykotoksyn i stabilność kompleksów

Stopień wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> przez bakterie *L. rhamnosus* (GG oraz LC-705) okazał się bardziej wydajny podczas inkubacji w 37°C w porównaniu z 4°C i 25°C (11). Z kolei badania Haskard i wsp. (22) skupiły się na wpływie temperatury inkubacji na stabilność kompleksów komórek bakterii *L. rhamnosus* GG i LC-705 z aflatoksyną B<sub>1</sub>. W przypadku szczepu *L. rhamnosus* GG nie odnotowano znaczącego wpływu badanych temperatur (4°C, 25°C, 37°C) na stopień uwalniania toksyny w układzie wodnym (6-7%), podczas gdy z biomasy *L. rhamnosus* LC-705 desorpcji ulegało ok. 10% badanej toksyny w temperaturze 25°C, a w 4°C ok. 7%.

Także pH środowiska zawieszającego może wpływać na wydajność adsorpcji mykotoksyn do komórek bakterii. Kwasowość determinuje jonizację cząsteczek mykotoksyn, ale również składników strukturalnych komórki, zmieniając ich wzajemne powinowactwo (39). Określanie wpływu pH i temperatury na wydajność wiązania toksyn pleśniowych przez mikroorganizmy pozwala, w uproszczony sposób, prognozować możliwość zachodzenia podobnych interakcji w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt.

Wpływ pH środowiska na wiązanie mykotoksyn jest zależny od szczepu oraz rodzaju toksyny. Przykładowo, nie wykazano korelacji między stopniem wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> a parametrem pH w odniesieniu do *L. rhamnosus* GG, natomiast stwierdzono ją w układach z *L. reuteri* i *L. casei* Shiota, które wiązały mykotoksynę najskuteczniej w pH 7,2 (25). Efektywność wiązania fumonizyny, zearalenonu, deoksyniwalenolu i niwalenolu przy różnych wartościach pH układu doświadczalnego określono dla szczepów *L. rhamnosus* GG i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (38). Stwierdzono, że usuwanie fumonizyny z roztworu zachodziło najefektywniej przy pH około 4,0, a wzrost pH powodował obniżenie skuteczności jej wiązania. Zearalenon był natomiast nieznacznie wydajniej usuwany przez *L. rhamnosus* i *L. delbrueckii* w wyższym pH (7,4 i 7,8). W przypadku deoksyniwalenolu i niwalenolu ich adsorpcja nie zależała od wartości kwasowości układu doświadczalnego, co sugeruje, że w procesie tym nie uczestniczyły wiązania wodorowe. W badaniach Mazurkiewicz (36) potwierdzono wpływ pH układu doświadczalnego oraz żywotności komórek *L. acidophilus* K1 na stopień wiązania ochratoksyny A. Komórki żywe najskuteczniej wiązały toksynę w układzie o pH 4,0, podczas gdy adsorpcja do martwej biomasy zachodziła najefektywniej w pH 5,0. Patulina i ochratoksyna podlegały najwydajniejszej adsorpcji do komórek *L. acidophilus* VM20 i *B. animalis* VM12 jeśli pH było na poziomie 5,0 (15).

Z kolei stabilność kompleksów komórek szczepów *L. rhamnosus* GG i LC-705 z aflatoksyną B<sub>1</sub>, określana

w pH 2,0, 7,0 i 10,0, okazała się niezależna od układu doświadczalnego. W każdym następowo uwolnienie do medium wstępnie związanej aflatoksyny na poziomie 6-11% (22).

Wskazano, że aflatoksyny podlegają absorpcji przede wszystkim w jelicie cienkim, gdzie pH treści jelita osiąga poziom między ok. 6,0 a 8,0 (27). Ważne jest zatem, by szczepy bakterii wykazywały wiązanie toksyn pleśniowych w podobnych warunkach.

Czas inkubacji nie wpływał na wiązanie mykotoksyn (aflatoksyny B<sub>1</sub>, zearalenonu lub  $\alpha$ -zearalenonu) przez bakterie *L. rhamnosus* (GG oraz LC-705), *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum* (11-13, 30, 43). Proces ten zachodził zaraz po dodaniu bakterii do roztworu mykotoksyny.

