

Hodnotenie *in vitro* degradácie zearalenónu bezbunkovými supernatantmi vybraných probiotických baktérií

Michaela Harčárová¹
Eva Čonková²
Alena Hreško Šamudovská³
Stanislav Hreško⁴
Andrej Marcin⁵
Tomáš Mihok⁶
Lukáš Bujňák⁷

¹Katedra výživy a kŕmenia zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; michaela.harcarova@uvlf.sk

²Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; eva.conkova@uvlf.sk

³Katedra výživy a kŕmenia zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; alena.hreskosamudovska@uvlf.sk

⁴Katedra výživy a kŕmenia zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; stanislav.hresko@uvlf.sk

⁵Katedra výživy a kŕmenia zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; andrej.marcin@uvlf.sk

⁶Katedra výživy a kŕmenia zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; tomas.mihok@uvlf.sk

⁷Katedra výživy a kŕmenia zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach; Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika; lukas.bujnak@uvlf.sk

Grant: VEGA č. 1/0698/24

Název grantu: Sledovanie účinku kŕmnych doplnkových látok prírodného pôvodu a alternatívnych kŕmnych komponentov na produkciu a zdravie monogastrických zvierat

Oborové zamčrení: GH - Výživa hospodárskych zvierat

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

Abstrakt Mykotoxín produkovaný hubami rodu *Fusarium* zearalenón sa často vyskytuje v krmivách pre zvieratá a v ľudských potravinách. V súčasnej dobe existujú rôzne preventívne metódy, ktorými je možné degradovať zearalenón v potravinách a krmivách. Táto práca bola zameraná na vyhodnotenie úrovne degradácie zearalenónu v koncentrácii 1 ppm pomocou bezbunkových supernatantov probiotických baktérií *Limosilactobacillus fermentum* 213, *Limosilactobacillus reuteri* L26, *Lactiplantibacillus plantarum* CCM 1904 a *Bacillus subtilis*. Najvyššiu mieru degradácie 1 ppm zearalenónu vykazoval bezbunkový supernatant druhu *Bacillus subtilis*. V závislosti od použitej koncentrácie (100 %, 50 % a 25 %) sa stupeň degradácie pohyboval od 4,4 % do 3,8 %. Najmenej účinný bol supernatant *L. plantarum* CCM 1904, úroveň degradácie sa pohybovala v rozpätí 0,01 % – 0,4 %.

Kľúčová slova Degradácia, mykotoxíny, zearalenón

1. ÚVOD

S globálnou zmenou klímy a znečistením životného prostredia sa môže zvyšovať aj riziko kontaminácie potravín a plodín mikroskopickými vláknitými hubami. Kontaminácia krmív a potravín mikromycétami a ich sekundárnymi metabolitmi (mykotoxínmi) sa stáva globálnym problémom. Okrem iných mykotoxínov sa za poľnohospodársky významný kontaminant považuje zearalenón (ZEA). Zearalenón sa vyskytuje najmä v obilninách, ako je kukurica, pšenica, ryža, jačmeň, cirok, sója, ovos a vo výrobkoch z nich (Han a kol., 2022). Na negatívne účinky zearalenónu sú senzitívne ošípané, králiky, hydina ale aj ľudia prostredníctvom príjmu mykotoxínom znehodnotených potravín a krmív (Bulgaru a kol., 2021). Zearalenón je celosvetovo rozšírený a

vykazuje estrogénom podobnú aktivitu. Predstavuje zdravotné riziko pre ľudí a hospodárske zvieratá v súvislosti s reprodukčnou sústavou. Je menej citlivý na zmeny prostredia a tepelné spracovanie, zostáva stabilný počas skladovania a spracovania potravín (Yazar a kol., 2008).

