

**PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

ZAKŁAD RADIOBIOLOGII

Marek Pajurek

**ANALIZA PORÓWNAWCZA
STEŻEŃ ORAZ PROFILI DIOKSYN
I POLICHLOROWANYCH BIFENYLI W PASZACH**

praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Krzysztofa Kwiatka

Puławy
2021

VII. STRESZCZENIE

Dioksyny i furany (PCDD/PCDF) oraz polichlorowane bifenyle (PCB) stanowią grupę niepożądanych substancji chemicznych w paszach, zaliczanych do trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO). Związki te, choć występują w niskich stężeniach są wysoce toksyczne i podlegają bioakumulacji w poszczególnych ogniwach łańcucha żywnościowego. W rezultacie do organizmu konsumenta docierają głównie drogą pokarmową, przy czym dominującym źródłem jest żywność pochodzenia zwierzęcego (około 80%). Natomiast u zwierząt głównym źródłem narażenia pokarmowego na dioksyne, furany i PCB są pasze, którymi są skarmiane zwierzęta gospodarskie. Dlatego też pasze, w tym materiały paszowe, zawierające dioksyne, furany i PCB są głównie odpowiedzialne za obecność tych zanieczyszczeń w surowcach i produktach żywieniowych pochodzenia zwierzęcego.

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań i uzyskanie danych w zakresie poziomów zanieczyszczenia dioksynami oraz PCB dostępnych na rynku krajowym pasz, w tym materiałów paszowych, oraz dokonanie wielokierunkowej analizy ryzyka. W ten sposób zostały również stworzone podstawy do kompleksowej oceny polegającej na określeniu m.in.: poziomów tła, trendów czasowych, charakterystyki profili, częstości występowania stężeń ponadnormatywnych, częstości występowania poszczególnych kongenerów. Oszacowano narażenie zwierząt gospodarskich na dioksyne na podstawie matematycznego modelu transferu dioksyn i furanów z pasz do zwierząt, co umożliwiło przeprowadzenie oceny zagrożenia i ryzyka dla konsumentów. W badaniach 503 materiałów paszowych pod kątem 35 kongenerów dioksyn, furanów i PCB zastosowano metodę opartą na technice rozcieńczeń izotopowych (IDMS) z separacją analitów wysokorozdzielczą chromatografią gazową sprzężoną z wysoko rozdzielczą spektrometrią mas (HRGC-HRMS). Metoda ta, jako jedyna pozwala na tzw. analizę tła, dostarcza pełnych informacji o poziomie stężeń występujących kongenerów.

Przeprowadzone badania pozwoliły na uzyskanie informacji o poziomach dioksyn i związków pokrewnych w paszach. W ich wyniku stwierdzono, że średnia zawartość sumy PCDD/PCDF \pm SD oraz sumy dl-PCB \pm SD wyrażona w ng WHO-TEQ/ kg paszy o zawartości wody 12% wynosiła odpowiednio: w materiałach roślinnych $0,26 \pm 0,83$ oraz $0,03 \pm 0,04$; w olejach roślinnych $0,19 \pm 0,30$ oraz $0,11 \pm 0,17$; w materiałach pochodzenia mineralnego $0,38 \pm 0,93$ oraz $0,02 \pm 0,01$; w olejach rybnych $2,04 \pm 2,44$ oraz $3,11 \pm 2,30$; w mączkach rybnych $0,52 \pm 0,37$ oraz $0,64 \pm 0,45$; w tłuszczach pochodzenia zwierzęcego $0,32 \pm 0,34$ oraz $0,68 \pm 1,63$; w pozostałych produktach zwierząt lądowych $0,05 \pm 0,01$ oraz $0,03 \pm 0,02$; w mieszankach paszowych $0,07 \pm 0,05$ oraz $0,04 \pm 0,09$; w karmach dla zwierząt domowych i ryb $0,20 \pm 0,23$

