ОГРАНИЧАВАНЕ НАЛИЧИЕТО НА МИКОТОКСИНИ. СТРАТЕГИИ ЗА ОСИГУРЯВАНЕ НА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИ И ФУРАЖИ

РЕЗЮМЕ

Този преглед има за цел да разгледа разширяващите се постижения в областта на познанията за микотоксините и ограничаване наличието им в храните за хората и във фуражите. Учените се насочват в своето търсене към решения, диаметрално противоположни едно на друго: от използване на природни механизми или фактори за въздействие върху разпространението на токсични гъбички до създаване на напълно нови иновативни геномни технологии за преодоляване на експозицията на хора и животни на токсини, продуцирани от токсогенни гъбички. Спектърът на описаните стратегии и методи обхваща физични, химични и биологични подходи за намаляване на микотоксини в храни и фуражи. Бъдещето ще покаже кой от тях притежава повече жизненост и потенциал да се справи с тази нелесна задача, поставена ни от природата.

ABSTRACT

This review aims at considering the expanding achievements in the area of mycotoxin knowledge as well as limiting their presence in food and feed. Scientists target in their searches towards decisions diametrically opposite to each other: from making use of natural mechamisms or factors to effect the spread of toxic fungy to creating completely new and also innovative genomic technologies to overcome human and animal exposure to toxins produced by toxogenic fungy. The scope of strategies and methods described hereafter comprise of physical, chemical and biological approaches to minimise micotoxins in food and feed. The future will show which of them own more vitality and potencial to solve this difficult assignment given us by the nature.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. **ПРИРОДА НА МИКОТОКСИНИТЕ**
2. **ЛИМИТИРАЩИ ФАКТОРИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НАЛИЧИЕТО НА МИКОТОКСИНИ В ХРАНИ И ФУРАЖИ**
3. **ТЪРГОВИЯТА КАТО РИСКОВ ФАКТОР**
4. **ХАРАКТЕРИСТИКА НА РЕГУЛИРАНИ МИКОТОКСИНИ**
5. ***AFLATOXINS*/АФЛАТОКСИНИ**
6. ***OCHRATOXIN A*/ОХРАТОКСИН А**
7. ***PATULIN*/ ПАТУЛИН**
8. ***FUSARIUM FUNGI*/ ФУЗАРИУМНИ ГЪБИ**
9. **УСТОЙЧИВОСТ НА ТОКСОГЕННИ ГЪБИЧКИ И МИКОТОКСИНИ**
10. **МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА МИКОТОКСИНИ**
11. **КОМБИНИРАНА ЕКСПОЗИЦИЯ**
12. **НАМАЛЯМАНЕ НИВАТА НА МИКОТОКСИНИ ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА**
13. **ПРЕВАНТИВНИ МЕТОДИ, ПРИЛАГАНИ „НА ПОЛЕТО“**
14. **МЕРКИ СЛЕД ПРИБИРАНЕ НА РЕКОЛТАТА**
15. **БИОЗЕМЕДЕЛИЕ**
16. **СТРАТЕГИИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НА СЪДЪРЖАНИЕТО НА МИКОТОКСИНИ В СУРОВИНИ И ПРОДУКТИ:**
    - **А. ФИЗИЧНИ МЕТОДИ**
    - **Б. ХИМИЧНИ МЕТОДИ**
    - **В. БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ; БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЧРЕЗ ЕНЗИМИ**
    - **Г. МЕТОДИ ЗА ДЕТОКСИКАЦИЯ ПРИ ХРАНИ**
    - **Д. НЯКОИ ПРАКТИЧЕСКИ ПРИЛОЖИМИ НАЧИНИ ЗА ДЕТОКСИКАЦИЯ НА КОМБИНАЦИИ ОТ МИКОТОКСИНИ**

Е. БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ - БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЧРЕЗ ЕНЗИМИ
Ж. МЕТОДИ ЗА ДЕТОКСИКАЦИЯ ПРИ ХРАНИ
З. ДРУГИ ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ДЕТОКСИКАЦИЯ НА МИКОТОКСИНИ
17. ИЗВОДИ
18. КАКВО ПРЕДСТОИ

1. ПРИРОДА НА МИКОТОКСИНИТЕ

*„**Микотоксини**“* е наименование на отровни (токсични) химични вещества, продукт на жизнената дейност на **аеробни** организми, които са известни в литературата с различни наименования, като: *прости гъбички / плесени / микромицети / токсогенни гъбички / плесенни гъби*.

Те са класирани в различни категории: според таксономичната класификация на продуциращите микотоксини гъбички, основно в род/*spp*.: *Penicillium, Aspergillus, Fusarium;* според клиничните прояви, до които водят продуцираните от тях токсини, като: невротоксични, генотоксични, имуносупресивни, канцерогенни и пр.; според органите, които поразяват, като (1): хепатотоксични, нефротоксични и пр. Те може да засегнат и цели органни системи: стомашно-чревния тракт, дихателния апарат, ендокринната или екзокринната система, репродуктивната, нервната и имунната система (2,3).

Механизмът на действие на микотоксините и степента на въздействието им при живи организми, зависи до голяма степен от химичната им структура. От друга страна, степента на въздействие и особеностите на патологичния ефект зависи от резорбцията им, бионаличността, разпределението им в органите и от възможностите на засегнатия организъм на хора или животни да ги метаболизира и елиминира. Някои имат генотоксично и/или канцерогенно действие, други действат по подобие на хормони (природни естрогени), причиняват имуносупресия (променят морфологично имунната система и затрудняват имунния отговор), провокират токсични явления в бъбреците – нефротоксичност (увреждат бъбречния паренхим, което в крайно тежки случаи се проявява като хепатоцелуларен карцином (4) (раково израждане на чернодробните клетки), причиняват и безплодие.

Някои плесени са способни да произвеждат повече от един микотоксин, както е възможно някои микотоксини да се продуцират от повече от един вид плесенни гъби.

Токсогенните гъбички **паразитират** върху много и разнообразни растителни видове, от които за безопасността по хранителната верига значение имат тези културни и диворастящи видове, които се използват за храна или фураж.

Развиват се по време на растежа, беритбата, съхранението, транспортирането, в търговската мрежа и при крайните потребители, в домакинствата. От опит е известно, че най-рискови са етапите, които протичат на полето и при съхранение.

Гъбичките са повсеместно разпространени, обитават области с различни климатични условия и са разпространени в разнообразни екосистеми, което е показателно за приспособимостта им.

Климатичните промени (5) са стресори за чувствителните на замърсяване с гъбички растителни видове, правят ги по-уязвими. В същото време, промените подтикват и задействат механизмите на гъбичките за нагаждане към новите условия на средата. Редица автори смятат, че това е причина, задълбочаващите се промени в

климата, да водят до повишен риск от замърсяване на суровини и продукти с микотоксини.

Микотоксините представляват **вторични метаболити**, които токсогенните гъбички образуват като резултат от еволюционно затвърден защитен механизъм (срещу видове, с които се конкурират), който не е пряко, а косвено свързан с преживяването им. Наречени са „вторични“, тъй като нямат отношение към осигуряване на енергия за извършване на жизнените процеси или синтеза на ключови макромолекули в митаболитни вериги, каквато е дефиницията за „първични“ метаболити, от които **пряко** зависи растежът и развитието им. Същият защитен механизъм е установеновен и при бактерии, растителни видове, и дори животни.

Основно, експозицията на микотоксини е чрез храната (**90%** от общата експозиция), но съществува и експозиция през кожата, лигавиците и при вдишване (нехранителна експозиция/излагане). Нехранителна експозиция е възможна и засяга хранителната верига, доколкото може да пострадат хора, чиято работа е свързана с обработване на контаминирани с токсогенни гъбички и/или микотоксини суровини и продукти.

Освен посочените дотук като най-често срещани представители на токсогенните гъбички, има и друг токсогенен представител, от род *Claviceps – Claviceps purpurea*, нарачен „мораво рогче“[1]. Носи това наименование, тъй като в зърнения клас на ръжта, вместо зърна ръж, се появяват лилави телца с формата на рогче. Моравото рогче съдържа психоактивни алкалоиди (затова гъбите носят названието „халюциногенни гъби“) и ерготамин (силно кръвоспиращо вещество, което се използва в медицината). В по-големи дози оказва токсичен ефект при хора и животни (ерготизъм). Известно е, че ерготоксините (алкалоиди, производни на ерготина, от които най-активни са амидите на лизергинова киселина[2]), влияят на нервната система и са вазоконстриктори (свиват кръвоносните съдове). Има исторически сведения за това, че са станали причина за епидемии (гангрени) и конвулсивен ерготизъм. Подобни епидемии вече не се срещат при хора, поради познаване на причините за тях, както и поради по-разнообразно хранене. Въпреки това, огнища на ерготизъм при животни, все още се срещат.

[1] *През 1938 г., швейцарският химик Алберт Хофман е произвел от лизергинова киселина веществото LSD. След 5 години той е открил неговите* ***халюциногенни*** *свойства. Понастоящем LSD е забранен в повечето страни по света от Конвенцията на ООН. Швейцария е изключение: от 2008 г. на нейната територия е разрешено да се извършва терапия за терминално болни пациенти, включително и при критични стадии на рак. В медицината се употребяват алкалоиди на гъбата Ergot – ергот-токсини. Използват се активно в акушерската и гинекологичната практика. Тези алкалоиди причиняват рязко и продължително свиване на маточната мускулатура, като така спират кървенето от матката. Това действие се дължи на наличието на лявовъртящи физиологично активни алкалоиди, особено на* ***ергометрин****.*

[1] *(https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guid-doc-determination-ergot.pdf*

Болестта Абакаби в Япония, известна в бившия СССР като **стахиботриотоксикоза,** се причинява от паразитната токсогенна гъбичка *Stachybotrys alternans*, която принадлежи към семейство *Dematiaceae*. Предизвиква интоксикации при хора и животни.

Токсините, които продуцират паразитните токсогенни гъбички, поради опасност за здравето на консуматорите при поемане чрез храната, са определени като „химични **замърсители**“ (**контаминанти** - *представляват химични съединения, които оказват токсичен ефект; познати са още две категории замърсители – биологични (живи организми и вирусни частици) и физични (радиоактивни лъчения*) в храни и фуражи.

Най-разпространените и опасни микотоксини са включени в групата на „**регулираните**“ субстанции, което означава, че за секторите, на които се подразделя хранителната верига, са предвидени нормативни изисквания, **максимално допустими концентрации/ нива** (МДК/МДН), мерки и забрани, спазването на които дава гаранция, че на пазара не се пускат храни или фуражи, в които нивата на микотоксини надвишават МДН, фиксирани за съответна **матрица**.