Z hľadiska prevencie výskytu mykotoxínov existuje mnoho rôznych postupov a prostriedkov na degradáciu a elimináciu mykotoxínov v krmivách a potravinách. Jednou z možností je degradácia mykotoxínov prostredníctvom biologických metód. Princípom biodegradácie je použitie enzýmov a metabolitov nepatogénnych mikroorganizmov (baktérie alebo kvasinky), ktoré vznikajú počas ich rastu a vývoja. Mikroorganizmy môžu priamo adsorbovať mykotoxíny alebo ich redukovať (Feng a kol., 2020; Xu a kol., 2022). Nepatogénne mikróby, ako napríklad druhy rodov *Bacillus*, *Saccharomyces* a *Lactobacillus*, majú schopnosť detoxikovať krmivá kontaminované zearalenónom, pretože spĺňajú štandardy bezpečnosti používania bez toho, aby krmivo negatívne ovplyvňovali v súvislosti s neprijemným zápachom alebo chuťou (Wang a kol., 2019; Zhu a kol., 2021). Zistilo sa, že niektoré kvasinky a kmene *Lactobacillus* sú cytologicky kompatibilné so ZEA, sú schopné ho adsorbovať a tým znižujú jeho biologickú dostupnosť (Vega a kol., 2021). Okrem toho sa potvrdilo, že mikroorganizmy, ako napríklad *Bacillus subtilis*, môžu meniť molekulárnu štruktúru ZEA počas svojich metabolických procesov, čím sa môže znížiť jeho estrogénny účinok (Ju a kol., 2019).

Cieľom tejto práce bolo vyhodnotiť úroveň degradácie zearalenónu v koncentrácii 1 ppm použitím štyroch rôznych bezbunkových supernatantov probiotických baktérií *Limosilactobacillus fermentum* 213, *Limosilactobacillus reuteri* L26, *Lactiplantibacillus plantarum* CCM 1904 a *Bacillus subtilis*.

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1 Príprava bezbunkových supernatantov

Pri príprave bezbunkového supernatantu z kmeňa *Bacillus subtilis* (Bs) bola použitá 24-hodinová kultúra narastená na B10 agare pri 35°C. Pomocou sterilnej inokulačnej kľučky s objemom 10 µl boli odobraté bakteriálne kolónie, ktorými bolo inokulovaných 50 ml B10 bujónu v Erlenmeyerových bankách. Bezbunkové supernatanty jednotlivých kmeňov laktobacilov *Limosilactobacillus fermentum* 213 (L1), *Limosilactobacillus reuteri* L26 (L2), *Lactiplantibacillus plantarum* CCM 1904 (L3) boli pripravené inokuláciou 50 ml MRS bujónu kolóniami narastenými za anaeróbnych podmienok na MRS agare pri 35 °C počas 48 h, pričom anaerobióza bola zabezpečená použitím systému GasPak. Kultivácia buniek z kmeňov laktobacilov L1, L2 a L3 a *Bacillus subtilis* prebiehala v termostate za aeróbnych podmienok pri 35 °C s pretrepávaním na orbitálnej trepačke (Orbital Shaker – Biosan) pri 170 rpm. Po 24-hodinovej inkubácii bola suspenzia kmeňa *B. subtilis* centrifugovaná dvakrát po 20 min pri 6000 rpm. Po druhej centrifugácii bol získaný čistý bezbunkový supernatant, ktorý bol následne prefiltrovaný cez sterilný mikrobiologický filter s pórovitosťou 0,22 µm. Supernatanty laktobacilových kmeňov L1, L2 a L3 boli pripravené analogickým postupom, avšak doba inkubácie bola predĺžená na 48 h. Bezbunkové supernatanty laktobacilov boli testované v 4 koncentráciách: 100 %, 50 %, 25% a 12,5% a Bs v 3 koncentráciách: 100 %, 50 % a 25 %. Pri riedení bezbunkových supernatantov na nižšie koncentrácie sme použili MRS bujón pre laktobacily a B10 bujón pre *Bacillus subtilis*.