Wzrost siły jonowej ponad wartość typową dla układów biologicznych doprowadzał do obniżenia wydajności wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> przez żywe komórki *L. rhamnosus* GG i biomasę inaktywowaną termicznie, a pozostawał bez wpływu na wiązanie tej toksyny przez komórki traktowane kwasem (21). Odnotowano, że w obecności NaCl wiązaniu podlegało więcej aflatoksyny w porównaniu z układami zawierającymi CaCl<sub>2</sub>. Prawdopodobnie jony wapnia konkurowały z aflatoksyną o miejsca przyłączania do ściany komórkowej, ograniczając ilość fragmentów wiążących tę substancję (21).

### Wpływ wstępnego przygotowania biomasy bakterii na stopień i stabilność wiązania mykotoksyn

Potwierdzono wpływ wstępnego przygotowania biomasy bakterii probiotycznych na zdolność wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> (21, 22, 30, 38-40). Komórki martwe *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. paraplantarum* oraz *B. bifidum*, uzyskane po poddaniu biomasy działaniu wysokiej temperatury lub kwasu, wiązały więcej toksyny w porównaniu z żywymi. Obserwowano również trudniejsze wymywanie toksyny z takich kompleksów (21, 22). Stwierdzono, że polisacharydy ściany bakterii odgrywały najważniejszą rolę w wiązaniu toksyny, ale obecność innych składników pozostawała nie bez znaczenia (43). Zarówno wysoka temperatura, jak i hydroliza kwasowa przyczyniały się do zmiany struktury polimerów ściany, ale nie całkowitej ich destrukcji. Powodowały denaturację białek, przez co następowało rozwinięcie ich struktury. W konsekwencji przyczyniało się to do zwiększenia dostępności obszarów hydrofobowych i pojedynczych aminokwasów, biorących udział w wiązaniu mykotoksyn. Efektem tego mogło być zwiększenie porowatości błony komórkowej. Te przekształcenia w ścianie prowadziły do efektywniejszego wiązania toksyny z powodu odsłonięcia grup funkcyjnych różnych związków chemicznych uczestniczących w wiązaniu toksyn. Możliwe było również w tym przypadku udostępnienie toksynie miejsc wiążących do błony komórkowej i składników wewnątrzkomórkowych.

Komórki bakterii *L. rhamnosus* GG potraktowane metanadjoinanem sodu wykazywały najmniejszą zdolność wiązania. Metanadjoinan silnie utleniał grupy -OH obecne m.in. w polisacharydach ściany (21). Trawienie enzymatyczne pronazą E, muramidazą lub lizozymem również powodowało obniżenie stopnia wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> przez żywe lub poddawane obróbce termicznej komórki z rodzaju *Lactobacillus* (21, 39). Lipaza nie wpływała natomiast na wydajność adsorpcji, co potwierdziło, że lipidy nie są istotne w wiązaniu badanej mykotoksyny (21, 39). Mocznik dodawany do hodowli komórek *L. rhamnosus* GG powodował obniżenie wydajności wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub>. Związek ten osłabiał zarówno wiązania hydrofobowe, jak i zrywał wiązania wodorowe, niszcząc natywną strukturę polimerów ściany (21). Lee i wsp. (35) podają, że lepsza efektywność wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> przez biomasę bakterii *L. rhamnosus* GG i LC-705 spowodowana była raczej zmianą właściwości powierzchni komórek niż ekspozycją nowych miejsc wiążących.

Porównywano również zdolność świeżo namnożonych, liofilizowanych oraz inaktywowanych termicznie komórek *L. rhamnosus* GG oraz LC-705 do wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> (11). Liofilizowane komórki bakterii wiązały mniej toksyny w porównaniu do świeżo namnożonych, a największą zdolność adsorpcji wykazywały komórki poddawane działaniu wysokiej temperatury (11). Wyklucza to możliwość metabolicznej degradacji toksyny przez badane szczepy.

Suszenie rozpyłowe biomasy *L. rhamnosus* przyczyniało się do kompletnej utraty zdolności wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> przez komórki tych bakterii. Biomasa liofilizowana nadal posiadała zdolność adsorpcji mykotoksyny (3). Haskard i wsp. (21) tłumaczą, że potrzebna jest integralność wielu komponentów ściany komórkowej bakterii mlekowych, aby efektywnie inaktywować toksyny.

Gatunki bakterii *L. plantarum* i *L. paracasei* potrafiły hamować wzrost pleśni *Fusarium graminearum* oraz wiązały wytwarzany przez nią deoksyniwalenol (DON). Wiązanie toksyny okazało się intensywniejsze po obróbce termicznej biomasy (14). Natomiast wyniki prac Fuchs i wsp. (15), w których materiałem biologicznym były komórki *L. acidophilus* VM20 oraz *B. animalis* VM12 inaktywowane termicznie, wskazały, że szczepy wiązały jedynie ok. 11% ochratoksyny i ok. 16% patuliny, podczas gdy komórki żywe, odpowiednio, ok. 97 i 82%.