Съществуването на нормативни изисквания не е достатъчно за гарантиране на безопасността на храни и фуражи, поради което е предвидено извършване на проверки за съблюдаването им, както и задължителен **мониторинг**[3] **и контрол** на микотоксини. Изпълняват се чрез вземане и изпитване проби от храни и фуражи в акредитирана лаборатория[4], което е единственият сигурен начин за доказване на наличие или отсъствие на микотоксини[5]. Спазването на изискванията[6] за вземане и транспортиране на проби до лаборатория за изпитване е важно условие за получаване на **референтен резултат**. Това се изисква, тъй като само така резултатите може да бъдат сравнявани и тълкувани съобразно допустимите концентрации на микотоксини в продукти.

Тъй като гъбичките, съответно микотоксините, са разпределени неправилно в партидите („**горещи точки**“), се налага вземане на голям брой точкови/единични проби, които се смесват в сборна/съставна проба. Съставната проба се хомогенизира. След редуциране, се оформя крайна проба. Бързото придвижване на пробата до лаборатория (при ниска температура и влага) е важно, тъй като в противен случай, наличните гъбички може да се намножат, а количеството микотоксини да се увеличи, което опорочава резултата от изпитването.

---

[3] Официалният мониторинг на замърсители в държавите-членки на Европейския съюз се финансира от Европейската комисия. Изпълнява се собствен и официален мониторинг, и официален контрол.

[4] Докато *HPLC-FLD* методът е предпочитан за определяне на конкретен микотоксин, HPLC-MS/MS е подходящ за едновременно определяне на множество микотоксини.
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486318/ Int J Environ Res Public Health. 2017 Jun; 14(6): 632.; doi: 10.3390/ijerph14060632; Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food

[5] Резултатът от анализа се приема за референтен, когато пробите са взети съгласно процедура, детайлно разписаната специално за микотоксини и са анализирани според референтнен за конкретна матрица метод.

[6] **Регламент (ЕС) № 691/2013** на Комисията от 19 юли 2013 година за изменение на Регламент (ЕО) № 152/2009 по отношение на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите; за храни, законодателството за вземане и изследване на проби, е достъпно на линка: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/sampling_analysis_en
Регламент (ЕО) № 401/2006 на Комисията за установяване на методи за вземане на проби и за анализ за целите на официалния контрол на нивата за микотоксини в храни;

Колониите гъбички са забележими, но токсините, които произвеждат – не. Освен това микотоксините нямат вкус, мирис и не променят вида на продуктите, но ги правят опасни за консуматора. Микотоксините проникват във вътрешността на субстрата върху който са се развили продуциращите ги гъбички, независимо от механичното почистване на видимо засегнатите части. Това е причината поради която скринингът[7] и потвърдителният анализ единствено са в състояние да докажат замърсяване с токсини.

Цветът и видът на културите гъбички върху продуктите е най-различен: вероятно е да се наблюдава бяла или черна плесен, зеленикава или със синкав оттенък, понякога цветът е кафяв.

Някои плесени се използват за производство на сирена, но те не са отровни. Целта на влагането им в продуктите е да придадат специфичен аромат или вкус на храната.

Много от авторите подчертават, че понастоящем степента на **експозиция** на хората на микотоксиние е по-висока в развиващите се страни, не толкова в развитите. Причината е липса на контрол на тези замърсители в третия свят. В развитите страни,

[7] В последно време, като скрирингов метод за наличие на микотоксини, се използва близка инфрачервена спектроскопия (NIR (near infrared) spectroscopy) , но засега методът дава ориентировъчни резултати. Съществувати редица ELISA и други бързи китове за скрининг на микотоксини в хранителни продукти, които позволяват работа на място и в лаборатория. Друг физичен метод за скриринг, в този случай за афлатоксини е флуоресцентно разделяне на царевица, памучни семена и смокини, който представлява **преглеждане с *UV* светлина**, е известен като прост, евтин и приемлив начин за скрининг за афлатоксини. Проблемът е, че методът няма референтна стойност.

наличието на микотоксини се следи задължително за суровини, храни и фуражи, **които се пускат на пазара**, което намалява вероятността от експозиция, при условие, че се изпълняват коректно и добросъвестно. Суровини и продукти, които попадат извън тази категория, носят риск за консуматора.

Затова, съветът на специалисти е, за произведените и използвани в домакинствата храни или фуражи, внимателно да се следи дали продуктите не са засегнати от гъбички и ако това е така, да не бъдат допускани за консумация.

2. ЛИМИТИРАЩИ ФАКТОРИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НИВАТА НА МИКОТОКСИНИ В ХРАНИ И ФУРАЖИ

Затрудненията, свързани с намаляване нивата на микотоксини в храни и фуражи произтичат от **ограничаващи фактори**, като най-съществен от тях е природата на гъбичките, които ги продуцират. Те образуват микотоксини, чрез които потискат жизнени функции на организми, които са техни конкуренти в непосредствената среда на обитание. Този феномен има два аспекта: микотоксините представляват сериозен здравен риск, тъй като се натрупват в растителни култури, с които хора и животни се хранят. В същото време, подобни токсични субстанции се използват при производство на антибиотици[8] за медицинската практика и растителната защита.

Първоначално микотоксините са смятани за отпадни продукти, но вече е ясно, че са важен елемент на екосистемите – те поддържат равновесие между видовете. Някои от тях или техни метаболити осигуряват защита срещу нараняване (при растения), за други е доказано, че действат срещу йонизиращи лъчения (споровите меланини), трети са окислители, дори има такива, които действат като фактори на вирулентността при инфекциозни причинители (6). Някои гъбични метаболити осигуряват защита срещу други микроорганизми, като по този начин помагат на токсогенните гъбички да си осигурят екологична ниша. Целта на проучванията е да се постигне по-добро разбиране на условията, при които гъбичките са устойчиви, на механизмите им на защита, което да послужи за разработване на цялостни стратегии за контрол на микотоксини и за детоксикацията им.

Трудностите, които изпитваме в опита си да намалим до приемливо ниво риска от хранителна експозиция на микотоксини, може да бъдат илюстрирани с един пример на сравнение между микотоксините и регулираните диоксини и полихлорирани бифенили (*PCBs*), които също фигурират в категорията на химичните замърсители. Разликата е съществена: микотоксините са **природни продукти**, а не резултат от човешки дейности, каквито са регулираните диоксини и *PCBs*, които се освобождават в околната среда (въздух, почви и води) при небрежно боравене с технологии, свързани с високотермични процеси. Количеството диоксини и *PCBs* може да бъде ограничено чрез подобряване контрола на определени технологични параметри, докато при микотоксини, контролът на наличието е значително по-труден, поради това че са резултат от **универсален, еволюционно затвърден конкурентен механизъм**[9].

---

[8] Пеницилинът е антибиотик, продукт на *Penicillium notatum*. Вторични продукти на гъбички са и тези, използвани за производство на антибиотици от групата на циклоспорина и статиновата група.

[9] Само в последния доклад на EFSA от 2019 г. относно замърсители и нововъзникващи рискове, са посочени 3 нови микотоксина

Затруднения произтичат и от факта, че в стремежа си да намалим риска от наличие на микотоксини, прилагаме срещу тях синтетични химични вещества, повечето от които са чужди за природата (ксенобиотици). Ксенобиотиците оказват силен **селекционен натиск** върху продуцентите на микотоксини. Той се изразява в запазване в поколението на геномни промени (мутации) при гъбичките, които им придават устойчивост към изкуствено създадените субстанции. Механизмът на това явление е познат: след третиране с химикали, от популацията биват унищожени само чувствителните организми, докато мутиралите оцеляват, дават поколение, което е устойчиво срещу третиране с използваните субстанции. Това създава допълнителен риск от остатъци от пестициди (които също са регулирани химични замърсители с вредно влияние върху организма на хора и животни), като едновременно с това, налага необходимост от намиране на нови решения – нови поколения препарати за растителна защита или направо нови молекули за контрол на гъбички. Като се има предвид хилядолетния опит на гъбичките, не изглежда да е възможно тази надпревара да завърши в полза на човека. Механизмът на устойчивост в посочения случай не се различава по същество от *антимикробната резистентност*, която е идентифицирана като един от най-сериозните рискове за живота и здравето на хората.

Други лимитиращи фактори за постигане на универсално и категорично решение на въпроса с микотоксините:

- Недостатъчно **познания**, включително и по отношение на вече известни микотоксини;
- Регулирани са само част от микотоксините, тъй като не всички подобни субстанции са известни и проучени[10]: откриват се **нови микотоксини** или пък „скрити“/ “модифицирани“ форми на вече известни микотоксини – някои микотоксини не показват токсична активност преди да попаднат в организъма, а едва след като влязат в контакт с макромолекули или ензими, които да ги метаболизират (получените метаболити показват токсична активност, поради което носят назнавието **скрити форми**);
- Постоянно се установяват **нови взаимодействия** между тях в смеси, което води до необходимост от нови проучвания;
- Учените откриват неизвестни досега токсични въздействия, които се проявяват **след попадането на микотоксини в организма** на засегнатите животни;
- Недостатъчни са данните от епидемиологични проучвания, като причина за това основно е трудната диференциална диагноза спрямо други заболявания;
- Липса на достатъчно токсикологични данни и данни за експозиция;
- **Търговията:** чрез засегнати суровини и продукти, миктоксини се пренасят на големи разстояния.

3. ТЪРГОВИЯТА КАТО РИСКОВ ФАКТОР

[10] Да бъдат установени всички токсични субстанции, които може да бъдат категоризирани в групата на микотоксините, изглежда невъзможно: гъбичките разполагат с гъвкав механизъм за преодоляване на стресорите в околната среда, което означава че учените постоянно ще бъдат поставени в ситуция да намират все нови и нови токсични вещества, продуцирани от гъбички.

Държавите, в които са въведени системи за контрол на микотоксини, съблюдават различни правила. Именно тези различия са причината, която прави търговията рисков фактор за разпространение на микотоксини.

Уеднаквяването на изискванията за безопасност по отношение на микотоксини в храни и фуражи е **един от подходите**, който може да намали риска от пренасяне на микотоксини чрез транспортиране на големи разстояния на суровини и продукти. В международната търговия това може да бъде постигнато чрез въвеждане на **еквивалентност в стандартите** за качество и безопасност на храни и фуражи. Тези стандарти следва да бъдат спазвани от членовете на *WTO* – Световната търговска организация.

Въвеждането на минимални общи стандарти за безопасност по хранителната верига, естествено включва замърсителите, като важен елемент на общата сигурност в национален и в глобален план.

Научен експертен комитет (*JECFA*)[11], свикван съвместно от Световната здравна организация (*WHO*) и Организацията по прехрана и земеделието (*FAO*) в рамките на Организацията на обединените нации (*UN*), е **международният орган, отговорен за оценка на риска за здравето от природни токсини, което се отнася и за микотоксини**.

Международните стандарти и кодекси за добри практики[12] за ограничаване на експозицията на микотоксини от някои храни са създадени от Комисията по *Codex Alimentarius* въз основа на оценките на *JECFA*.