2.2 Postup testovanie biologickej degradácie zearalenónu in vitro

Zearalenón bol k jednotlivým koncentráciám bezbunkových supernatantov pridaný tak, že jeho výsledná hladina v 5 ml každej vzorky predstavovala 1 ppm (tabuľka č. 1).

Tabuľka č. 1: Schéma prípravy koncentrácií bezbunkových supernatantov s obsahom zearalenónu 1 ppm

Koncentrácia bezbunkových supernatantov	Bezbunkové supernatanty	Živné médium	ZEA 10 ppm
100 %	4,5 ml	-	0,5 ml
50 %	2,5 ml	2,0 ml	0,5 ml
25 %	1,25 ml	3,25 ml	0,5 ml
12,5 %	0,625 ml	3,875 ml	0,5 ml
0 % (PK)	-	4,5 ml	0,5 ml

ZEA – zearalenón, PK – pozitívna kontrola

Pozitívna kontrola (PK) bola pripravená nariadením zearalenónu v MRS, resp. B10 bujóne na koncentráciu 1 ppm. Skúmvky boli inkubované pri teplote 35 °C a po 24 h expozícii bol zostatkový zearalenón zo vzoriek extrahovaný pomocou koloniek – Neocolumn for Zearalenone (Neogen corporation, USA). Na vyhodnotenie koncentrácií zearalenónu bola použitá ELISA metóda, využitím ELISA kitu Veratox for Zearalenone (Neogen corporation, USA). Zistené hodnoty koncentrácií boli použité na výpočet percenta detoxikačného efektu bezbunkových supernatantov, podľa vzorca:

$$\% \text{ biodegradácie} = \frac{C_{PK} - C_V}{C_{PK}} \times 100$$

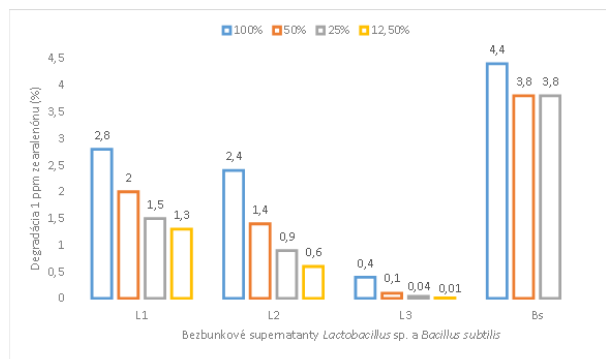
C_V – koncentrácia zearalenónu vo vzorke

C_{PK} – koncentrácia zearalenónu v pozitívnej kontrole

3. VÝSLEDKY

Detoxikačný účinok rôznych koncentrácií bezbunkových supernatantov kmeňov *L. fermentum* 213 (L1); *L. reuteri* L26 (L2), *L. plantarum* CCM 1904 (L3) a *Bacillus subtilis* CCM 2794 (Bs) voči zearalenónu v koncentracii 1 ppm uvádza graf č. 1. Výsledky vo všeobecnosti poukazujú na veľmi nízku účinnosť bezbunkových supernatantov. Najlepši detoxikačný účinok bol pozorovaný pri bezbunkovom supernatante *Bacillus subtilis* CCM 2794, ktorý v 100% koncentracii zdegradoval zearalenón o 4,4 %, v koncentráciách 50 % a v 25 % znížil hladinu ZEA o 3,8 %. Z bezbunkových supernatantov získaných z laktobacilov bol najúčinnější L1, ktorý v 100 % koncentracii degradoval ZEA o 2,8 %, v 50 % koncentracii jeho detoxikačný účinok bol 2 %, v 25 % koncentracii 1,5 % a v 12,5 % koncentracii 1,3 %. Supernatant L3 v 100 % koncentracii znížil hladinu ZEA o 2,4 %, v 50 % koncentracii o 1,4 %, v 25 % o 0,9 % a pri najnižšej skúšanej koncentrácii 12,5 % to bolo len 0,6 %. Najmenej účinný bol bezbunkový supernatant L3, pri ktorom bol detoxikačný účinok takmer nulový (0,01 – 0,4 %).