Badano ponadto stabilność kompleksów komórek *L. rhamnosus* (szczep GG oraz LC-705), *L. casei*, *L. plantarum* oraz *L. fermentum* z aflatoksyną B<sub>1</sub> (13, 22). Biomasa wstępnie inaktywowana termicznie lub roztworem kwasu zachowywała znacznie więcej związanej aflatoksyny B<sub>1</sub> (ok. 66%) po serii płukań wodą w porównaniu z komórkami niepoddawanymi wymienionym zabiegom. Dodatkowe autoklawowanie i sonifikacja nie przyczyniały się do znaczącego zwiększenia stopnia uwolnienia aflatoksyny immobi-

lizowanej w strukturze komórek *L. rhamnosus* (22). Cytowane wyniki wskazują, że wiązanie aflatoksyny B<sub>1</sub> jest odwracalne, ale równocześnie stabilne w stałych warunkach środowiskowych. Analizy wykonane przez Hernandez-Mendoza i wsp. (27) wskazują, że stabilność kompleksów *L. reuteri* i *L. casei* Shiota z aflatoksyną wynikać mogła także z interakcji między pojedynczymi cząsteczkami aflatoksyny. Cząsteczki te, przylegając do powierzchni bakterii, tworzyły sieć chroniącą przed uwolnieniem mykotoksyny z kompleksu. Poddawanie biomasy komórek działaniu wysokiej temperatury i kwasu wzmacniało stabilność kompleksów oraz polepszało wydajność wiązania aflatoksyny B<sub>1</sub> z roztworu.

W pracy Fazeli i wsp. (13) stwierdzono, że stabilność kompleksów bakterii *L. casei*, *L. plantarum* oraz *L. fermentum* z aflatoksyną B<sub>1</sub> była zależna od szczepu, przy czym pierwszy z wymienionych gatunków wiązał mykotoksynę najszybciej, tworząc najbardziej stabilne immobilizaty.

### Wpływ obecności soli żółciowych i śluzu jelitowego na wiązanie mykotoksyn

Sole żółciowe, dodawane w stężeniach od 0,05% do 0,15%, wzmagaly wiązanie aflatoksyny B<sub>1</sub> przez różne szczepy *L. casei*, ale również działały na nie bójczo (25). Mimo że żywotność bakterii obniżała się, biomasa wykazywała zwiększoną zdolność do wiązania toksyny w porównaniu z bakteriami nietraktowanymi solami żółciowymi. Substancje te działają na fosfolipidy oraz białka. Na te ostatnie wpływają denaturująco, powodując rozwijanie łańcucha polipeptydowego, a na fosfolipidy emulgująco, zmniejszając napięcie powierzchniowe błony komórkowej. Mogą tym samym zmieniać strukturę ściany, umożliwiając tworzenie się nowych miejsc wiązania aflatoksyny, bądź wzmacniają istniejące.

Gratz i wsp. (17) badali zdolność wiązania śluzu jelitowego i aflatoksyny m.in. przez bakterie *Lactobacillus rhamnosus* GG. Komórki tych bakterii wiązały około 67% dostępnych białek śluzu. Wzrastające stężenie tego czynnika (do 8 mg białka/cm<sup>3</sup>) nie wpływało znacząco na wiązanie mykotoksyny przez badany szczep, podczas gdy preinkubacja komórek z aflatoksyną B<sub>1</sub> ograniczała ich późniejszą zdolność do wiązania śluzu. Inaktywacja termiczna bakterii skutkowała utratą zdolności adhezji biomasy do śluzu jelitowego. Podobną zależność odnotowano w badaniach Ouwehand i wsp. (42) w odniesieniu bakterii m.in. *L. rhamnosus* GG i LC-705, *L. johnsonii* La1, *L. casei* Shiota, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* La5 oraz *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Cytowane wyniki sugerują, że w przewodzie pokarmowym zwierząt i ludzi wydajność wiązania mykotoksyn przez żywe komórki może być ograniczona. Wg Gratz i wsp. (17), niezdolność bakterii inaktywowanych termicznie do wiązania śluzu dowodzi, że domenami wiążącymi śluz są białka. Śluz i aflatoksyna najprawdopodobniej nie konkurują o miejsca adsorp-

cji na powierzchni komórek bakterii. Komórki zabite termicznie nie wykazały bowiem możliwości wiązania śluzu, natomiast miały zwiększone powinowactwo do toksyny w porównaniu z żywymi.