oraz $0,44 \pm 0,76$. Średnia zawartość sumy ndl-PCB \pm SD wyrażona w $\mu\text{g}/\text{kg}$ paszy o zawartości wody 12% wynosiła w materiałach roślinnych $0,06 \pm 0,08$, w olejach roślinnych $0,17 \pm 2,60$, w materiałach pochodzenia mineralnego $0,04 \pm 0,01$, w olejach rybnych $32,82 \pm 16,05$, w mączkach rybnych $5,86 \pm 3,38$, w tłuszczach pochodzenia zwierzęcego $5,85 \pm 20,78$, w pozostałych produktach zwierząt lądowych $0,20 \pm 0,30$, w mieszankach paszowych $0,50 \pm 1,71$, w karmach dla zwierząt domowych i ryb $5,02 \pm 8,67$. Najbardziej zanieczyszczone były oleje rybne, mączki rybne oraz tłuszcze pochodzenia zwierzęcego. Stwierdzono, że poziomy dioksyn i PCB (średnie, mediany oraz średnie dla „poziomów tła”) w materiałach paszowych pochodzenia zwierzęcego są wyższe niż w materiałach paszowych pochodzenia roślinnego. Mieszanki paszowe dedykowane konkretnym zwierzętom gospodarskim (bydło, świnia, drób) zawierały dioksyny i PCB poniżej LOQ metody analitycznej. Dlatego też nie można było określić relacji pomiędzy uśrednionymi profilami dioksyn i PCB w mieszankach paszowych przeznaczonych dla określonych grup zwierząt, a profilami w tkankach tych zwierząt. W okresie badawczym (2013-2018), dla trzech najbardziej licznych wśród analizowanych kategorii pasz (materiały roślinne, mączki rybne oraz mieszanki paszowe), wykazano występowanie trendu malejącego odnośnie PCDD/PCDF dla materiałów roślinnych. Stwierdzono również powolny trend malejący dla PCCD/PCDF, dl-PCB, ndl-PCB na podstawie analizy regresji dla wartości mediany w przypadku mieszanek paszowych. Dla kategorii mączek rybnych nie stwierdzono zmiany stężeń dioksyn i PCB w badanym okresie.

Profile kongenerów w obrębie badanych kategorii materiałów paszowych w przypadku PCDD/PCDF oraz ndl-PCB wykazywały zróżnicowanie, natomiast dla dl-PCB miały jeden charakterystyczny profil kongenerów. Analizując profile kongenerów PCDD/PCDF wyrażone w WHO-TEQ (uwzględniających wkład w toksyczność dla poszczególnych kongenerów) dla materiałów paszowych stwierdzono, że można wyodrębnić trzy charakterystyczne typy profili dla: materiałów pochodzenia roślinnego, zwierzęcego oraz mineralnego.

Przekroczenia w zakresie dopuszczalnych poziomów sumy PCDD/PCDF, PCDD/PCDF/dl-PCB i ndl-PCB (277/2012/UE) stwierdzono w 19 (4%) próbkach pasz na 503 ogółem przebadanych. Spośród próbek niezgodnych, największą grupę stanowiły materiały paszowe pochodzenia roślinnego (47%), a następnie w malejącej kolejności: oleje roślinne i tłuszcze pochodzenia zwierzęcego (16%), materiały pochodzenia mineralnego (11%) oraz oleje rybne i mączki rybne (5%). Przekroczenia dopuszczalnych limitów dioksyn w kategorii materiałów paszowych pochodzenia roślinnego spowodowane były wyłącznie przez materiały suszone (wysłodki, susz z lucerny, susz z jabłek). Spośród trzech ustalonych prawem unijnym dopuszczalnych poziomów (PCDD/PCDF, PCDD/PCDF/dl-

PCB i ndl-PCB), limit dla sumy PCDD/PCDF był najczęściej przekraczany, aż w 16 z 19 wszystkich wykrytych przekroczeń ML co stanowi 84% przypadków. Ponadto dla 7 (1%) próbek odnotowano stężenia badanych substancji przekraczające, zgodnie z rozporządzeniem 277/2012/UE, progi podejmowania działań (AL).