ПРИМЕРИ:
На база оценка на риска, извършена от JECFA, Codex е определил, че максимално допустимите нива за афлатоксини в различни ядки, зърна, сушени смокини и мляко, се намира в границите ***от 0,5 до 15 µg / kg*** *(µg е една милиардна част от килограма). Максималната граница, определена от Codex за патулин в ябълков сок, е* ***50 µg / L.***

Еквивалентността на практиките за постигане на безопасност по отношение на микотоксини е подход, който служи като бариера срещу попадане на европейския пазар на храни, при които не са спазени европейските критерии.

С оглед високата токсичност на **афлатоксините**, Европейската комисия е наложила допълнителни изисквания, които се прилагат на външните граници на Европейския съюз (ЕС), като целта им е да сведат до възможния минимум остатъчния риск при внос на някои храни и продукти. Това се постига чрез прилагане на Регламент на Комисията (ЕК) № 1152/2009 от 27 ноември, 2009 г.[13]

Вторият възможен подход е, с предпочитание, доставки на чувствителни на микотоксини култури, да се извършват само от райони, които не са засегнати или са по-слабо засегнати от замърсяване. Когато възникне съмнение, като доказателство че

[11] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) **;** извадката, пренесена в текста е направена от доклад на *JECFA* за микитоксини, съставен през 2018 г.
https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins
[12] Систематизирани процедури, които описват вече установени практики за прилагане на действащата в момента нормативна уредба в съответна област.
[13] https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32009R1152

нивата на микотоксини не надвишават максимално допустимите, може да послужи само сертификат за безопасност, в който са записани резултатите от лабораторен анализ за съответните партиди.

При търговия между държави-членки на ЕС не се изисква такъв сертификат – презумпцията е, че стандартите за безопасност са уеднаквени, поради което вътреобщностна търговия се осъществява само на базата на търговски документи.

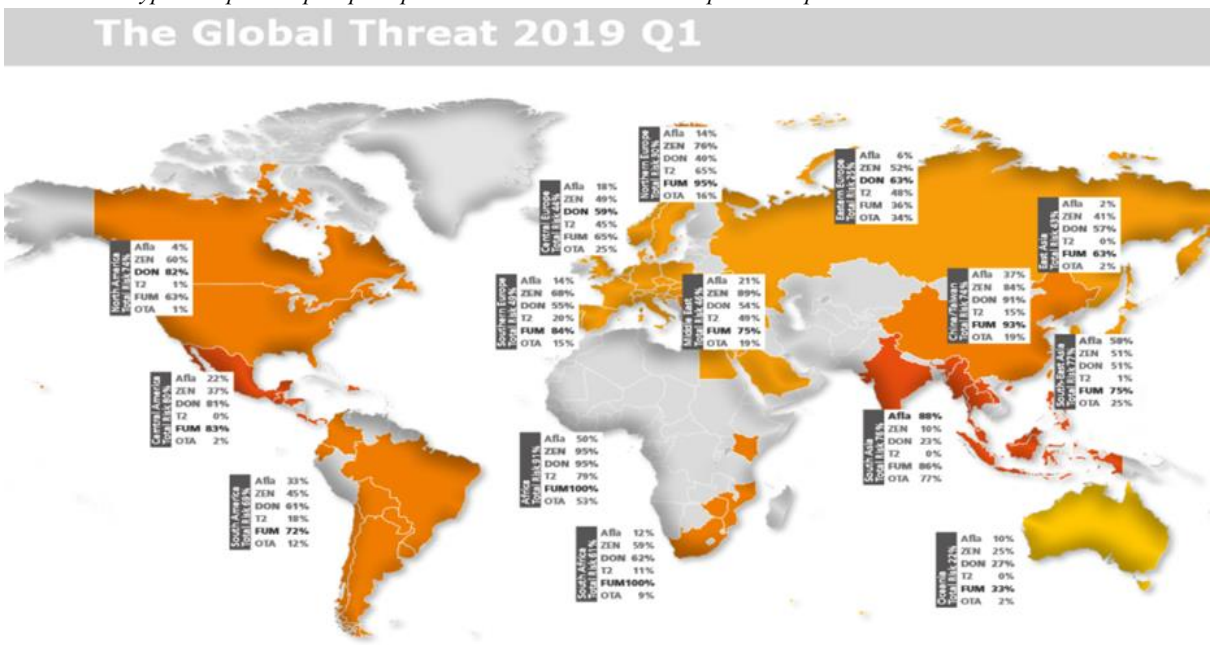
Третият подход предполага провеждане на засилен документален и физически контрол на външните граници на ЕС, който се извършва на база оценка на риска и се прилага при внасяне от трети държави.

Стандартите за безопасност на храни и фуражи в ЕС до голяма степен са уеднаквени. Затова, внимание се обръща основно при **внасянето** им. При внасяне на рискови по отношение на микотоксини суровини и продукти следва да се взема предвид, кои микотоксини са най-разпространени в държавата или региона на произход[14]. Държи се сметка и за продължителността на транспортиране, видът на транспортното средство и видът на суровините и продуктите.

Транспортирането по вода винаги е по-високо рисково, отколкото по суша.

Замърсяването с повече от един микотоксин се среща все по-често. В 73% от изследваните проби са били установени поне по два микотоксина. Тези данни са взети от проучване, проведено от *Biomin* през 2019 г. (фиг. 1). Правилно е те да бъдат взети предвид, когато се планира сделка или доставка от посочените по-долу страни и региони, като се вземе предвид кой микотоксин или комбинация от микотоксини са най-характерни при съответен регион и култура.

Фигура 1 Карта на разпространението на микотоксини в различни региони[15].



[14] Резултати от проучване на *BIOMIN* за наличие на микотоксини (афлатоксин, зеараленон, деоксиниваленол (вомитоксин), т-2 токсин, фумонизини и охратоксин а) в царевица, пшеница, соя, странични продукти от тях и в готови фуражи. Обзор за първото полугодие на 2019 г.

[15] https://engage.biomin.net/hubfs/BIOMIN/Mycotoxin%20Survey%20Report/REP_MTX-Survey-Quarter1_2019_EN.pdf

Регионът на **Южна Азия** остава изключително високо рисков. Това се дължи главно на голямо количество афлатоксини (Afla) (88%) със средно замърсяване от 20 ppb и максимално установено наличие от 210 ppb (ppb = µg/kg).

Рискът от **Централна Америка** се е увеличил от висок до критичен. Най-често се откриват фумонизини (FUM) и деоксиниваленол (DON).

В **Северна Америка** рискът е достигнал критично ниво – DON остава най-разпространеният микотоксин (82%, средно замърсяване 869 ppb).

Южна Америка показва голямо изобилие на FUM, но и за DON рискът е висок (съответно 72% и 61%).

В **Африка**, във всички анализирани проби е намерен FUM (100%, средно замърсяване 203 ppb, максимум 3374 ppb).

Европа е изложена на висок риск от замърсяване с микотоксини. FUM и DON са най-често срещани (съответно 64% и 58%), а при зеараленон (ZEN) (56%, средно замърсяване 78 ppb и максимум 9905 ppb).

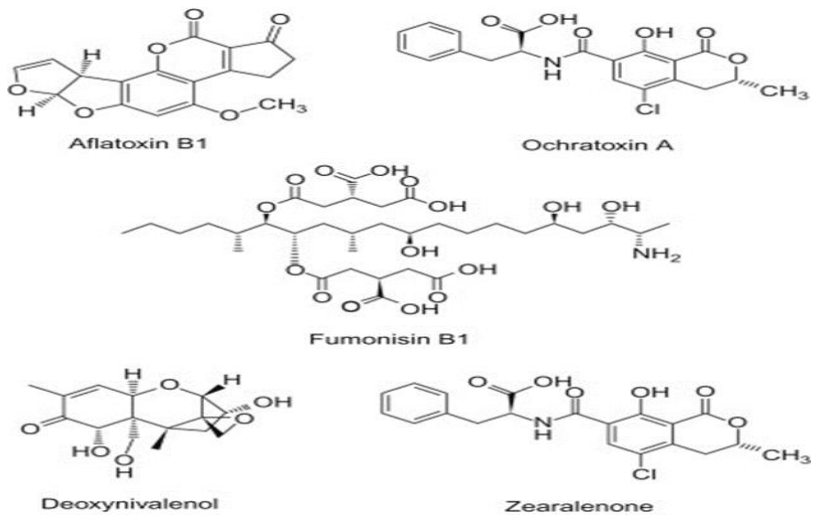
За сравнение, фиксираните в европейското законодателство максимално допустими нива за основни продукти са, както следва:

Toxin	Product	Maximum limit (µg/kg)
Aflatoxin	Peanuts, oilseeds, cereals, processed products	4
	Tree nuts, dried fruits, maize, rice, spices, almonds, pistachios, hazel nuts	10
Fumonisins	Processed cereal-based foods	200
	Infant baby foods	400
	Unprocessed maize	800
Trichothecenes	Processed cereal-based foods	200
	Pasta	750
Ochratoxin A	Processed cereal-based foods	0.5
	Wine, grape juice, grape nectar/must	2
	Roasted/ground coffee beans	5
	Spices	20
Patulin	Apple juice	10
	Solid apple products	25
	Spirit drink, cider	50
ZEA	Bread, pastries	50
	Biscuits, cereals, snacks	75

Table 5: European Commission maximum limits for mycotoxins in foods [124,127].

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НА РЕГУЛИРАНИ МИКОТОКСИНИ

Най-разпространени микотоксини са: афлатоксин B1, охратоксин A, фумонизин B1, дезоксиниваленол и зеараленон, комбинации от тях или техни скрити форми.



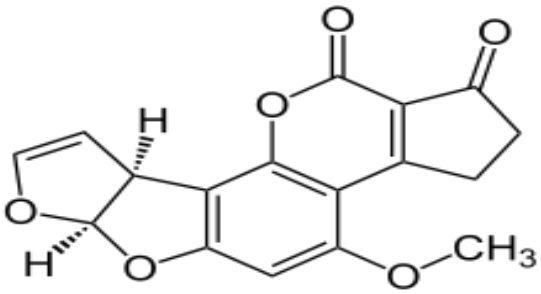
Стр. 4 Химична структура: афлатоксин B1, охратоксин A, фумонизин B1, деоксиниваленол и зеараленон.

Афлатоксин B1 (*AFB1*) е най-токсичният микотоксин и е класифициран от Международната агенция за изследвания на рака (*IARC*) през 2002 г.[16] в **група 1**, ***канцерогенен за хора***.

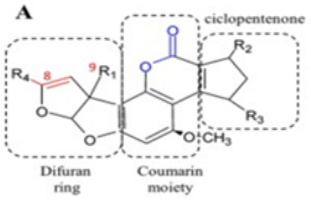
Други микотоксини, като афлатоксин M1 (*AFM1*), охратоксин A (*OTA*) и фумонизин B1 (*FB1*), са класифицирани в **група 2B**, с *потенциално канцерогенно действие за хора*, тъй като все още не са налични достатъчно токсикологични данни, за да бъде направен окончателен извод[13,17,18].

