

Łukasz Panasiuk

**Opracowanie wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w paszach
oraz ocena narażenia zwierząt**

Promotor:

dr hab. Piotr Jedziniak, prof. instytutu

Promotor pomocniczy:

dr inż. Małgorzata Gbylik-Sikorska

Streszczenie

Powszechna obecność zanieczyszczeń środowiskowych w paszach stanowi bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia zwierząt, jak również dla bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego, a w konsekwencji dla konsumenta. Wśród tych zanieczyszczeń na szczególną uwagę zasługują wtórne metabolity wytwarzane przez pleśnie na zbożach oraz paszach – mikotoksyny. W związku z tym, że bardzo trudno jest je wyeliminować, jedną ze strategii ich zwalczania jest ciągły monitoring pasz oraz materiałów paszowych. Dlatego tak ważne jest opracowywanie odpowiednio precyzyjnych oraz dokładnych metod analitycznych wykorzystujących najnowocześniejsze techniki takie jak chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), która odgrywa kluczowe znaczenie w oznaczaniu toksyn należących do różnych grup.

W związku z powyższym, opracowano i poddano walidacji dwie metody analityczne: metodę wieloskładnikową umożliwiającą oznaczanie 51 mikotoksyn w paszach oraz materiałach paszowych oraz metodę potwierdzającą przeznaczoną do oznaczania mikotoksyn z grupy B-trichotecenów. Wiarygodność obu metod została sprawdzona poprzez analizy materiałów referencyjnych, co potwierdziło jej przydatność do tego typu badań. Dodatkowo, metoda potwierdzająca została sprawdzona w badaniach biegłości, których wyniki były zadowalające. Opracowane metody dzięki zastosowaniu techniki LC-MS/MS umożliwiają wykrycie w krótkim czasie, w trakcie jednej analizy nawet kilkudziesięciu mikotoksyn, podczas jednej analizy.

Opracowane i zwalidowane metody wykorzystano do przebadania 374 próbek pasz w tym: pasz dla świń, bydła, drobiu, ryb, zwierząt towarzyszących i laboratoryjnych oraz 237 próbek materiałów paszowych w tym zbóż, kukurydzy, soi, rzepaku, suszonej hemoglobiny, DDGS oraz nasion bawełny.

Otrzymane wyniki świadczą o powszechnym występowaniu deoksyniwalenolu (DON) i zearalenonu (ZEN) w przebadanych paszach. W paszach dla świń, gatunku najbardziej narażonym na szkodliwe działanie mikotoksyn, toksyny te stwierdzono w odpowiednio w 63% oraz 81% próbek. W 2,80% oraz 1,40% pasz dla świń stwierdzono wyniki niezgodne dla DON i ZEN. Przekroczenia wartości orientacyjnej dla ZEN zostały stwierdzone również w kiszonkach z kukurydzy (1,60%). Wysoka częstość występowania tych mikotoksyn została również odnotowana w paszach dla zwierząt laboratoryjnych – oznaczane były w odpowiednio 56% i 85% próbek.

Modyfikowane mikotoksyny, a w szczególności deoksyniwalenol-3glukozyd (DON-3Glc), były często stwierdzane np. w paszach dla drobiu, w 63% przebadanych próbek. Z kolei, stosunek stężeń DON-3Glc do DON w paszach mieścił się w zakresie od 14% do 27%, co pokazuje, w jakim stopniu wyniki dla pasz badanych tylko pod kątem macierzystych mikotoksyn mogą być niedoszacowane.

Mikotoksyny, które potencjalnie stanowią zagrożenie dla konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego, czyli aflatoksyna B1 (AFL B1) oraz ochratoksyna A (OTA) były oznaczane w paszach sporadycznie i w niskich stężeniach.

Najczęściej stwierdzanymi związkami w przebadanych próbkach były „emerging mycotoxins”, do tej pory nieuwzględniane w oficjalnych programach monitoringowych. Enniatyny, bowerycyna oraz kwas tenauzonowy oznaczono m. in., w ponad 80% próbek pasz dla świń. W pozostałych matrycach to one były najczęściej występującymi związkami. Alkaloidy sporyszu były oznaczane rzadko i tylko w jednej próbce paszy dla bydła stwierdzono je w wysokim stężeniu powyżej 1800 µg/kg (suma związków). W kiszonkach z kukurydzy oznaczano również w na wysokim poziomie kwas mykofenolowy i rokefortynę C (nawet do 12250 i 20199 µg/kg).

W przypadku materiałów paszowych to kukurydza charakteryzowała się najwyższą częstością występowania mikotoksyn np. DON był oznaczany w 83%, zaś w zbożach w 55% próbek, w których również odnotowano najwyższe stężenie tej toksyny (14601 µg/kg). Warto zwrócić uwagę na stężenia AFL B1 w próbkach nasion bawełny pochodzących z importu, w których została stwierdzona w stężeniach przekraczających 60 µg/kg. Przeprowadzone analizy statystyczne potwierdziły również wysoką korelację pomiędzy

wybranymi toksynami np. DON i DON-3Glc w próbkach kukurydzy ($r=0,86$; $p<0,05$). Przedstawione wyniki w rozprawie w większości są spójne z tymi podanymi w piśmiennictwie.