W niniejszej pracy oszacowano narażenie zwierząt gospodarskich na dioksyny na podstawie matematycznego modelu transferu dioksyn i furanów z pasz do zwierząt (www.feedfoodtransfer.nl). Wybrano trzy gatunki zwierząt (kura nioska, bydło mleczne, świnia rzeźna), dla których dobrano zgodnie z zaleceniami żywieniowymi oznaczone w tej pracy materiały paszowe przekraczające ML. Na podstawie przeprowadzonej symulacji transferu dioksyn z zanieczyszczonych pasz do tkanek zwierząt obliczone zostały stężenia PCDD/PCDF w jajach kurzych, mleku krowim oraz mięsie wieprzowym. Umożliwiło to przeprowadzenie oceny zagrożenia i ryzyka dla konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego. Ocenę ryzyka dokonano porównując poziom narażenia konsumenta w wyniku tygodniowego spożycia zgodnie z zaleceniami żywności (jaja, mleko, mięso) z dawką tolerowanego tygodniowego pobrania (TWI), która wynosi 2 pg WHO-TEQ kg m.c. na tydzień. Dla statystycznej osoby dorosłej spożycie skażonego mleka powodowałoby blisko 4-krotne przekroczenie TWI, w przypadku dzieci byłoby to aż 16-krotne przekroczenie TWI. Spożycie najbardziej skażonych jaj kurzych oraz wieprzowiny powodowałoby narażenie dla osoby dorosłej na poziomie odpowiednio 95% i 82% dawki TWI, natomiast dla dzieci narażenie na poziomie odpowiednio 149% i 144% dawki TWI. W modelowej symulacji transferu nie zostały uwzględnione dl-PCB, mimo to stwierdzono znaczące przekroczenia TWI.

Realizacja założonych celów badawczych w niniejszej dysertacji umożliwiła kompleksową ocenę występowania dioksyn i PCB w różnych kategoriach pasz. Badania, które przeprowadzono wpisują się w realizację celów strategicznych UE w zakresie dioksyn i związków pokrewnych, której głównym zadaniem jest redukcja narażenia populacji europejskiej na toksyczne działanie dioksyn.

VIII. SUMMARY

Dioxins, furans (PCDD/PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB) are a group of undesirable chemicals in feed which are classified as persistent organic pollutants (POPs). Even if these compounds are present on low concentrations, they are highly toxic and bioaccumulate in the food chain. As a result, they enter the consumer's body mainly through the oral route, with food of animal origin being the predominant source (about 80%). In contrast, in animals the main source of dietary exposure to dioxins, furans and PCBs are feeds which are fed to livestock. Therefore, feed, including feed materials, containing dioxins, furans and PCBs are mainly responsible for the presence of these contaminants in food of animal origin.

The aim of this study was to conduct extensive research and obtain data on the levels of dioxins and PCBs contamination available on the domestic market of feeds, including feed materials, and to perform a risk analysis. In this way, the basis for a comprehensive assessment was also created, consisting in determining, among others: background levels, time trends, profile characteristics, the frequency of over-standard concentrations, the frequency of occurrence of individual congeners. Estimated exposure of farm animals to dioxins based on a mathematical model of the transfer of dioxins and furans from the feed to the animals, which made it possible to assess the hazards and risks to consumers. The analysis of 503 feed materials for 35 congeners of dioxins, furans and PCBs was based on isotope dilution mass spectrometry method (IDMS) with high resolution gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HRGC-HRMS). This method is the only one that allows so-called background analysis and provides complete information on the concentration levels of the present congeners.

The study provided information on the levels of dioxins and related compounds in feeds. The mean content of total PCDD/PCDF \pm SD and total dl-PCB \pm SD expressed in ng WHO-TEQ/ kg of feed with 12% water content was respectively: in feed materials of plant origin 0.26 ± 0.83 and 0.03 ± 0.04 ; in vegetable oils 0.19 ± 0.30 and 0.11 ± 0.17 ; in materials of mineral origin 0.38 ± 0.93 and 0.02 ± 0.01 ; in fish oils 2.04 ± 2.44 and 3.11 ± 2.30 ; in fish meals 0.52 ± 0.37 and 0.64 ± 0.45 ; in animal fats 0.32 ± 0.34 and 0.68 ± 1.63 ; in other land animal products 0.05 ± 0.01 and 0.03 ± 0.02 ; in compound feeds 0.07 ± 0.05 and 0.04 ± 0.09 ; in compound feeds for pet animals and fish 0.20 ± 0.23 and 0.44 ± 0.76 . The mean content of total ndl-PCB \pm SD expressed in μ g/kg of feed with 12% water content was 0.06 ± 0.08 in feed materials of plant origin 0.17 ± 2.60 in vegetable oils, 0.04 ± 0.01 ; in materials of mineral origin