5. AFLATOXINS/АФЛАТОКСИНИ

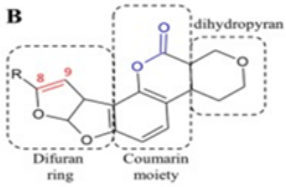
Афлатоксините са продукти от рода *Aspergillus*, по-специално *A. flavus*, открита като замърсител на зърно, царевица, фъстъци и др.



[16] *The International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 82. World Health Organization; Lyon, France: 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene; pp. 1–556.*
[17] *The International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56. World Health Organization; Lyon, France: 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; pp. 489–521.*
[18] *The International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 100F. World Health Organization; Lyon, France: 2012. Chemical agents and related occupations; pp. 1–599.*



	AFB_1	AFB_2	AFB2a	AFM_1	AFM_2	AFL	AFQ_1
R1	-H	-H	-H	-OH	-OH	-H	-H
R2	=O	=O	=O	=O	=O	-OH	=O
R3	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-OH
R4	-H	-H	-OH	-H	-H	-H	-H
C_8-C_9 bond	unsaturated	saturated	saturated	unsaturated	saturated	unsaturated	unsaturated



	AFG_1	AFG_2	AFG2a
R	-H	-H	-OH
C_8-C_9 bond	unsaturated	saturated	saturated

Афлатоксините включват повече от 20 гъбични вторични метаболити, продуцирани от *Aspergillus genus* (7). Според химичната им структура, те се разделят в две групи: Едната: ***AFB1, B2, B2a, AFM1, M2, Q1, Aflatoxicol – AFL***; Другата – ***aflatoxin G1, aflatoxin G2 и aflatoxin G2a***.

За пръв път са установени като причина за заболявания при домашни птици, впоследствие е бил доказан канцерогенен ефект при опитни животни, което съвпада с резултата от епидемиологични проучвания при хора.

Канцерогенният потенциал на ***афлатоксин B1*** се проявава след като претърпи ензимно активиране, след попадане в организма на животни и хора.

Афлатоксините са сред **най-отровните микотоксини**, продуцират ги плесени (*Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*), които растат в почвата, гниещата растителност, сено и зърнени култури (царевица, сорго, пшеница и ориз), маслодайни семена (соя, фъстъци, слънчогледови и памучни семена), подправки (люти чушки, черен пипер, кориандър, куркума и джинджифил) и ядки, добивани от „дървесни“ видове (шам-фъстък, бадем, орех, кокос и бразилски орех). Към същата група са причислени и ***AFB2***, афлатоксин G1 (***AFG1***) и афлатоксин G2 (***AFG2***).

Докато AFs от B и G групата се намират едновременно в зърнени култури и техни производни продукти, плодове, маслодайни, ядки, тютюн и подправки, *AFM_1 AFM_2, AFL и AFQ_1* се намират в храни след като са били пренесени поради наличие във фуражи на *AFB_1*. ***In vivo*** **AFB_1 лесно се метаболизира чрез**

хидроксилиране (до *AFM_1* или в по-малка степен – до *AFQ_1*) или редукция (до *AFL*).

Токсините може да бъдат намерени в мляко (като афлатоксин M1, хидроксилиран метаболит на афлатоксин B1), добито от животни, хранени със замърсен с афлатоксин B1 фураж; големи дози афлатоксини може да доведат до остро отравяне (афлатоксикоза), което е животозастрашаващо състояние, най-честа причина за което е токсично увреждане на черния дроб.

Афлатоксините са генотоксични: увреждат ДНК на клетките, включително и митохондриалната ДНК. Увреждането на митохондриалната ДНК води до нарушения в клетъчното дишане, което засяга всички метаболитни вериги, но особено въглехидратната и мастната. Има научни доказателства, че AFLs причиняват рак на черния дроб при хора.

С цел уеднаквяване на практиките в отделните държави, както и улесняване в прилагането на приложимото законодателство, през 2010 г. е издадено ръководство: „*Guidance document for competent authorities for the control of compliance with EU legislation on aflatoxins*“[19]

По задание на Европейската комисия, през 2019 г., EFSA (Европейски орган по безопасност на храните) *чрез CONTAM панела, е изготвил проект на Научно становище относно риска за общественото здраве, свързан с наличието на афлатоксини в храни* ***(Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of aflatoxins in food[20]).***

Оценена е токсичността и хранителната експозиция на афлатоксините B1 (AFB1), AFB2, AFG1, AFG2 и AFM за населението на Европейския съюз.

В оценката са взети предвид повече от 200 000 аналитични резултати, като последните от тях са генерирани през 2019 г. ***Зърно и зърнени продукти*** *имат най-голям дял в хроничната експозиция на хора на AFB1, независимо от това за коя специфична група се касае, а течното мляко и ферментиралите млечни продукти са основен рисков фактор за експозиция на AFM1, както показват средните стойности на експозицията. Афлатоксините са генотоксични, а AFB1 може да причини хепатоцелуларен капрцином (HCC – карцином на чернодробни клетки) при хора.*

Панелът CONTAM взема за база долната гранична стойност на доверителния интервал (BMDL) като стойност на референтен отговор при 10%, което отговаря на ***0,4 μg/kg телесна маса на ден*** *за честота на HCC при мъжки плъхове след излагането им на AFB1, при прилагане на подхода MOE (граница на експозиция/margin of exposure)[21]. Изчисляването на BMDL от данните за хората не е приложимо; вместо*

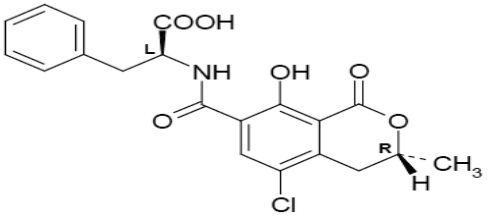
[19] https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_sampling_analysis-guidance-2010_en.pdf
[20] https://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/public-consultation-draft-scientific-opinion-risks
[21] *Margin of exposure* (***MOE***) – **граница на експозиция** е важна концепция при определяне на химичен риск: по дефиниция, *MOE* е **отношението на *NOAEL*** – ниво при което не се наблюдават неблагоприятни реакции, получено от токсикологични проучвания при животни **към прогнозната/изчислената експозиция при хора**, като **ниво** или като **доза**.

това, потенциалът да причини ракови образувания са изчислени от Съвместен експертен комитет по храните на ФАО и СЗО. За AFM1 е приложен коефициент на потентност 0,1 спрямо AFB1, като най-силбно токсичен от групата на афлатоксините. За AFG1, AFB2 и AFG2, in vivo, данните не са достатъчни за извличане на коефициенти на потентност и се приема, че е равна потентността на AFB1, определен при предишни оценки. Стойностите на МО за експозиция AFB1 варират от 5000 до 28, а за AFM1 от 100 000 до 508. Изчислените МО са под 10 000 за AFB1, а също и за AFM1, където някои проучвания, особено за по-младите възрастови групи, имат МО под 10 000. ***Това поражда загриженост за здравето.*** *Прогнозният риск от рак при хора след излагане на* ***AFB1 и AFM1*** *е в съответствие със заключението, направено на базата на МО.* ***Изводите и заключенията се отнасят и за комбинираната експозиция на всички 5 афлатоксина****: B1 (AFB1), AFB2, AFG1, AFG2 и AFM1.*

Тъй като настоящите бази данни на ЕОБХ за консумация не включват бебета и деца, панелът CONTAM е стигнал до извод, че са необходими повече данни за оценка на степента на експозиция на този сегмент от потребителите, като се вземат предвид техните хранителни предпочитания.

6. *OCHRATOXIN A*/ОХРАТОКСИН А

Охратоксин А се произвежда от няколко вида *Aspergillus* и *Penicillium* и е често срещан микотоксин, който замърсява храни и фуражи.



Прилага се при характеризиране на експозиция на химични рискове при хора, в храни. Когато химични субстанции имат фиксирани прагове на допустимост (т. е., не са генотоксични и канцерогенни), *MOE* е >= 100, което се смята за безопасно (защитно ниво).

MOE = NOAEL съотнесена към прогнозната доза на експозиция, като единица за ***NOAEL* е mg/kg маса /ден или *ppm*.** Понякога е необходимо по-високо ниво на *MOE* от 100, а именно когато: *NOAEL* не е получено в резултат на проучвания за хронична токсичност, при условие, че се касае за хронична експозиция; е идентифициран само *LOAEL*, но не и *NOAEL* или когато е било определено *LOAEL*, но не и *NOAEL*: тогава има несигурност по отношение на качеството на наличните данни, има вероятност за подценяване на експозицията, има нужда от защита на чувствителни групи хора.

За генотоксични и канцерогенни съединения се използва следното уравнение, за да изчислите *MOE*, тъй като стойностите на *NOAEL* не може да бъдат идентифицирани за тези вещества. **По принцип MOE > = 10 000 се према за защитна.**

Подходът, чието описание следва, е използван от *EFSA* за оценка на генотоксични и канцерогенни примеси в храни.

Начин на изчисляване

MOE = BMDL разделено на прогнозна доза на експозиция

BMDL = долна граница на референтната доза; това е референтна стойност, получена от *Benchmark* (референтна) дозата (BMD), която разширява използваните на данни за реакция (ефект/отговор), когато проучванията са извършени при животни.

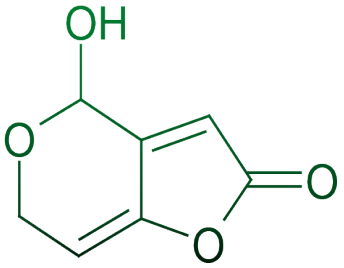
Единица на *BMDL*: *[mg/kg]* маса/за ден или ***ppm*** – лесноразбираем начин да бъде обяснена величината е като се каже, че процент означава 1 от/на 100, докато *ppm* означава 1 от/на 1 000 000 (*pars per million*). Принципно, единицата може да се прилага за обем или маса, но тук се има предвид **маса**.

Замърсяване с охратоксин А се наблюдава при храни и фуражи, особено зърнени култури и зърнени продукти. Освен тях, често са засегнати: кафе на зърна, стафиди, вино и гроздов сок, подправки и билки (женско биле/сладък корен).

Охратоксин А се образува по време на съхранение на засегнати продукти.

Причинява токсично увреждане на бъбреците, негативно повлиява развитието на плода и предизвиква имуносупресия. Засега, намерените доказателства потвърждават токсичния ефект за бъбреците и рак на бъбреците при животни, но връзката им с експозиция на охратоксин А все още не е недвусмислено доказана при хора.

7. PATULIN/ ПАТУЛИН



Патулин е микотоксин, произвеждан от различни плесени, особено от *Aspergillus, Penicillium* и *Byssochlamys* (род гъбички от семейството *Trichocomaceae*). Често срещан е в гниещи ябълки и ябълкови продукти; патулинът може да се среща и в други плесенясали плодове, зърнени и други храни. Основен източник на патулин при хора са ябълки и ябълков сок, приготвени от контаминиран плод. Патулин се намира и в други плодови сокове, нектари, спиртни напитки от ябълки и компоти.

