

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINTE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ ” ION IONESCU DE LA BRAD ” IAȘI
DOMENIUL: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: ZOOIGIENĂ**

Dr. med. vet. PANAGACHI-TĂNASĂ MIHAELA,

căsătorită GOGU

TEZA DE DOCTORAT

**POTENȚIALUL TOXIC AL SUBSTRATURILOR
VEGETALE FOLOSITE ÎN HRANA OMULUI ȘI A
ANIMALELOR EVALUAT PRIN INVESTIGAȚII
MICOLOGICE ȘI MICOTOXINICE**

Conducător științific,

Prof. Univ. Dr. COMAN IOAN

IAȘI

2012

REZUMAT

Cuvinte cheie: micromicete, micotoxine, nutrienți, risc, control

Teza de doctorat intitulată „**Potențialul toxic substraturilor vegetale folosite în hrana omului și a animalelor evaluat prin investigații micologice și micotoxice**” este extinsă pe 272 de pagini și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale în două părți principale: prima parte intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**” este elaborată pe parcursul a 69 de pagini și conține 7 tabele și 15 figuri, iar partea a II-a, „**Cercetări proprii**” cuprinde 194 de pagini, 28 de tabele și 64 de figuri, pentru o prezentare sintetică și reprezentativă a rezultatelor obținute.

În primul capitol, intitulat „**Caracterizarea biologică a principalelor genuri de micromicete implicate în contaminarea substraturilor vegetale**”, sunt prezentate date din literatura de specialitate referitoare la considerațiile generale privind micromicetele, cu o trecere în revistă a genurilor dominante de micromicete toxigene care contaminează frecvent substraturile alimentare, respectiv caracterizarea biologică a unor specii din genul *Aspergillus*, *Penicillium* și *Fusarium* precum și importanța afecțiunilor pe care le determină.

Al doilea capitol intitulat „**Contaminarea micotoxinică a substraturilor vegetale apreciată prin prisma limitelor maxime admisibile**”, este structurat în două subcapitole în care sunt prezentate date din literatura de specialitate referitoare la incidența micotoxinelor în substraturile vegetale și în produsele de origine animală, descrie pe scurt micotoxinele implicate mai frecvent în patologia omului și a animalelor și o trecere în revistă a legislației referitoare la controlul reziduurilor de micotoxine în substraturile nutritive.

Micotoxinele, factori de risc majori pentru sănătatea omului și a animalelor sunt peste tot și oriunde. Ele au fost puse în evidență în boabele de cereale (porumb, grâu, orz, ovăz, orez, sorg, secară) și de leguminoase (arahide, soia, fasole, mazăre), în toate produsele și subprodusele acestora (pâine, aluat, prăjituri, franzeluțe de mălai), în semințele de oleaginoase (floarea-soarelui, bostan, miez de nucă), în legume și fructe, proaspete sau conservate (morcov, ardei, tomate, pătrunjel, mere, pere, gutui, citrice, smochine, kiwi, piersici, caise), în preparate (compot, dulceață, gem, peltea) și sucuri naturale, în bere, must, vin, cidru, în condimente (piper verde, negru sau alb, parika, curry, oregano, cimbru, boia de ardei), în plante medicinale (sunătoare, frunze de patlagină).

În ultimul capitol al părții intitulat „**Metode analitice actuale de izolare, identificare și evaluare a micotoxinelor**” sunt descrise metodele utilizate pentru determinarea reziduurilor de

micotoxine și procedurile analitice disponibile în acest domeniu. De la descoperirea micotoxinelor, au fost dezvoltate multe metodologii de determinare a acestora. Metodele folosite în mod curent pentru evidențierea și determinarea cantitativă a micotoxinelor se bazează pe principiu tehnicii cromatografice, mai importante fiind cromatografia în strat subțire (CSS), cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu diferite tipuri de detectoare (UV, DAD, MF) sau spectrometrie de masă (MS), gaz-cromatografia (GC), cuplată cu detectoare cu captura de electroni (ECD), cu ionizare în flacără (FID) sau detectoare tip MS. În ultimii ani, cromatografia lichidă cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS) a dobândit un statut de dominanță datorită avantajelor pe care le prezintă, în primul rând posibilitatea determinării simultane a mai multor categorii de micotoxine (Rudolf Krska și col., 2008, Rahmani și Soleimany, 2009, Maragos și Busman, 2010)

Partea a II-a tezei de doctorat reprezintă aproximativ 70% din volumul total. Ea este structurată în 10 capitole, care includ scopul și obiectivele investigațiilor întreprinse, materialele și metodologiile de lucru, cadrul instituțional care a permis efectuarea cercetărilor, precum și rezultatele obținute și interpretate prin prisma bibliografiei consultate.

Cercetările efectuate au avut o desfășurare stadială, ele au urmărit cu rigurozitate planul de lucru individual rezultatele unei etape constituind obiectivele ce urmau a fi realizate în etapa imediat următoare.