### Wiązanie mykotoksyn *in vivo* przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*

Szczep *L. rhamnosus* GG i LC-705 okazały się skuteczne w eliminowaniu fumonizyny B<sub>1</sub> z organizmu szczurów (2). Zwierzęta otrzymujące probiotyki w liczbie 10<sup>9</sup> jtk/cm<sup>3</sup> nie przejawiały objawów zatrucia toksyną. Al-Masri i wsp. (2) wskazali, że dzięki wiązaniu mykotoksyny w świetle przewodu pokarmowego przez drobnoustroje probiotyczne zmniejszała się jej dostępność dla ważnych narządów. Ograniczało to poziom oksydacyjnego uszkodzenia wątroby przebiegającego pod wpływem fumonizyny B<sub>1</sub>. Ochrona przed stresem oksydacyjnym na poziomie komórkowym wynikała również ze wzrostu poziomu zredukowanego glutationu w obecności probiotyków.

Gratz i wsp. (18) określali wchłanianie, wydalanie i toksyczność aflatoksyny (1,5 mg/kg m. c.) w badaniach na szczurach Wistar. W przypadku zwierząt otrzymujących tylko aflatoksynę poziom toksyny i jej metabolitu aflatoksyny M<sub>1</sub> w kale był zmienny. Obecność toksyn w kale świadczyła o ich niewchłonięciu w jelitach. W przypadku zwierząt, które suplementowano komórkami probiotyku (*L. rhamnosus* GG w liczbie 5 × 10<sup>10</sup> jtk/0,5 cm<sup>3</sup> buforu) wydalanie toksyn z kałem znacznie wzrastało (o 122% w przypadku aflatoksyny B<sub>1</sub> i o 152% w przypadku aflatoksyny M<sub>1</sub>). Szczep *L. rhamnosus* GG zatrzymywał aflatoksynę w jelicie i jednocześnie zapobiegał jej wchłanianiu. Aktywność transaminazy alaninowej, wzrastała o 149% w przypadku szczurów otrzymujących tylko aflatoksyny B<sub>1</sub>, a w przypadku zwierząt suplementowanych probiotykami obserwowano niższą aktywność tego enzymu. Suplementacja probiotykami zapobiegała utracie masy ciała zwierząt, jednak ich wzrost był nadal mniej intensywny w porównaniu z grupą kontrolną.

Drobnoustroje, których ściana komórkowa zbudowana jest ze składników o większym powinowactwie do określonej toksyny, uwalniają jej mniej w czasie pasażu przez przewód pokarmowy (45).

Wykazano, że najskuteczniejszym miejscem wiązania aflatoksyny przez *L. reuteri* w przewodzie pokarmowym szczurów była dwunastnica, a następnie jelito kręte i czcze (26). Probiotyki blokowały przenikanie aflatoksyny B<sub>1</sub> do krwi przy takiej dawce toksyny, która całkowicie wysyciła jej metabolizm w wątrobie. W wyniku zmniejszonej absorpcji toksyny stwierdzano zmniejszone ilości jej adduktów z albuminą (redukcja rzędu 29%). Korzystne okazało się dłuższe podtrzymywanie doustnej suplementacji probiotykami. Probiotyki zwiększały retencję aflatoksyn w jelicie, zapobiegając wchłanianiu toksyny, przez co ograniczały szkodliwość stosowanej substancji.

W pracy Hathout i wsp. (23) badano zdolność dwóch szczepów z rodzaju *Lactobacillus* do ochrony organizmu szczurów przed stresem oksydacyjnym wywołanym aktywnością aflatoksyny B<sub>1</sub>. Zauważono, że podawanie szczurom aflatoksyny (3 mg/kg paszy) przyczyniało się do pogorszenia spożycia paszy i redukcji masy zwierząt. Szczury narażone na aflatoksynę charakteryzowały się najniższą masą, natomiast suplementowane komórkami probiotyków w dawce 10<sup>12</sup> jtk/kg m. c. wykazywały masę wyższą w stosunku do wspomnianej grupy o ok. 9 g i o ok. 7 g, odpowiednio, w przypadku dodatku *L. reuteri* i *L. casei*. Hathout i wsp. (23) uważają, że zmniejszony pobór pokarmu był skutkiem zatrucia aflatoksyną. Epoksydowe pochodne aflatoksyny przyłączają się do białek, przez co zakłócają przebieg szlaków enzymatycznych w wątrobie. W przypadku zwierząt otrzymujących samą AFB<sub>1</sub> wszystkie wartości wskaźników biochemicznych oznaczone we krwi zwierząt ulegały podwyższeniu, przy znaczącym obniżeniu zdolności antyoksydacyjnej. Podawanie probiotyków wraz z aflatoksyną poprawiało wyniki badań biochemicznych, ponieważ wiązanie aflatoksyny B<sub>1</sub> w przewodzie pokarmowym przez te bakterie zmniejszało dostępność toksyny w tkankach. Bakterie *L. reuteri* wykazywały wyższą wydajność wiązania toksyny w porównaniu do *L. casei*. Hathout i wsp. (23) twierdzą, że poprawa zdolności antyoksydacyjnej i obniżenie poziomu tlenu azotu we krwi po zastosowaniu probiotyków wiązała się nie tylko z adsorpcją toksyny, ale także z możliwością rozkładu przez komórki bakterii fermentacji mlekowej reaktywnych form tlenu, np.: nadtlenu wodoru czy anionu ponadtlenkowego.