Острите симптоми при животни включват увреждане на черния дроб, далака и бъбреците, и признаци на токсичност за имунната система. При хора причинява гадене, стомашно-чревни смущения и повръщане. Патулинът се смята за генотоксичен, но канцерогенният му потенциал все още не е напълно доказан.

***FUSARIUM FUNGI*/** ФУЗАРИУМНИ ГЪБИ

Трихотецените са голям клас сескитерпеноидни гъбични метаболити, произвеждани по-специално от представители на родовете *Fusarium* и *Tricoderma*. Те често са остро токсични, проявяват бактерицидна, фунгицидна и инсектицидна активност, както и причиняват различни клинични симптоми при бозайници, включително диария, анорексия (отказ от храна) и атаксия (неврологичен симптом: липса на равновесие и координация на волевите мускулни групи; признак на увреждане на централната нервна система – най-често в малкия мозък, гръбначния мозък, мозъчната кора и по-рядко таламуса).

Фузариумните гъби са обичаен обитател в почвата. Произвеждат различни токсини, което включва **трихотецени,** като деоксиниваленол (***DON***), ниваленол (***NIV***) и токсини ***T-2*** и ***HT-2***, както и зеараленон (***ZEN***) и фумонизини (***FUM***)[22]. Образуването на плесени и токсини е известно при различни зърнени култури. Определен фузариотоксин се продуцират от гъбички, които паразитират върху определен вид зърнена култура.

Зеараленонът има естрогенно действие при животни; канцерогенен ефект при хора. Доказано е, че ***ZEN*** има хормонални, естрогенни ефекти и може да причини безплодие при високи нива на прием, особено при прасета. За хора, липсват достатъчно данни.

Деоксиниваленол и *T-2* токсин са силни имуносупресори, инхибират синтеза на ДНК и на протеини на ниво рибозоми.

Фумонизините се свързват с рак на хранопровода при хора и с токсичност за черния дроб и бъбреците при животни.

ПРИМЕРИ:

- *DON* и *ZEN* често се намират в пшеница;
- *T-2* и *HT-2* – в овес;
- *FUM* (фумонизини) – в царевица.

Трихотецените може да причинят остри токсични ефекти при хора: остро дразнене на кожата (независимо дали се касае за хранителна или нехранителна експозиция) или чревната лигавица (водят до профузна диария).

Установени са хронични ефекти при животни, като признак на отравяне често се наблюдава потискане на имунната система.

8. УСТОЙЧИВОСТ НА ТОКСОГЕННИ ГЪБИЧКИ И МИКОТОКСИНИ

Познаването на параметрите на устойчивост на микотоксини на въздействия от всякакъв характер, може да послужи за намиране на средства за справяне с тях.

Температура: повечето микотоксини са химически стабилни при високи температури, някои и над 200ºC. Поради тази причина не може да се разчита кулинарната обработка да ограничи до необходимата степен риска от хранителна експозиция. Предвидените в законодателството в сектор „фуражи“ термични технологични обработки не дават гараннция за липса на микотоксини в комбинирани фуражи.

Например, ***DON* е стабилен при 120ºC**, средно стабилен при 180ºC и частично стабилен при 210 ºC (*WHO* 2010), а ***Fumonisin* напълно се разпада едва при 220 ºC** (*Dupuy et al.,* 1993). Печенето като кулинарна обработка на храни може да елиминира между **45 и 83% от афлатоксините**, докато **пастьоризацията не е ефективна** (*CAST* 2003). **Температурата не е ефективна за деконтаминиране на *ZEA*** (*Ryu et al.,* 2003).

Разграждането на токсините, продуцирани от микотоксини зависи от: степента на замърсяване, вида на токсина, концентрацията, температурата, времетраенето на третиране, степента на проникване на температурата навътре в продукта, съдържанието

[22] ФУМОНИЗИНИ – основно по време на зреене и вегетация, но токсинообразуването може да продължи и по време на съхранението на зърното; при свине предизвикват белодробен едем; при конете – лейкоенцефаломалация; при хората предизвикват езофагеален рак.

на влага, *pH* на средата, *йонната сила* (силата на електрическото поле в разтвор, равно на сумата от моларната концентрация на всеки вид присъстващи йони, умножена по квадрата на зарядите им).

Облъчване – микотоксините са устойчиви на различни лъчения. Повечето микотоксини имат сложна и стабилна химична структура, не се повлияват от лъчения. В процеса на радиолиза на водата се получават свободни радикали, а те може да реагират с микотоксините (*Stepanik et al.,* 2007). AFB1 е чувствителен на ***UV-, x-* и *gamma*** лъчи, при което токсичността намалява, като *gamma* лъчите намаляват и микробното замърсяване (*Rustom* 1997*; Afifi et al.,* 2003). **Микровълните** може да намалят афлатоксините във фъстъци (*Farag et al.,* 1996), както и трихотецени в царевица (*Scott* 1998).

Влага – влагата стимулира растежа на гъбички, които продуцират микотоксини. Влажност, в рамките на **13-15%** потиска развитието им.

Налягане – при високо налягане, структурните белтъци на продуцентите на токсини, както и токсините може да се разрушат. Третиране на суровини и продукти при високо налягане нарушава структурата на съществени за храненето субстанции, поради което **не е възприето** налягането да се използва за унищожаване на гъбички или намаляване на токсичността на микотоксините.

9. МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ[23] НА МИКОТОКСИНИ

Механизмът им на действие се обяснява със свързването им с макромолекули, чрез **нековалентни или ковалентни връзки** (понякога са възможни и двете). Чрез метаболитните пътища се получават или токсични метаболити, които причиняват заболявания, или нетоксични, като извън организма може да се екскретират и едните, и другите. Метаболизмът е от съществено значение за токсичността на микотоксините.

Механизмът на действие на микотоксините при хора и животни се изучава с особен интерес, тъй като на база познанията в тази област, се основават принципите за предотвратяване на експозиция или намаляване на ефектите при засегнати организми.

Симптомите при микотоксикози са резултат от взаимодействие на микотоксини с функционални молекули и клетъчни органели. Биологичните ефекти зависят на първо място от химичната структура на микотоксините, но също и от фактори като биохимични особености при вида животно, околната среда и типа хранене.

Пример за добре проучен микотоксин е **Афлатоксин *B1* (*AFLB1*)**, поради високата му токсичност и канцерогенност. Въпреки че механизмът му на действие се смята за много добре проучен, не може да се каже, че е намерен начин за противодействие, който със 100% категоричност да предотвратява токсичните му ефекти. Има предположение, че всички от съобщаваните в литературата механизми на действие, са резултат от една и съща първична причина, от която останалите са следствие, но тази теза все още не е напълно доказана.

[23] http://publications.iupac.org/pac/1986/pdf/5802x0327.pdf

Приведеният по-долу пример[24] илюстрира фундаменталното ниво на което действа *AFLB1* и сложността на въпроса с разгадаване на процесите, така че това да послужи за намаляване на експозицията на *AFLB1*.

AFLB1, когато е наличен във фуражи, преминава под формата на *AFLM1* (метаболит на *AFLB1*) в мляко и млечни продукти (термичната обработка не повлиява наличието на този микотоксин!).

Токсичното му действие се свързва с мутации (трансверсия в кодон 249 [**гуанин** (*G*) в тимин (*T*)]), при която се наблюдава заместване на ***аргинин (R) със серин (S)***. Засягайки на това ниво синтеза на макромолекули в организма, афлатоксините засягат основни метаболитни вериги. Доказателство за това е, че в 50% от случаите на **хепатоцелуларен карцином** – *Hepatocellular carcinoma* (***HCC***) тази мутация присъства и също, намерените *in vitro* доказателства, че тя се проявява като резултат от действието на афлатоксини ***AFLB1* и *AFLM1***.

Не само афлатоксините, но и другите микотоксини влияят на ниво ДНК-РНК. Поради това, токсичността им се проявява по различен начин и не липсват взаимно обусловени ефекти. Значително по-рядко се наблюдават строго специфични прояви (какъвто е случаят с потискането на фосфоенолпируват карбоксикиназа при експозиция на охратоксин А).

Намерена е зависимост между канцерогенност и мутагенност от една страна и степента на ковалентно свързване на ДНК с афлатоксини и техните метаболити или прекурсори. Гуанинът в молекулата на ДНК е основна мишена на афлатоксините, след като бъдат ензимно активирани в организма на животните или човека. Възможно е мутациите, получени вследствие на ковалентно свързване с ДНК, да доведат до ракови образувания. Засега този механизъм е бил поставен под въпрос, тъй като се е оказало, че афлатоксин В1, при експериментални животни, се свързва ковалентно с чернодробните митохондрии по-ефективно отколкото с ядрената ДНК (*Niranjan et al. 2007*). Все пак, това че свързването е по-ефективно при митохондриите не означава, че тезата за въздействието му върху ядрената ДНК трябва да бъде отхвърлена.

Експериментите показват, че е вероятно микотоксините да действат чрез:

- повлияване на РНК-полимеразата;
- повлияване на ниво транслация при протеиновия синтез;
- блокиране на ключови ензими в ензимните вериги на въглехидратната и мастната обмяна;
- повлияване на митохондриалната функция и смущаване на клетъчното дишане;
- влияние, подобно на хормонални субстанции (ергот-токсини, зеараленон – възпроизвежда ефекта от прилагане на **диетилстилбестрол или стероидни естрогени**), на липидния и стероидния метаболизъм, както биосинтезът на протеини и нуклеинови киселини.

Смята се, че механизмът на действие на микотоксини не е изяснен в достатъчна степен. Вероятно специфичният характер на токсичните прояви от страна на

[24] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3629261/

засегнатите организми да се дължи на видови особености и индивидуални характеристики.

Установено е, че **моногастричните** (животни с еднокамерен стомах – коне, свине, кучета, котки; хората също са моногастрични) са по-чувствителни на микотоксини, отколкото тези със сложен стомах (едри и дребни преживни животни). Причина за това са **микроорганизми** в сложния стомах на преживните, които трансформират микотоксините: намаляват токсичността им и увеличават излъчването на базови, скрити форми или метаболити. Този принцип се прилага при търсене на средства за ограничаване на токсичните прояви на микотоксини. Освен направените констатации за преживни и непреживни животни е установено, че **пъстървата, патетата и прасетата** показват най-висока чувствителност към афлатоксин B1[25].

Общи токсични прояви при различни видове животни почти липсват. По-често един и същ микотоксин предизвиква различни прояви при различни видове животни. Колкото по-отдалечени в таксономично отношение са видовете, толкова повече се различават и реакциите. Поради това, че по-характерни са специфичните прояви, не се смята за обосновано екстраполирането на резултати и изводи от един към друг вид животни. Това е взето предвид например при изпитване за ефективност и ефикасност на свързващи микотоксини агенти, при което се изискват *in vivo* опити при всеки вид животни, за който е предназначен даден продукт.

Някои автори правят извод, че **типът хранене и здравето на храносмилателната система** при експонирани организми са от значение за чувствителността към микотоксини. Това дава надежда, че този ефект, може да послужи за разработване на **нови неспецифични подходи** за минимизиране на ефектите на експозиця при хора и животни на микотоксини.