Graf č.1: Degradácia 1 ppm zearalenónu bezbunkovými supernatantmi vybraných druhov laktobacilov a *Bacillus subtilis*



L1 – *Limosilactobacillus fermentum* 213, L2 – *Limosilactobacillus reuteri* L26, L3 – *Lactiplantibacillus plantarum* CCM 1904, Bs – *Bacillus subtilis* CCM 2794

4. DISKUSIA

Zearalenón a jeho metabolity predstavujú potenciálne škodlivé látky pre zdravie zvierat v súvislosti s krmivom a ľudí prostredníctvom potravinového reťazca. Dlhodobý príjem vyšších koncentrácií zearalenónu má závažné toxické účinky na organizmus cicavcov, môže narušiť reprodukčný systém a vyvolať endokrinné poruchy. Podobne dlhodobá expozícia nízkymi dávkami zearalenónu spôsobuje endokrinné poruchy, ktoré môžu viesť k metabolickým poruchám a zvýšiť riziko ochorení súvisiacich s metabolickým syndrómom. V konečnom dôsledku kontaminácia krmiva mykotoxínmi môže byť príčinou ekonomických strát v chovateľskom priemysle (Han a kol., 2022).

V súčasnej dobe existujú rôzne preventívne opatrenia na zníženie mykotoxikkej záťaže krmív a potravín (Kovač Tomas a Jurčević Šangut, 2025). Všeobecne sa preventívne opatrenia rozdeľujú na predzberové, ktoré zahŕňajú striedanie plodín, správne obrábanie pôdy, vyvážené hnojenie, používanie vhodného semenného materiálu a sejbových techník, šľachtenie a výber plodín a pozbierové opatrenia, ktoré môžeme rozdeliť na fyzikálne, chemické a biologické metódy degradácie mykotoxínov (Agriopoulou a kol., 2020).

V súvislosti s biologickou degradáciou zearalenónu v potravinách a krmivách sa zistilo, že spomedzi kmeňov rodu *Bacillus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. natto* a *B. cerues* vykazujú najvyšší

detoxikačný účinok (Gari a Abdela, 2023). Podobne, podľa našich výsledkov vykazoval najvyššiu mieru degradácie 1 ppm zearalenónu bezbunkový supernatant druhu *Bacillus subtilis*. V závislosti od použitej koncentrácie (100 %, 50 % a 25 %) sa stupeň degradácie pohyboval od 4,4 % do 3,8 %. Xiang a kol. (2024) zistili až 88 % degradačnú účinnosť u kmeňa *Bacillus subtilis* ZENL09 v experimente so zearalenónom v koncentrácii 1 ppm. Podobné výsledky a 99 % schopnosť *Bacillus subtilis* zdegradovať zearalenón v koncentrácii 1 ppm prezentovali aj Cho a kol. (2010).

Probiotiká sú vhodnými prostriedkami pre biodegradáciu zearalenónu v potravinárskom priemysle, pretože vykazujú zdravotné benefity pre ľudí a zvieratá a väčšina baktérií mliečneho kvasenia sa v potravinárskom priemysle považuje za bezpečné (Wang a kol., 2019). Podľa našich výsledkov bol spomedzi laktobacilov najúčinnější bezbunkový supernatant *L. fermentum* 2I3 s degradačným efektom v rozsahu 2,8 % - 1,3 % v korelácii so zvyšujúcou sa koncentráciou (100 % - 12,5 %) a najmenej účinný bol bezbunkový supernatant *L. plantarum* CCM 1904, pri ktorom bol detoxikačný účinok takmer nulový (0,01 % - 0,4 %). Naproti tomu, Chen a kol. (2018) zistili vyššiu úroveň degradácie zearalenónu (45 %) v koncentrácii ZEA 5 mg/L pri použití supernatantu z kmeňa *L. plantarum*. Avšak podľa Hathout a Aly (2014) nie je dekontaminácia zearalenónu nikdy úplná, pokiaľ sa nevytlúči prítomnosť jeho estrogénových analógov.