Wyniki badań Ślizewskiej i wsp. (53) wskazują, że mieszanina probiotyków m.in. *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. plantarum* oraz dodatek komórek *S. cerevisiae* zmniejszały poziom uszkodzeń DNA w ludzkich limfocytach. Uszkodzenia wywoływało obecnością aflatoksyny B<sub>1</sub> w wodzie zanieczyszczonej kałem kurcząt karmionych paszą z dodatkiem toksyny. Po zastosowaniu w paszy dodatku mieszanki probiotyków genotoksyczność odchodów ptaków malała. Wskazywało to na zdolność adsorpcji aflatoksyny B<sub>1</sub> przez probiotyki, a przez to zmniejszania jej stężenia w okrężnicy kureczaków.

Inaktywowane termicznie bakterie *L. rhamnosus* GG wpływały na transport i toksyczność aflatoksyny B<sub>1</sub> w jelitowej linii komórkowej Caco-2 (19). Bakterie stosowane w dawce 5 × 10<sup>10</sup> jtk/cm<sup>3</sup> wiązały 61% toksyny już w pierwszych 30 min. doświadczenia, a w dawce 1 × 10<sup>10</sup> jtk/cm<sup>3</sup> adsorbowały 40% mykotoksyny. Obecność komórek *L. rhamnosus* GG ograniczała transport aflatoksyny B<sub>1</sub> przez nabłonek Caco-2, a stopień ograniczania dyfuzji był większy przy wyższych dawkach bakterii. Przepuszczalność aflatoksyny przez monowarstwę komórek jelitowych malała wraz ze wzrastającą w układzie liczbą komórek probiotyku. Toksyczność aflatoksyny była oceniana

poprzez analizę integralności monowarstwy Caco-2. Bakterie *L. rhamnosus* chroniły komórki jelitowe przed wzrostem perforacji i nieszczelności tworzonej przez nie warstwy.

Żywe i inaktywowane termicznie komórki *L. rhamnosus* GG, dzięki zdolności wiązania deoksyniwalenolu, przywracały aktywność alkalicznej fosfatazy komórek jelitowych linii Caco-2 (55). Przedłużały tym samym różnicowanie komórek Caco-2, co koreluje z opornością erytrocytów na infekcje. Deoksyniwalenol hamuje różnicowanie erytrocytów, osłabiając funkcje obronne błony jelitowej. Może to ułatwiać infekcje bakteryjne w przewodzie pokarmowym i powodować retencję składników odżywczych. Przywrócenie aktywności fosfatazy alkalicznej zachodziło proporcjonalnie do liczby komórek bakterii. Inkubacja ze szczepem *L. rhamnosus* LC-705, który nie wiązał skutecznie DON, nie powodowała znacznego przywrócenia aktywności tego enzymu.

Poza korzystnym oddziaływaniem w organizmie człowieka i zwierząt, probiotyki uczestniczyć mogą w usuwaniu z organizmu toksycznych metabolitów pleśni. Szczepy probiotyczne z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* różnią się zdolnością do wiązania mykotoksyn. Najważniejszą rolę w adsorpcji mykotoksyn odgrywają peptydoglikan i polisacharydy ściany komórkowej bakterii probiotycznych, w tym kwasy tejchojowe, ale także białka ściany. Wiązanie cząsteczek mykotoksyn do składników ściany bakterii ma charakter adsorpcji fizycznej. Komórki inaktywowane termicznie lub traktowane w inny sposób, np. roztworem kwasu czy solami żółci, wykazują większą zdolność wiązania mykotoksyn w porównaniu z komórkami żywymi. Ważnym czynnikiem efektywności adsorpcji jest integralność całej ściany. Charakter miejsc wiązania nie jest wciąż dokładnie poznany. O stopniu wiązania mykotoksyn przez bakterie probiotyczne decyduje wiele czynników. Wpływ wyjściowej liczby komórek probiotyku i ich fazy wzrostu, stężenie mykotoksyny w układzie, temperatura inkubacji, pH roztworu doświadczalnego oraz sposób przygotowania biomasy na wydajność wiązania toksyn pleśniowych jest zależny od szczepu bakterii, jak i od budowy chemicznej samej cząsteczki toksyny.