10. КОМБИНИРАНА ЕКСПОЗИЦИЯ

До днес са открити няколко стотици микотоксина, като вероятните комбинации между тях са много толям брой.

Когато в дадена партида е наличен повече от един микотоксин, са възможни различни взаимодействия помежду им, което се отразява и на токсичноста.

Според цитираното по-горе проучване за 2019 г., в над 73% от изследваните проби, е установено наличие на повече от един микотоксин. Някои от тях не си влияят в комбинация. При други, макар и рядко, се проявава антагонистично действие: комбинацията е с намалена токсичност (този принцип не се прилага за намаляване на токсичния ефект). Известно е синергично повлияване – когато действието им се сумира и потенцирано („добавено“ действие), когато ефектът от едновременното им действие е по-силен от сумарния.

Много показателно проучване е извършено чрез *MTT test* с най-широко разпространените микотоксини в Европа и Северна Америка: ***DON*** под формата на тип *B* трихотецени: 3-acetyldeoxynivalenol (***3-ADON***), 15-acetyldeoxynivalenol (***15-ADON***), nivalenol (***NIV***) and fusarenone-*X* (***FX***).

[25] https://www.springer.com/gp/book/9781441974327

MTT test – във физиката и аналитичната химия, колориметрична техника, която се прилага за определяне на концентрацията на дадена субстанция в разтвор. Анализът се извършва с колориметър, уред който измерва каква част от пропуснатата светлина с определена дължина на вълната бива погълната от разтворената субстация. Провежда се на тъмно, тъй като голяма част от изследваните субстанции са светлочувствителни.

На фона на това, че цитотоксичността на отделни микотоксини е добре проучена, а данните за токсичност на комбинации от тях, са ограничени, екипът е провел *in vitro* опити. Целта на проучването е оценяване на взаимодействието на смес от ***B* трихотецени**, върху **клетки на чревен епител**. Намножаващи се ***CACO***-2 клетки са били изложени на нарастващи дози от трихотецени тип ***B***, самостоятелно или в смеси от по два или по три микотоксина. За измерване на чревната епителна цитотоксичност е използван тестът ***MTT*** (колориметричен метод за оценка на клетъчната метаболитна активност). Тествани са пет микотоксина, които са показали **дозозависим ефект**. Сравнителната им токсичност може да се изрази, както следва: *3-DON < 15-DON ≈ DON < NIV ≪ FX*.

Дву- и трикомпонентни смеси също показват дозозависим ефект:

- при ниски концентрации (цитотоксичен ефект между 10 и 40%), комбинациите от микотоксин са показали синергично взаимодействие;

- в смес, ***DON-NIV-FX***, са показали антагонистично взаимодействие;

- при високи концентрации (цитотоксичен ефект около 50%), комбинациите имат сумарен и потенциран ефект.

Тези резултати показват, че когато се касае за комбинация на различни микотоксини в ниски дози, може да окаже по-силен токсичен ефект, в сравнение с прогнозния, според вида микотоксини в комбинацията.

11. НАМАЛЯМАНЕ НИВАТА НА МИКОТОКСИНИ ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА

Опитът показва, че токсогенните гъбички се развиват и образуват микотоксини на всички епати по хранителната верига, но най-високорискови са етапът на растеж и развитие на чувствителни растителни видове, и етапът на съхранение.

Освен мониторингът и контролът, които са зъдължение на операторите и контролните органи, важно условие за намаляване на риска от експозиция е **следенето за признаци на контаминиране с плесени на храни и фуражи в домакинствата, както и предприемане на правилните действия при замърсяване**.

Гъбичките и микотоксините не само носят риск за здравето и живота, но причиняват развалянето на храни и фуражи, като така увеличават загубите, поради необходимост да бъдат изхвърлени и унищожени.

Правят се усилия, всички познания за гъбичките и микотоксините, да бъдат използвани за намаляване на вероятната експозиция на хора и животни, като се започне със:

- семена или посадъчен материал;
- сеитбооборот;

- почвени обработки;
- избиране на време за засаждане;
- поливане при засушаване;
- подбор на време (календарно) за прибиране на реколтата;
- прибиране на реколтата, когато е достигнала зрялост;
- избиране на подходящи температури и влага при събиране на културите;
- поддържане на подходящи условия на съхранение;
- обработка на суровини или продукти по време на съхранение;
- прилагане на свързващи микотоксини агенти – минерални и от органичен произход (природни или синетични микотоксин-свързващи агенти, при производство на фуражи);
- прилагане на средства, понижаващи резорбцията на токсини в стомашно-чревния тракт (активен въглен), с цел намаляване до възможния минимум на бионаличността на микотоксини и техни метаболити;
- средства за трансформация на микотоксини (химична и ензимна) в организма на засегнати животни с цел получаване на по-слабо токсични или нетоксични метаболити, както и средства за увеличаване на излъчването на микотоксини чрез екскретиране или освобождаване на организма посредством подпомагане на други физиологични механизми;
- избягване на кръстосано замърсяване при извършване на всички посочени дотук дейности;
- засилване на вниманието и повишаване на информираността на хората с оглед целенасочено да следят за засягане на чувствителни култури от гъбички и евентуалното наличие на микотоксини в храни и фуражи, особено когато се касае за продукти, които **не се пускат на пазара** (това правило се отнася по-специално за тази група поради това, че продуктите, които са предназначени за пазара са подложени на следене и контрол, а те – не).
- Както стана ясно, микотоксините са резултат от реализиране на природен механизъм, срещу който в природата има решения. Близките до природните механизми средства имат изразен шанс да предоставят **устойчиво решение** срещу риска от експозиция на хора и животни на микотоксини. Възможности може да бъдат търсени основно в две направления:

- повишаване на устойчивостта на хора и животни срещу вредното им въздействие: подобряване на условията на отглеждане на животни, пълноценно и разнообразно хранене – все предпоставки за повишаване на неспецифичната защита на организмите, като условия за подкрепа на **епигенетичните** фактори;

- прилагане на природни начини за справяне с микотоксини: посочените по-горе земеделски практики, употреба на растителни екстракти и етерични масла, вместо на синтетични и полусинтетични средства, които в много случаи усложняват перспективата за нови решения, поради изграждане на предавана по наследство резистентност.

Стремежът ни да намалим наличието на природни токсини (микотоксини) чрез употребата на синтетични биоциди (пестициди/ фунгициди), поставя въпроса, кои от тях са по-високорискови за живота и здравето. На този въпрос науката е дала отговор

и той не е в полза на прилагането на биоциди. Трябва да поставим на везната правилните аргументи и да вземем правилно решение, без да се интересуваме толкова от икономическите резултати, особено при условие, че биоземеделието показва по-добри резултати в сравнение с конвенционалното (*Finamore et al., 2004; Schneweis et al., 2005*). Вероятно ще се намерят изключения, но те са свързани по-скоро с интензивното отглеждане на монокултури, при които не се спазват изискванията за сеитбооборот.

Освен това, прилагането на синтетични пестициди освен че представлява неоспорим риск за биоразнообразието, изисква разход на сериозен ресурс за контрол по спазването на забрани и карантинни срокове след употребата на пестициди. Далеч не е за пренебрегване и здравният риск за хора и животни, който те представляват.

Политиките на Европейския съюз изискват **устойчиви подходи и решения.** За да бъде изпълнено със съдържание това понятие, стратегиите за намаляване до разумен минимум нивата микотоксини в храни и фуражи, съответно ограничаване на здравните рискове от експозиция на хора и животни, трябва да са природосъобразни, ефективни, да не застрашават биоразнообразието, да нямат вредно влияние върху здравето на живи организми, да не изискват допълнителен ресурс за мониторинг и контрол.

12. ПРЕВАНТИВНИ МЕТОДИ, ПРИЛАГАНИ „НА ПОЛЕТО“[26]

Сеитбооборот

На база на натрупана практика и научни знания, през 2003 г. от *Codex Alimentarius* изготвя принципи за **Добра земеделска практика**, които намаляват замърсяването с гъбички на зърнени култури. Дадени са примери за култури, които се редуват с цел сеитбооборот при зърнени насаждения: картофи, други зеленчуци, детелина, люцерна. По този начин се постига ограничаване на контаминирането с гъбички, продуценти на фузариотоксини. Изборът на култури за сеитбооборот е направен във връзка с факта, че тези култури не са гостоприемници за *Fusarium spp*.

Тази стратегия има за цел да намали вероятността от развитие на плесени/ гъбички, за които се знае, че се развиват **по време на отглеждане и на съхранение** на зърнени суровини.

Редуването на култури (сеитбооборотът) също е елемент, който намалява риска. Например, количеството на ***DON***, намерено в царевица, след като на същата площ е било засято жито (култура, чувствителна на гъбични инфекции, също както и царевицата), се е оказало 6 пъти по-голямо в сравнение с терени, на които са били засети култури, различни от зърнени.

Засаждане

Семената трябва да са свободни от вредители и болести преди засаждането. Тогава те са по-устойчиви на външните условия по време на растежа и развитието си. Използването на сортове, устойчиви на гъбични причинители, също е приложима стратегия. Културните видове, които продължително са били отглеждани в определен

[26] https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390500436185

район, с поколенията са се приспособили към типичните климатични условия, което ги прави по-устойчиви. Това също е фактор, който трябва да се има предвид при избор на сортове, които да бъдат използвани.

Важен е и изборът на **дата на засаждане**, тъй като тя е определяща за датата на цъфтеж. Тя има индикативен ефект върху спорообразуването при гъбичките. Когато освобождаването на спори съвпада с цъфтежа, са възможни по-сериозни и по-чести атаки.

Доколкото това е възможно, при засаждане, следва да се избере период, когато температурите не са високи и има малка вероятност от засушаване (*Codex Alimentarius*, 2003).

Събиране на реколта

Чрез тази стратегия се цели профилактика на увреждане на семената по време на събиране на реколтата: културата да е достигнала зрялост, да се предприемат мерки за предотвратяване на нападения от насекоми (третиране с инсектициди, което включва и прилагане на екстракти от растения и етерични масла), да е направена преценка и избор на период, в който няма валежи и когато не се наблюдават продължителни периоди на засушаване, тъй като сушата води до нарушаване целостта на зърното поради напукване на повърхността – предпоставка за отваряне на входна врата за инфектиране със спори на токсогенни гъбички.

При прибиране на реколтата следва да се обръща внимание на мерки, които да **предотвратят евентуално кръстосано замърсяване** по време на товарене, транспортиране и разтоварване, както и след това при съхранение.

Техники за обработка на земята

Изборът на подходящи техники за обработка може да намалят риска от замърсяване с гъбички. По-интензивните обработки са по-рискови за контаминиране с гъбички, в сравнение с по-слабо интензивните.

Премахването на растителните остатъци след прибиране на реколтата е ефектквино за защита на следващата култура. Тези остатъци са първичен резервоар за контаминирането им. Вероятността от развитие на гъбички след оран, намалява.