32.82±16.05, in fish meals 5.86±3.38, in animal fats 5.85±20.78, in other land animal products 0.20±0.30, in compound feeds 0.50±1.71, in compound feeds for pet animals and fish 5.02±8.67. Fish oils, fish meals and fats of animal origin were the most contaminated. The levels of dioxins and PCBs (mean, median and mean for "background levels") were found to be higher in feed materials of animal origin than in feed materials of plant origin. Compound feeds dedicated to specific farm animals (cattle, pig, poultry) contained dioxins and PCBs below the LOQ of the analytical method. Therefore, the relationships between the averaged dioxin and PCB profiles in compound feeds dedicated to specific groups of animals and the profiles in the tissues of these animals could not be determined. During the study period (2013-2018), for the three most abundant among the analyzed feed categories (plant materials, fish meals and compound feeds), a decreasing trend was found with respect to PCDD/PCDF for plant materials. Also, a slowly decreasing trend was found for PCDD/PCDF, dl-PCB, ndl-PCB on the basis of regression analysis for the median value for compound feeds. For fish meals category no change in dioxin and PCB concentrations was found during the study period.

The congener profiles of the investigated categories of feed materials for PCDDs/PCDFs and ndl-PCBs showed differentiation, whereas for dl-PCBs they had one characteristic congener profile. Analyzing the PCDD/PCDF congener profiles expressed in WHO-TEQ (taking into account the contribution to toxicity for individual congeners) for feed materials, it was found that three characteristic types of profiles could be identified for: materials of plant, animal and mineral origin.

Exceedances of the acceptable levels for the sum of PCDD/PCDFs, PCDD/PCDF/dl-PCBs and ndl-PCBs (277/2012/EU) were found in 19 (4%) feed samples out of the total 503 tested. Among the non-compliant samples, feed materials of plant origin constituted the largest group (47%), followed in decreasing order by vegetable oils and fats of animal origin (16%), materials of mineral origin (11%) and fish oils and fish meals (5%). The exceedances of dioxin limits in the category of feed materials of plant origin were exclusively caused by dried materials (sugar beet pellets, dried alfalfa, dried apple pomace). Out of the three EU legal limits (PCDD/PCDFs, PCDD/PCDF/dl-PCBs and ndl-PCBs), the limit for the sum of PCDD/PCDFs was exceeded most frequently, in 16 out of 19 total ML exceedances detected, which represents 84% of the cases. Furthermore, for 7 (1%) samples concentrations of test substances exceeding the action levels (AL) according to Regulation 277/2012/EU were recorded.

In this study, the exposure of livestock to dioxins was estimated based on a mathematical model of dioxin and furan transfer from feed to animals

(www.feedfoodtransfer.nl). Three animal species were selected (laying hen, dairy cattle, slaughter pig). According to the nutritional recommendations, the feed materials for these animals were chosen. Only materials exceeding the ML designated in this work were used. On the basis of performed simulation of dioxin transfer from contaminated feeds into animal tissues, concentrations of PCDD/PCDF in eggs, cow milk and pig meat were calculated. This allowed performing the hazard and risk assessment for consumers of foods of animal origin. The risk was assessed by comparing the level of consumer exposure from weekly consumption as recommended for the food (eggs, milk, meat) with the tolerable weekly intake (TWI), which is 2 pg WHO-TEQ kg body weight per week. For a statistical adult, the consumption of contaminated milk would cause the TWI to be exceeded nearly 4 times, and in the case of children it would be 16 times the TWI. Consumption of the most contaminated hen eggs and pork would result in exposure to an adult of 95% and 82% of the TWI dose, respectively, and exposure to children of 149% and 144% of the TWI dose, respectively. The model transfer simulation did not take into account dl-PCB, nevertheless significant TWI exceedances were found.

The realization of the research objectives in this dissertation enabled a comprehensive assessment of the occurrence of dioxins and PCBs in different feed categories. The research that has been conducted is in line with the implementation of the EU's strategic goals in the field of dioxins and related compounds, which the main task is to reduce the exposure of the European population to toxic effects of dioxins.