Calitatea substraturilor vegetale folosite în hrana omului și a animalelor a fost apreciată prin examene micologice și micotoxice.

În acest scop au fost prelevate 159 probe, reprezentate de boabe de cereale (porumb, grâu, secară, orz, ovăz), semințe de oleaginoase (soia, fl-soarelui, arahide), boabe de cafea, năut, fasole, fistic, șroturi de fl-soarelui și de rapiță.

Gradul de contaminare fungică a celor 87 de eșantioane reprezentând substraturi vegetale ce intră în mod obișnuit în hrana omului, a fost foarte ridicat, chiar dacă numărul unităților formatoare de colonii (UFC/g) variază în limite foarte largi, cu valori minime ce le conferă statutul „libere de micromiceti”, dar și cu valori maxime de 1450×10^3 UFC/g.

Boabele de porumb și grâu furajer, dar mai ales nutrețurile combinate au depășit constant limita maximă admisă de 50×10^3 UFC/g.

Flora micotică ce domină produsele alimentare care intră în mod obișnuit în hrana animalelor este reprezentată de specii aparținând genurilor *Penicillium* (73,56%), *Aspergillus* (52,87%), *Cladosporium* (41,38%) și *Fusarium* (34,48%). În proporție mai mică au fost detectate micromicetele levurice (33,33%), mucoraceele (25,29%), *Alternaria* (19,54%) și *Stachybotris* (11,49%).

Micromicetele izolate și identificate din furaje au avut limite de variație extrem de larg, iar dominate s-au dovedit speciile aparținătoare genurilor *Aspergillus* (58,33), *Penicillium* (43,06)%, *Fusarium* (36,11%) și *Cladosporium* (15,89%). Fungii levuriformi (15,28%), mucoraceele (19,44%), *Alternaria* (5,56%) și *Scopulariopsis* (4,17%) au completat mozaicul fungic al acestor sortimente.

Au fost izolate și identificate pentru prima dată la noi în țară specia *Cunninghamella* *CNO12*, dar și sușa toxigenă *Penicillium purpurogenum*.

Au fost prezentate sub forma unor tabele sinoptice caracterele morfologice macro și microscopice de diferențiere a speciilor încadrate taxonomic în genurile *Penicillium*, *Aspergillus* și *Fusarium*.

Examenle efectuate în câmp întunecat cu lumină UV pentru evaluarea potențialului toxic al alimentelor și al furajelor a permis identificarea a 11 sușe de micromicete ce s-au dovedit fluorescente în lumina UV cu $\lambda=366\text{nm}$, cinci dintre ele dovedindu-se capabile să sintetizeze micotoxine de tipul aflatoxinelor B1 și B2, ochratoxinei A și sterigmatocistinei. Aceste tulpini toxigene izolate din substraturile nutritive sunt dovezi care atestă că alimentele și furajele infestate cu fungi toxigeni pot deveni nocive pentru sănătatea omului și a animalelor.

Pentru evidențierea și cuantificarea micotoxinelor existente în diverse alimente și nutrețuri s-au folosit tehnici relativ simple de screening (cromatografia în strat subțire sau tehnica ELISA de tip competitiv), dar și metode de referință (HPLC).

Rezultatele examenului micotoxinic al celor 87 probe de alimente examinate prin screening cromatografic (CSS) au evidențiat că 29,8% probe au fost contaminate cu aflatoxine, ochratoxine, zearalenona și sterigmatocistina.

Din 72 probe de furaje analizate, 48,61% au fost contaminate cu micotoxine (aflatoxine, ochratoxina A, zearalenona și sterigmatocistina), cele mai afectate fiind boabele de porumb și nutrețurile combinate.

Pentru analize de mai mare sensibilitate, sunt recomandate tehnici înalt performante precum HPLC-FLD cu derivatizare (pentru aflatoxine).

S-au urmărit efectele toxice ale micotoxinelor prin reproducerea experimentală a intoxicației puilor broiler cu deoxinivalenol, ochratoxină A și aflatoxina B1. Efectele induse de intoxicație s-au reflectat în heterogenitatea puilor din fiecare lot și în reducerea sporului zilnic în greutate.

Organele implicate în metabolizarea micotoxinică directă au fost recoltate și analizate prin ELISA și HPLC-FLD în vederea redescoperirii micotoxinelor sub formă de reziduuri.

Astfel, dacă inițial greutatea corporală medie a puilor din lotul care a ingerat DON a fost 76,5g și a celor din lotul martor de 75,8g, după 7 zile puștii s-au diferențiat gravimetric cu

diferențe de 85,83g în favoarea celor din lotul martor, pentru ca după 21 de zile perioadă în care au primit cca 371,68 μg DON /kg g.c.m puii din lotul martor au avut greutatea medie de 420,1g, iar cei din lotul intoxicat doar 226g cu o diferență de 194,1g/pui. Aceeași dinamică disproporțională a fost constatată și în cazul puiilor care au primit OTA, respectiv aflatoxina B₁.