Поливане

Поливането на културите при липса на достатъчно валежи е важен фактор за намаляване на контаминирането им с гъбички.

Употреба на биологични и химични агенти

Сушата е стресор за растенията и ги прави податливи на заразяване с плесени. Липсата на вода води до нацепване на повърхността на растението, което отваря входна врата за спорите на причинителите. Прогнозата за времето е важна, за да се подготвят земеделците, когато има риск от валежи, които също са предпоставка за заразяване с гъбични спори. Насекомите също увеличават вероятността от засягане на културите с токсогенни гъбички.

Фунгициди

Употребата на фунгициди, при съвременното земеделие, изглежда неизбежна. Прилагането им има **положителни и отрицателни аспекти**, които са известни.

В полза на прилагането им може да бъде даден пример с едно интересно проучване, извършено от екип от учени, които са сравнили токсичността на два

фунгицида и два микотоксина *ZEA* и *DON* (*Muri et al.*, 2009). Оказало се е, че *DON* е по-силно токсичен в сравнение със *ZEA* и двата фунгицида. От друга страна, прилагането на фунгициди **може** да е добре контролирано и да не създава сериозни предпоставки за неблагополучия свързвани с употребата им. Това изисква **отговорност** от страна на операторите и тези, които извършват третирането.

За да се избегнат неблагоприятни ефекти от прилагането им, е препоръчително да бъдат използвани само при култури, за които са разрешени, при спазване на дозировката, нивото по веригата, на което следва да се прилагат, както и на останалите изисквания, включително на **карантинните срокове**, фиксирани в разрешителното.

Спазването на карантинните срокове е важен аспект при употребата на пестициди, които са дефинирани като **замърсители** и за които са предвидени мерки за мониторинг и контрол. При несъблюдаване на определените карантинните срокове, в продуктите се установяват остатъци, които оказват кумулативен токсичен ефект при консуматорите, особено при чувствителни групи от населението.

Избягване на нападения от насекоми

Известно е че разпространението на инфекция от *Aspergillus flavus* и *A. Parasiticus*, които продуцират афлатоксини, е значително по-голямо при повредени зърна/ядки. Насекомите действат като вектори за пренасяне на спори или създават „критични точки“ в продукта, което благоприятства растежа на гъбички. Насекомите нарушават целостта на обвивка на ядките или зърното, с което улесняват проникването на спори на гъбички. Такива „атаки“ от насекоми е добре да се контролират с **инсектициди**, за които са в сила изискванията за особено внимание при употреба.

Техники за биоконтрол

Техниките за биоконтрол на микроорганизми са все още в процес на разработване при борбата с фузариотоксикоза. Предлагани са различни микроорганизми за контрол на *Aspergillus flavus* и замърсяване на афлатоксини преди прибиране на реколтата. Такива щамове трябва да действат конкурантно. *Dorner and Cole* през 2002 г. показват, че третирането на почвата с **нетоксогенни щамове *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*** значително намалява контаминирането с афлатоксини.

Положителният ефект от третирането на почвата с нетоксогенни щамове *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* преди прибиране на реколтата, се пренася и по време на съхранение.

4. Прилагане на етерични масла или растителни екстракти

В статия[27], публикувана в научния портал на *ScienceDirect* през 2016 г., е направено заключение, че етеричните масла (ЕМ) са ефективни срещу замърсявания с гъбички, съответно – микотоксини. Така се избягва оксидативният стрес, който те причиняват при хора и животни. Прилагането на ЕМ е посочено като ефективен метод за **контрол на растежа на токсогенни гъбички**, без да повлиява вкусовите качества на продукта: етеричните масла са летливи при сравнително ниски температури, при което продуктът лесно се освобождава от тях. Някои от етеричните масла притежават

[27] https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799316300959
https://dx.doi.org/10.1016/j.cots.2016.08.010

качества на **консерванти, особено** приложени в подходяща смес. Те лесно се прилагат под формата на фумигация посредством третиране чрез съвременни технологии, като „капсулиране“. Подходът е природосъобразен и е ефективен за управление на загуби при храни от растителен произход, след добиването им, **по време на съхранение**.

Механизмът на действие на ЕО е свързан с преминаването им през плазмената мембрана на гъбичките, което предизвиква промени в липидната ѝ част. Тя става пропусклива, в резултат на което клетъчно съдържание изтича. ЕО намаляват синтеза на **ергостерол** – стерол, който е специфичен за гъбичките. В статията е направено заключение, че този „природен принцип“, е подходящ за **фумигиране** на храни и фуражи при съхранение.

Евгенол – етерично масло, което се намира в карамфил, индийско орехче, канела, босилек и дафинов лист. Установено е, че инхибира образуването на афлатоксини, без да засяга растежа на гъбичките. Той **действа на ниво транскрипция**, като по този начин блокира синтеза на афлатоксини в ранните стадии на формирането им.

Риган – етерично масло от риган е едно от най-силно действащите етерични масла. Използва се от векове за освобождаване на организма от токсини и повишаване на имуннитета. Етерично масло от риган, заедно с канела, мащерка, и кимион масла **инхибира образуването на афлатоксини**, продуциран от гъбички от род *Aspergillus*.

Канела – тествана в сравнение с четири други етерични масла, канелата е показала **най-добър инхибиторен ефект срещу плесени в различни храни**.

Например, восъчна хартия, напоена с 6%-ен разтвор на канелено масло, потиска растежа на плесени с 96%. Друго проучване показа, че комбинация от етерични масла, която включва и канелено масло, потиска бактериалния растеж в продължение на 60 дни. Проучването подсказва, че канеленото масло **може да се счита за алтернатива на други консерванти на храни**. Това етерично масло има и свойството да подобрява имунитета.

Карамфил – етерично масло от карамфил потиска растежа на гъбичките, също проявява силен антиоксидантен ефект, който се изразява в намаляване на свободните радикали и подобряване на имунната защита.

6. Подбор на генотипове, устойчиви на гъбични инфекции

Сортове, отглеждани на съответна територия („автохтонни“ сортове), често са по-устойчиви на токсогенни гъбични инфекции, което се дължи на приспособеността им към климатичните условия.

Напоследък се използват и трансгенни щамове на растителни култури, които са нечувствителни на контаминиране. Отглеждането на подобни култури в България не е разрешено. Внасянето им подлежи на контрол.

13. МЕРКИ СЛЕД ПРИБИРАНЕ НА РЕКОЛТАТА

1. Сушене

Сушенето и контролът на влагата по време на съхранение се приемат от индустрията като предпоставки от особена важност, тъй като периодът на съхранение е известен като високорисков по отношение на микотоксини.

Начинът на сушене зависи от вида на суровините или продуктите, но трябва да се има предвид, че когато се използват **инсталации за сушене**, рисков фактор е видът на използваното гориво. Твърдите горива, бензин и дизел не са най-подходящи, тъй като носят риск от замърсяване на продуктите с диоксини и полихлорирани бифенили, които са определени като нежелани вещества при фуражи и замърсители при храни. Най-добре е като гориво да се употребява природен **газ,** като до продуктите достига само загрят въздух.

Инсталациите трябва да се поддържат чисти, да се извършва необходимата дезинфекция и дезинсекция, както и да се извършва профилактика на механизмите, с оглед да не се допуска изтичане на гориво или смазочни материали, които да замърсят продукта.

2. Условия на съхранение

Тази стъпка е критична по отношение на предотвратяване на растежа на плесени, съответно – на продуциране на микотоксини. Факторите, които следва да се контролират по време на съхранение са много. Влагата не трябва да надвишава 15%, а температурата да се поддържа относително ниска.

Влажността на зърното не трябва да надвишава 15%, но има автори които препоръчват влагата да се пъддържа на 13%.
В ДИРЕКТИВА 2002/32 НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА от 7 май 2002 година относно нежеланите вещества в храните за животни (ОВ L 140, 30.5.2002 г., стр. 10), стойностите на максимално допустимата концентрация на замърсители е фиксирана при 12% влага в определен фураж. Това налага определяне съдържанието на влага преди пробата да бъде подложена на изследване за съдържание на микотоксини. Когато влагата в пробата се различава от 12%, резултатът от изследването се преизчислява.

При ниско съдържание на влага метаболитните процеси в зърното се забавят, като едновременно се постигат условия, при които намалява вероятността от развитие на токсогенни гъбички.

Поддържането на съоръженията за съхранение **чисти и сухи** е друг съществен елемент. Най-добре е помещенията или силозите се запълват, без да се допълват с нови, преди да са били напълно освободени от старите количества. Това позволява **почистване и дезинфекция**. Важно е, да не се допуска смесване на зърно от различен произход, особено когато се очаква то да престои продължително време.

Обемите, които се използват за съхранение трябва да позволяват освен добра **вентилация**, и възможност за **фумигация**, както и други видове третиране на суровините или продуктите.

С цел контрол на гъбичките се прилага продухване на обемите за съхранение с **въглероден диоксид**, който изтласква въздуха. Така, гъбичките, които изискват кислород за развитието си, спират да се намножават, поради създадената безкислородна среда.

Дори при спазване на всички изисквания за съхранение, не е изключено да се наблюдава повреждане на качеството и безопасността му поради контаминиране с

микотоксини. Когато става дума за големи количества зърно, собственикът може да си позволи за загуби известно количество зърно, с оглед да се предотврати контаминиране на други количества. Отделеното като съмнително или действително замърсено зърно, следва да бъде изгорено или дълбоко заровено.

Отделяне на триците при зърнени култури

Физичен метод за намаляване на риска от гъбички и микотоксини при зърнени култури е отделянето/олющване на обвивката на зърното и премахване на **триците**, които са по-силно контаминирани в сравнение с цялото зърно. Възможно е триците, поради високо ниво на микотоксини, да не са подходящи за употреба в хранителната верига.

Сортиране

Контаминираното с гъбички зърно няма същият цвят и относителна маса, в сравнение със здравото зърно. Това позволява сортиране по вид и относителна маса.

Тези методи не са сигурни, но както твърдят авторите, може да намалят до известна степен количеството на токсини в продукта.

При ябълки, които са предназначени за производство на сок, разрязването на плода и почистването му, може да доведе до **намаляване на патулина до 95%**.

Измиването също дава добри резултати – първата операция при производство на спагети е измиването, което **намалява количеството на *DON* с 23%**.

Облъчване

Повечето микотоксини не се повлияват от лъчения. В процеса на радиолиза на водата се получават свободни радикали, а те може да реагират с микотоксините. *AFB1* е чувствителен на *UV-, x-* (рентгенови) и *gamma* лъчи, при което токсичността намалява, като в допълнение, *gamma* лъчите намаляват и микробното замърсяване.

Микровълните може да намалят афлатоксините във фъстъци, както и трихотецени в царевица.

Пресоване/налягане

Пресоването премахва *DON, ZEA и FB1* от царевица. Пресоването предполага молекулярни модификации като например денатуриране на протеини и потискане на ензимната активност. Методът не е селективен, което означава че се унищожават и протеини, които не са били цел на процеса.