5. ZÁVER

Napriek širokej škále fyzikálnych, chemických a biologických metód dostupných na zmiernenie negatívnych dopadov mykotoxínov zostáva účinná neutralizácia týchto toxických zlúčenín významnou výzvou. Vysoká stabilita mnohých mykotoxínov, ich rôznorodé správanie v rôznych potravinových a krmivových matriciach a obavy týkajúce sa toxicity a bezpečnosti ich degradačných produktov komplikujú úsilie o dosiahnutie úplnej bezpečnosti. Tieto faktory zdôrazňujú pretrvávajúcu potrebu ďalšieho výskumu a inovátnych stratégií, ktoré pripravujú cestu pre účinnejšiu a udržateľnejšiu kontrolu mykotoxínov.

Zdroje

1. Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Varzakas, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 2020, 9, 137.
2. Bulgaru, C.V., Marin, D.E., Pistol, G.C., Taranu, I. Zearalenone and the Immune Response. *Toxins*, 2021, 13, 4, 248.
3. Feng, Y., Huang, Y., Zhan, H., Bhatt, P., Chen, S. An overview of strobilurin fungicide degradation: current status and future perspective. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11, 389.
4. Gari, J., Abdella, R. Degradation of zearalenone by microorganisms and enzymes. *PeerJ*, 2023, 11, e15808.
5. Han, X., Huangfu, B., Xu, T., Xu, W., Asakiya, C., Huang, K., He, X. Research Progress of Safety of Zearalenone: A Review. *Toxins*, 2022, 14, 6, 386.
6. Hathout, A.S., Aly, S.E. Biological detoxification of mycotoxins: A review. *Annals of Microbiology*, 2014, 64, 905–919.
7. Chen, S.W., Hsu, J.T., Chou, Y.A., Wang, H.T. The application of digestive tract lactic acid bacteria with high esterase activity for zearalenone detoxification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98,10, 3870–3879.
8. Cho, K.J., Kang, J.S., Cho, W.T., Lee, C.H., Ha, J.K., Song, K.B. In vitro degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 2010, 32, 12, 1921–1924.
9. Ju, J., Tinyiro, S.E., Yao, W., Yu, H., Guo, Y., Qian, H., Xie, Y. The ability of *Bacillus subtilis* and *Bacillus natto* to degrade zearalenone and its application in food. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, 43, e14122.
10. Kovač Tomas, M., Jurčević Šangut, I. New Insights into Mycotoxin Contamination, Detection, and Mitigation in Food and Feed Systems. *Toxins*, 2025, 17, 10, 515.
11. Vega, M.F., Diéguez, S.N., Riccio, B., Tapia, M.O., González, S.N. Zearalenone adsorbent based on a lyophilized indigenous bacterial *Lactobacillus plantarum* strain as feed additive for pigs: A preliminary study in vivo. *Current Microbiology*, 2021, 78, 1807–1812.
12. Wang, N., Wu, W., Pan, J., Long, M. Detoxification strategies for zearalenone using microorganisms: a review. *Microorganisms*, 2019, 7, 7, 208.
13. Xiang, M., Liu, P., Zhang, H. In Vitro Degradation of Zearalenone by Culture Supernatant of *Bacillus subtilis*. *Food and Bioprocess Technology*, 2024, 17, 2206–2215.
14. Xu, H., Wang, L., Sun, J., Wang, L., Guo, H., Ye, Y. Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed. *Critical Review Food Science and Nutrition*. 2022, 62, 18, 4951–4969.
15. Yazar, S., Omurtag, G.Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Science*, 2008, 9, 2062–2090.
16. Zhu, Y., Drouin, P., Lepp, D., Li, X.Z., Zhu, H., Castex, M., Zhou, T. A novel microbial zearalenone transformation through phosphorylation. *Toxins*, 2021,13, 5, 294.