Wyniki badań *in vivo* potwierdzają, że probiotyki adsorbują mykotoksyny w przewodzie pokarmowym organizmów żywych. Adsorpcja w świetle jelita chroni inne narządy i tkanki, zmniejsza biodostępność mykotoksyn w krwiobiegu, pozwala na usuwanie kompleksów probiotyk–mykotoksyna z ustroju bez szkodliwego wpływu na organizm. Takie działanie probiotyków jest jednak możliwe tylko przy stałej suplementacji tymi drobnoustrojami.

Wiązanie wtórnych metabolitów pleśni jest zagadnieniem stosunkowo nowym, stąd kwestia zastosowania probiotyków w profilaktyce mykotoksykoz wymaga dalszych badań.

## Piśmiennictwo

1. Akande K. E., Abubakar M. M., Adegbola T. A., Bogoro S. E.: Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feed: A review. Pak. J. Nutr. 2006, 5, 398-403.
2. Al-Masri S. A., El-Safy S. M. S., Nada S. A., Amra H. A.: Saccharomyces cerevisiae and probiotic bacteria potentially inhibit fumonisin B<sub>1</sub> production in vitro and in vivo. J. Am. Sci. 2011, 7, 198-205.
3. Bovo F., Franco L. T., Rosim R. E., Silvia Fávoro Trindade C., Fernandes de Oliveira C. A.: The ability of Lactobacillus rhamnosus in solution, spray-dried or lyophilized to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. J. Food Res. 2014, 3, 35-42.
4. Buda B., Dylus E., Górska-Fraczek S., Brzozowska E., Gamian A.: Właściwości biologiczne białek powierzchniowych bakterii z rodzaju Lactobacillus. Postępy Hig. Med. Dośw. 2013, 67, 229-237.
5. 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-Aust. J. Anim. Sci. 2003, 16, 1686-1689.
6. Commans D., Hughes R., Shortt C., Rowland I.: The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. Mutation Res. 2005, 591, 276-289.
7. Czerwiecki L.: Mykotoksyny w żywności jako czynnik zagrożenia zdrowotnego. Współczesne Poglądy w Nauce, Żywność. Żywnienie a Zdrowie 1997, 4, 292-300.
8. Čvek D., Markov K., Frece J., Friganović M., Duraković L., Delaš F.: Adhesion of zearalenone to the surface of lactic acid bacteria cells. Croatian J. Food Technol. Biotechnol. Nutr. 2012, 7, 49-52.
9. Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P.: The biosynthesis and functionality of the cell wall of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 1999, 76, 159-184.
10. Dylus E., Buda B., Górska-Fraczek S., Brzozowska E., Gamian A.: Białka powierzchniowe bakterii z rodzaju Bifidobacterium. Postępy Hig. Med. Dośw. 2013, 67, 402-412.
11. El-Nezami H., Kankaapaa 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. 1998, 36, 321-326.
12. El-Nezami H., Polychronaki N., Salminen S., Mykkanen H.: Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade Lactobacillus strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 3545-3549.
13. Fazeli M. R., Hajimohammadali M., Azamossadat M., Samadi N., Khoshayand M. R., Vaghari E., Pouragahi S.: Aflatoxin B<sub>1</sub> binding capacity of autochthonous bacteria strains of lactic acid bacteria. J. Food Prot. 2008, 72, 189-192.
14. Franco T. S., Garcia S., Hirooka E. Y., Ono Y. S., dos Santos J. S.: Lactic acid bacteria in the inhibition of fusarium graminearum and deoxynivalenol detoxification. J. Appl. Microbiol. 2011, 111, 739-748.
15. Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundl M., Knasmüller S.: Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. Food Chem. Toxicol. 2008, 46, 1398-1407.
16. Gerbino E., Mobili P., Tymczyszyn E., Fausto R., Gómez-Zavaglia A.: FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between Lactobacillus kefir S-layer and metal ions. J. Mol. Struct. 2011, 987, 186-192.
17. Gratz S., Mykkänen H., Ouweland A., Juvonen R., Salminen S., El-Nezami H.: Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B<sub>1</sub> in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 6306-6308.
18. Gratz S., Taubel M., Juvonen R. O., Viluksela M., Turner P. C., Mykkanen H., El-Nezami H.: Lactobacillus rhamnosus strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion and toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72, 7398-7400.
19. Gratz S., Wu Q., El-Nezami H., Juvonen R., Mykkänen H., Turner P. C.: Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B<sub>1</sub> transport, metabolism and toxicity in Caco-2 cells. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 3958-3964.
20. Habu Y., Nagaoka M., Yokokura T., Azuma I.: Structural studies of cell wall polysaccharides from Bifidobacterium breve YIT 4010 and related Bifidobacterium species. J. Biochem. 1987, 102, 1425-1432.
21. Haskard C., Binnion C., Ahokas J.: Factors affecting the sequestration of aflatoxin by Lactobacillus rhamnosus strain GG. Chem. Biol. Interact. 2000, 128, 30-49.
22. Haskard C. A., El-Nezami H. S., Kankaanpää P. E., Seppo S., Ahokas J. T.: Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by lactic acid bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 3086-3091.
23. Hathout A. S., Mohamed S. R., El-Nekeety A. A., Hassan N. S., Aly S. E., Abdel-Wahhab M. A.: Ability of Lactobacillus casei and Lactobacillus reuteri to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. Toxicon. 2011, 58, 179-186.