Na uwagę zasługuje wysokie współwystępowanie mikotoksyn w paszach dla świń oraz drobiu: w ponad 80% przebadanych próbek oznaczono przynajmniej 10 mikotoksyn. W przypadku kukurydzy 70% próbek było zanieczyszczonych więcej niż 10 toksynami.

Na podstawie szacowanego dziennego pobrania i wartości NOAEL/LOAEL dokonano oceny narażenia zwierząt gospodarskich na obecność mikotoksyn wraz z modyfikowanymi formami w paszach. Na tej podstawie stwierdzono, że tylko świnie mogą być chronicznie narażone na DON i jego metabolity. Otrzymane wyniki badań potwierdzają zasadność prowadzenia dyskusji nad zmianą wartości orientacyjnej w paszach dla DON oraz uwzględniania również jego form modyfikowanych.

Summary

Ubiquitous occurrence of environmental contaminants in feed pose a direct threat to animals as well as to food of animal origin and consumers. Mycotoxins – a secondary metabolites produced by moulds spoiling a crops are included into this group. Since it is hard to eliminate them, one of the most efficient strategy for preventing contamination of feed and feed materials is their monitoring including wide range of harmful toxins. Therefore, a new, sensitive, reliable and trueness analytical methods for mycotoxins determination in different types of feedstuffs, applying liquid chromatography – tandem mass spectrometry technique (LC-MS/MS), play the major role.

In this study two analytical methods have been developed and validated: multi-analytes method for determination of 51 mycotoxins in feedstuffs and feed materials as well as confirmatory method for determination of B-trichothecenes. The methods trueness have been verified using reference materials and the results were satisfactory. Additionally, trueness of confirmatory methods has been assessed by a proficiency test which proved its reliability. Both methods are fast and simple, moreover the application of LC-MS/MS technique allowed to determination of several contaminants in one run.

Described methods have been used for the determination of multi-mycotoxins in 374 samples of feed intended for: pigs, cattle, poultry, fishes, companion and laboratory animals and 237 samples of feed materials including: cereals, maize, soya, rape, dried haemoglobin, DDGS and cotton seed.

The results shows that deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) occurred commonly in tested feed samples. In feed for pigs these analytes have been detected in 63% and 91% samples, respectively. In 2.80% and 1.40% of sampled DON and ZEN exceed the EU guidance values. The concentration of ZEN over EU guidance value was also found in maize silage (1.60% of samples). These toxins were found with high occurrence in 56% and 85% of laboratory animal feed samples, respectively.

Modified mycotoxins, especially deoxynivalenol-3glucoside (DON-3Glc), have been frequently determined in analysed samples e.g. DON-3Glc was found in 70% maize samples. The DON-3Glc to DON ratio in the feedstuffs ranged from 14% to 27%, therefore the total content of parent mycotoxin could be underestimated.

Mycotoxins which pose the highest risk for food of animal origin, i.e. aflatoxin B1 (AFL B1) and ochratoxin A (OTA) have been quantified rarely, in low concentrations and do not pose any threat for animal health.

The most frequently quantified toxins in this study were “emerging mycotoxins” – toxins which are not included in the official feeds control program. Enniatins, beauvericin and tenazonic acid were determined in over the 80% of feedstuffs for pigs. In other matrix were also the most frequent found toxins. Ergot alkaloids were detected in trace amounts, and only in one sample were quantified in high concentration above 1800 µg/kg (sum of compounds). In maize silage mycophenolic acid and roquefortine C were also determined in high concentration (even to 12250 and 20199 µg/kg).

Regarding to feed materials, maize showed the most frequent occurrence of mycotoxins, e.g. DON was found in 83% of samples, compare to 55% of cereals samples, where also the highest concentration was noticed (14601 µg/kg). It is worth to note high concentration of AFL B1 in imported cotton seed, where the toxin was determined in concentrations above 60 µg/kg. The high correlation of co-occurrence between DON and DON-3Glc in maize was also noted ($r= 0.86$, $p<0.05$). In general, obtained results are in agreement with other papers.

The high co-occurrence of mycotoxins in feedstuffs for pigs and poultry needs to be highlighted: over 80% of samples were contaminated with at least 10 fungal toxins. When it comes to maize, 70% of samples were contaminated with at least 10 mycotoxins.

Moreover, assessment of farm animals exposure to mycotoxins through ingestion of contaminated feed was conducted. Estimated daily intake for mycotoxins in animals has been calculated as well as hazard quotient expressed as a ratio between estimated daily intake and NOAEL or LOAEL value. The results showed, that only pigs are chronically exposed to DON and its metabolites, which highlighted the necessity to verify guidance values for DON and its modified forms in feeds.