Potențialul toxic al organelor și al țesuturilor provenite de la puiii intoxicați experimental cu deoxinivalenol (DON) a fost evaluat prin tehnica ELISA. A fost îmbunătățită tehnica de lucru prin introducerea unei etape de degresare cu eter de petrol a probelor de ficat și rinichi recoltate de la puiii intoxicați experimental.

Rezultatele obținute au evidențiat clar prezența DON în structurile tisulare ale organismului intoxicat, dar cu deficiențe de sensibilitate în funcție de varianta de extracție folosită.

Extractele probelor examinate prin ELISA obținute prin tehnica îmbunătățită, printr-o fază suplimentară de degresare, au evidențiat o sensibilitate mai mare, în sensul că probele au fost sensibile în proporție de 100%, cu concentrații detectabile de DON atât în ficat, unde acestea au oscilat între 28, 28 ppb și 38,61 ppb-uri, cât și în rinichi unde limitele de variație au fost cuprinse între 22, 14 și 48,40 ppb-uri.

S-au determinat reziduurile tisulare de ochratoxină A folosind kitul comercial RIDASCREEN OTA și metoda HPLC cu detector de fluorescență. Rezultatele obținute analizate comparativ evidențiază diferențe semnificative privind gradul de contaminare cu OTA a aceluiași substraturi.

Astfel, în rinichi a fost cuantificată OTA în toate cele 10 probe supuse analizei, dar prin testul imunoenzimatic cantitățile sunt incomparabil mai mari oscilând între 1,760 - 5,122 ng/g decât cele detectate prin HPLC-FLD, unde limitele de variație au fost cuprinse între 0,496 ng/g și 1,465 ng/g.

În ficat diferențele sunt și mai frapante deoarece metoda HPLC a eliminat șase probe pozitive OTA. În patru eșantioane hepatice reziduurile detectabile de ochratoxină au fost cuprinse între 0,430 și 0,937ng/g.

Pentru determinarea rezidurilor de micotoxină din probele de ficat și rinichi recoltate de la puiii intoxicați experimental, s-au folosit kituri comerciale RIDASCREEN[®] AFLATOXIN B₁

Rezultatele obținute au indicat un nivel maxim de AFB₁ de 464.92 ± 6.2 ng / mL după 21 de zile de intoxicație acută, în ficatul puilor din grup E1 și doar 15.59 ± 6.1 ng / mL în ficatul puilor din grupul E2 la sfârșitul experimentului. În rinichi s-au detectat 500ng/g micotoxină la puiii intoxicați timp de 21 de zile.

În cadrul unei analize complete s-au prezentat avantajele și dezavantajele pe care le prezintă, diferite metode analitice (CSS, GC, ELISA, HPLC, LC-MS) și alte metode mai puțin

invazive. Din bibliografia consultată s-a desprins tendința de abandonare a tehnicilor care prezintă un risc poluanat mai mare precum CSS, în favoarea celor de referință.

Cromatografia în strat subțire poate servi atât ca pas de purificare cât și de cuantificare însă mulți factori pot afecta în mod negativ separarea și cuantificarea CSS. Tehnica de lucru CSS propusă de Coman și col, 1978 pentru screening-ul rapid al unui număr mare de probe, asigură o fluorescență bună micotoxinelor, motiv pentru care studiul actual o întregeste sub raportul estimării aproximativ cantitative.

Conform literaturii de specialitate o cantitate de aproximativ 0,5 ng/μL poate fi detectată într-un spot cu florescența minimă, fie vizual sau instrumental. (AOAC, FAO)

Pentru determinarea limitei de detecție a tehnicii și realizarea curbei etalon pentru ochratoxina A și aflatoxina B1, la linia de start în mijlocul fiecărui culoar de migrare, s-au spotat, în dublu exemplar cantități cunoscute de micotoxină standard.

A fost elaborată și îmbunătățită tehnica clasică de cromatografie, denumită CSS de tip fluorodensitometric, care permite identificarea simultană de micotoxine, respectiv separarea și evaluarea AFB1 până la 5 ng/spot, iar a OTA până la 10 ng/spot.

Amploarea fenomenului de contaminare micotoxinică a substraturilor vegetale la nivelul biosferei este atât de intensă încât se poate afirma că micotoxinele au devenit un poluant planetar, de vreme ce ele au fost evidențiate pe toate meridianele lumii, din ținuturile reci și umede ale Rusiei (Siberia) și și până în arhipelagul Japoniei, în Australia sau Noua Zeelandă; din Regatul Unit al Marii Britanii până în zonele aride ale Africii de Sud. Aceste afirmații îndrăznețe sunt susținute de cercetarea științifică riguroasă, care din nefericire, nu are forța de a evidenția decât vârful icebergului, deoarece numai în câteva țări se aplică un program strategic preventiv de control micotoxicologic.