24. Hernandez-Mendoza A., Garcia H. S., Steele J. L.: Screening of Lactobacillus casei strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. Food Chem. Toxicol. 2009, 47, 1064-1068.
25. Hernandez-Mendoza A., Garcia H. S., Steele J. L.: Screening of Lactobacillus casei strains for their ability to bind aflatoxin B<sub>1</sub>. Food Chem. Toxicol. 2010, 47, 1064-1068.
26. Hernandez-Mendoza A., Gonzalez-Cordova A. F., Vallejo-Cordoba B., Garcia H. S.: Effect of oral supplementation of Lactobacillus reuteri in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats. J. Basic Microbiol. 2011, 51, 263-268.
27. Hernandez-Mendoza A., Guzman-de-Pena D., Garcia H. S.: Key role of teichoic acids on aflatoxin B<sub>1</sub> binding by probiotic bacteria. J. Appl. Microbiol. 2009, 107, 395-403.
28. Jędrzejczyk T.: Kwas muraminowy znany i nieznan. Scientific Bulletin of the Technical University of Lodz, Food Chem. Biotechnol. 2008, 72, 105-118.
29. Kabak B., Ozbey F.: Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. J. Food Compos. Anal. 2012, 27, 21-31.
30. Kabak B., Var I.: Factors affecting the removal of aflatoxin M<sub>1</sub> from food model by Lactobacillus and Bifidobacterium strains. J. Environ. Sci. Health. 2008, 43, 617-624.
31. Khaleghi M., Kermanshahi R. K.: Effect of environmental stresses on S-layer production in Lactobacillus acidophilus ATTC 4356. Adv. Appl. Biotech. 2012, 21, 1-17.
32. Khoury A., Ali Atoui A., Ochtratoxin A.: General Overview and Actual Molecular Status. Toxins. 2010, 2, 461-493.
33. Lahtinen S. J., Haskard C. A., Ouwehand A. C., Salminen S. J., Ahokas J. T.: Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to cell wall components of Lactobacillus rhamnosus strain GG. Food Addit. Contam. 2004, 21, 158-164.
34. Lee Y., El-Nezami H., Hascard C., Gratz S., Puong K., Salminen S., Mykkänen H.: Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B<sub>1</sub> by viable and nonviable bacteria. J. Food Prot. 2003, 66, 426-430.
35. Lee Y. K., Salminen S. Praca zbiorowa. Handbook of Probiotics and Prebiotics. Wydawnictwo John Wiley&Sons, Inc. 2009.
36. Mazurkiewicz J.: Degradation of ochratoxin A by Lactobacillus acidophilus K1. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 2011, 14, 1-5.
37. Nagaoka M., Shibata H., Kimura I., Hashimoto S., Kimura K., Sawada H., Yokokura T.: Structural studies on a cell wall polysaccharide from Bifidobacterium longum YIT4028. Carbohydr. Res. 1995, 274, 245-249.
38. Niderkorn V., Boudra H., Morgavi D. P.: Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. J. Appl. Microbiol. 2006, 101, 849-856.
39. Niderkorn V., Morgavi D. P., Aboab B., Lemaire M., Boudra H.: Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 2009, 106, 977-985.
40. Oatley J. T., Rarick M. D., Ji G. E., Linz J. E.: Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to Bifidobacteria in vitro. J. Food Prot. 2000, 63, 1133-1136.
41. Oelschlaeger T. A.: Mechanisms of probiotic actions – A review. Int. J. Med. Microbiol. 2010, 300, 57-62.
42. Ouwehand A. C., Tolkkio S., Kulmala J., Salminen S., Salminen E.: Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. Lett. Appl. Microbiol. 2000, 31, 82-86.
43. Peltonen K., El-Nezami H., Haskard C., Ahokas J., Salminen S.: Aflatoxin B<sub>1</sub> binding by dairy strains of lactic acid bacteria and Bifidobacteria. J. Dairy Sci. 2001, 84, 2152-2156.
44. Piotrowska M.: Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mykotoksyn z żywności i pasz. Post. Mikrobiol. 2012, 51, 109-119.
45. Pizzolitto R. P., Bueno D. J., Armando M. R., Cavaglieri L., Dalcerio A. M., Salvano M. A.: Binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology. 2011, ISBN 978-953-307-395-8, InTech Open Science, <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/binding-of-aflatoxin-b1-to-lactic-acid-bacteria-and-saccharomyces-cerevisiae-in-vitro-a-useful-model>
46. Pollman K., Raff J., Merroun M., Fahmy K., Selenska-Pobell S.: Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. Biotechnol. Adv. 2006, 24, 58-68.
47. Richard J. L., Gary A., Payne G. A.: Mycotoxins: risks in plant, animal, and human Systems. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA 2003.
48. Roczný raport RASFF 2012: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2012\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf)
49. Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T.: Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 2000, 84, 197-215.
50. Schäffer C., Messner P.: The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. Microbiology 2005, 151, 643-651.
51. Sengupta R., Altermann E., Anderson R. C., McNabb W. C., Moughan P. J., Roy N. C.: The role of cell surface architecture of Lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. Mediators of Inflammation. 2013, 1-16.
52. Shetty P., Jespersen L.: Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends Food Sci. Technol. 2006, 17, 48-55.
53. Śliżewska K., Nowak A., Libudzisz Z., Blasiak J.: Probiotic preparation reduces the faecal water genotoxicity in chickens fed with aflatoxin B<sub>1</sub> contaminated fodder. Res. Vet. Sci. 2010, 89, 391-395.
54. Śliżewska K., Smulikowska S.: Detoxication of aflatoxin B<sub>1</sub> and change in microflora pattern by probiotic in vitro fermentation of broiler feed. J. Anim. Feed Sci. 2011, 20, 300-309.
55. Turner P. C., Wu Q. K., Piekkola S., Gratz S., Mykkanen H., El-Nezami H.: Lactobacillus rhamnosus strain GG restores alkaline phosphatase activity in differentiating Caco-2 cells dosed with the potent mycotoxin deoxynivalenol. Food Chem. Toxicol. 2008, 46, 2118-2123.
56. Yiannikouris A., Poughon L., Cameleyre X., Dussap C.-G., Francois J., Bertin G., Jouany J.-P.: A novel technique to evaluate interactions between Saccharomyces cerevisiae cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. Biotechnol. Lett. 2003, 25, 783-789.
57. Yunus A. W., Razzazi-Fazeli E., Bohm J.: Aflatoxin B<sub>1</sub> in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. Toxins 2011, 3, 566-590.
58. Zdrovenco E., Kachala V. V., Sidarenka A. V., Izhik A. V., Kisileva E. P., Shashkov A. S., Novik G. I., Knirel Y. A.: Structure of the cell wall polysaccharides of probiotic bifidobacteria Bifidobacterium bifidum BIM B-465. Carbohydr. Res. 2009, 344, 2417-2420.
59. Zhang X. B., Ohta Y.: Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. J. Dairy Sci. 1991, 74, 1477-1481.
60. Zielińska K., Fabiszewska A., Wróbel B.: Aflatoxins occurrence in feed and methods of its decontamination. J. Res. Appl. Agric. Eng. 2013, 58, 254-260.

**Autor autora: dr inż. Anna Bzducha-Wróbel, ul. Nowoursynowska 159c, 02-897 Warszawa; e-mail: anna\_bzducha\_wrobel@sggw.pl**