14. БИОЗЕМЕДЕЛИЕ

Понятието биоземеделие включва много по-голям обем, но тук е взет един показателен пример, който илюстрира полезните аспекти на прилагането на природосъобразни подходи при разрешаване на въпроси, свързани с контаминирането на култури с микотоксини.

Редица проучвания, едно от които е цитирано тук, показват, че:

По-висок риск от контаминиране с гъбички и микотксини съществува при конвенционалното земеделие, където се прилагат фунгициди, сравнен с биоземеделието (Finamore et al., 2004; Schneweis et al., 2005).
Пример: царевица, произведена в биостопанство показва 50% по-слабо контаминиране в сравнение с царевица, отглеждана конвенционално.

Това учените обясняват с по-слабата интензивност на почвени обработки, с това че културите се поливат с цел намаляване на стреса при засушаване, прилага се сеитбооборот и плитка оран. Повишава се активността на биомасата в „био-“ почвата (*Arino et al.,* 2007).

15. ТОКСИКОКИНЕТИКА И ТОКСИКОДИНАМИЯ

Как се дефинира бионаличност и какви параметри я повлияват, когато става дума за микотоксини?

Бионаличност, тук означава, количеството токсин или токсини, което попада в кръвоносната система след резорбирането им през храносмилателната система.

Бионаличността зависи от концентрацията на замърсители в храна или фураж, от вида животно (или при хора), пола, възрастта, телесната маса, хранителните навици и физиологичното състояние, възможният прием за определен период от време – остра и хронична експозция. Проучването на **хранителните навици** на населението е особено важно при **чувствителни групи**. Като чувствителни се дефинират групи в определено физиологично състояние (примерно, бременни жени) или определен етап на растеж или развитие (ембрионално или постнатално развитие; кърмачета, малки деца, юноши).

Неспецифичтата устойчивост на индивида освен от храненето, е съществено зависима от условията на отглеждане и здравето на храносмилателната система, което повлиява резорбцията. Всички посочени, както и други външни за организма фактори и условия въздействат на генната експресия. Тези явления се изучават от сравнително нова наука – **епигенетиката**, чието наименование в смислов превод от гръцки означава наука за „надгенетичните“ фактори: колкото условията, при които живее индивидът са по-близки до естествените за вида (при животните това означава спазване на принципите за хуманното отношение), толкова по-слабо е влиянието на болестотворни фактори, включително токсични агенти.

Освен бионаличност, при **силно токсични субстанции,** се използва и **прогнозна (изчислена) експозиция**: животни, особено хора, не може да бъдат остро експонирани на влиянието на токсини, така че експозицията се изчислява на базата на фактори, които я обуславят. Хроничната експозиция също се прогнозира/ изчислява: борави се с понятието **прогнозна хронична експозиция**.

Бионаличността зависи от особеностите на **токсикокинетиката** на съответен токсин. Елементи на токсикокинетиката са: резорбция – при хранителна експозиция това става през органите на храносмилателната система, разпределяне, трансформиране или метаболизиране (съдбата на токсина в организма) и елиминиране от организма чрез екскреция и/или секреция.

След попадане в кръвния ток, токсинът се „разпределя“ в органи и системи. Съществена част от микотоксините имат силен афинитет към кръвните протеини, с които се свързват (за повечето митококсини **до 90%, а за Охратоксин А дори 99%**, тъй като при него се наблюдава секреция и реабсорбция през ентеро-хепаталния път, след което се освобождава от плазмата поради натрупване в органите или чрез екскреция през проксималните и рядко през дисталните бъбречни тубули (*Dahlman et*

al., 1988). След многократна хранителна експозиция, е установено, че разпределението е, както следва**: плазма >>бъбреци>>черен дроб.**

Средното съотношение кръв/бъбреци е от 4 до 6 (*Breithholtz-Emanuelsson et al.,* 1993)). Някои учени смятат, че **отложеното действие на микотоксини или хроничните ефекти върху организма не винаги се дължат на продължителна експозиция, а е възможно токсичните ефекти да се дължат на постепенно и дълготрайно освобождаване на микотоксините, свързани с кръвните протеини**.

Това обаче не е универсално правило, което се доказва от факта, че постъпилият в организма на преживни афлатоксин В1, в променен вид бива „отделен"/ секретиран чрез **млякото** под формата на афлатоксин М1. Тъй като не се повлиява при термична обработка, той остава и **в млечни продукти**. Този микотоксин е силно рисков за кърмачета и малки деца поради особеностите на хранене, ниската телесна маса и механизма му на действие – той влияе на фундаментално ниво: свързва се с гуанина от ДНК, като по този начин променя кода на азотните бази. Учените твърдят, че това е механизмът на който се дължи генотоксичният, мутагенният и канцерогенният ефект на афлатоксините.

Друг елемент, от който се определя ефектът от експозицията е **токсикодинамията** на съответната субстанция – специфичният ефект, който тя оказва върху тъкани, органи или системи в организма на животни и хора.

В случая с микотоксините, екскреция или секреция, са пътищата за напускане на токсините от организма. Органите, през които се извършва обезвреждането или елиминирането на токсините са едновременно и най-силно засегнатите: метаболити на някои микотокнини или техни базови форми биват **екскретирани чрез бъбреците**, като причиняват известната като **Балканска ендемична нефропатия при хората**.

Обезвреждане на микотоксини се извършва в **черния дроб**. При афлатоксин В1 това води до раково израждане на чернодробния паренхим, като причинява **хепатоцелуларен карцином**. През черния дроб, микотоксините или техни метаболити попадат в храносмилателната система, от където се екскретират.

Генотоксичният ефект на микотоксините се проявява при делене на клетки. Това е причината те да оказват **имуносупресивен ефект** – чрез повлияване на деленето и диференцирането на стволови клетки до кръвни елементи, които имат отношение към имунния отговор.

Познаването на токсикокинетиката и токсикодинамията на отделните микотоксин **подсказва начините** за обезвреждане и елиминиране от организма. Като пример за прилагане на подобен подход, може да се посочи използването на факта, че микробиотът (нормалната микрофлора), който обитава сложния стомах при преживни животни, по-точно ензимите, които тези микроорганизми синтезират, меаболизират попадналите микотоксини. Получените метаболити са с понижена токсичност. Този факт е послужил за разработване на продукти, разрешени като фуражни добавки, които се прилаган с цел контрол на микотоксини: микроорганизми, клетъчни стени или продуцирани от микроорганизми ензими, в качеството им на специфични средства за трансформиране на микотоксини.

16. СТРАТЕГИИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НАЛИЧИЕТО НА МИКОТОКСИНИ[28] В СУРОВИНИ И ПРОДУКТИ

Природният характер на микотоксините предполага, че **най-устойчиви** механизми срещу тях са природните средства. Микотоксините в по-голямата си част са **стабилни съединения**, поради което методите за детоксикация са малко на брой. Някои методи се оказват неприложими поради високата им цена. Има случаи, когато обработката предизвиква промени във вкуса или други качества на продуктите, което ги прави неизползваеми. Всеки процес изисква доказване и количествено определяне на остатъчните субстанции, получени в резултат на третирането, независимо от приложения метод за детоксикация.

С оглед **валидиране** на процесите е необходимо и да се докаже, че в резултат са получени по-слабо токсични или нетоксични метаболити на микотоксините. Когато това не е възможо, методът не се прилага в практиката.

Има физични, химични и биологични методи за детоксикация.

При декотксикация на фуражи се съблюдава Регламент (ЕО) № 2015/786 на Комисията от 1 май 2015 г. относно критеиите на приемане на методи за дотоксикация, прилагани за продукти предназначени за хранене на животни, предвидени в Директива 2002/32 на Европейския парламент на Съвета (ОВ, L 125/10 от 21 май 2015 г.), който се прилага от 1 юли 2017 г.

Детоксикация на фуражи имат право да извършват оператори, одобрени по Закона за фуражите за тази дейност.

А. ФИЗИЧНИ МЕТОДИ

Част от физичните методи бяха разгледани: механично отстраняване на силно замърсени фракции от суровините чрез сортиране, почистване, измиване, смилане, люцене и облъчване. Тук ще бъде изяснено прилагането на **адсорбенти/свързващи агенти/байндери**, които все още са ограничени до производството на фуражи[29] (8). Употребата на байндери се счита за обещаващ подход. Недостатък при него е, че те са **неспецифични**, в резултат на което свързват и основни хранителни вещества, лекарствени субстанции и антибиотици. Адсорбентите имат различна ефикасност спрямо различни класове микотоксини, а **при трихотецени са почти неприложими**.

Много от байндерите улавят афлатоксини, но малко от тях влияят на другите микотоксини (Научно становище на *EFSA* от 2009 г.).

Свързването на микотоксини (ползване на байндери) е добро индустриално решение, поради относително ниската му цена в сравнение с биотрансформацията. Тази техника обаче може да доведе и до **отрицателни странични ефекти**. Всъщност, адсорбцията може да бъде и обратима, което носи риск: микотоксинът може да се десорбира в храносмилателния тракт, а свързването му с байндера да не е специфична и стабилна, поради което байндерът свързва хранителни вещества, поради което се намалява общата хранителна стойност на третираните фуражи (*Phillips et al.* 2008).

Кои са търсените качества при байндерите:

[28] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408185/

[29] Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds. *Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L Front Microbiol. 2016; 7():561.*

1. да притежават качество да свързват микотоксини, при което селективността по отношение на конкретен микотоксин/и е желан ефект;

2. да намаляват в значителна степен токсичността при животни, без да причиняват нежелани странични ефекти или поне негативните ефекти да не надвишават положителните – високо съотношение полза/риск;

3. цената да е поносима;

4. в резултат от прилагането им, в третираните суровини и храни, да няма микотоксини или остатъци от свързващото вещество;

5. ефективността от прилагането да е доказуема и доказана;

6. да не „маскират“ наличието на микотокснини;

7. да са приложими при промишлено производство на фуражи;

8. връзката между сорбента и микотоксина да е здрава: да не позволява десорбция и да не намалява хранителната стойност на фуражите поради улавяне на хранителни вещества (поради неспецифичност на процеса);

9. да са ефективни по продължение на целия храносмилателен тракт (да са стабилни както в кисела, така и в неутрална среда);

10. да ограничават резорбцията на токсини в стомашно-чревния тракт, съответно, да ограничават разпределението им чрез кръвта в целеви органи.

Физико-химичните свойства (полярност, разтворимост, разпределение на заряда, молекулна маса, дисоциационна константа) на микотоксините и адсорбентите определят ефективността на процеса на свързване между тях.

Байндерите се проверяват за ефективност и ефикасност освен *in vitro*, и *in vivo*, тъй като не всички намерени теоретични решения са еднакво приложими в практиката.

Най-често деконтаминиране се прилага в процеса на производство – от индустрията: използват се сорбенти, ензими или микроорганизми. През 2009 г. в законодателството по фуражи е създадена ***нова функционална група фуражни добавки:*** *„субстанции, които намаляват замърсяването с микотоксини – те потискат адсорбцията, повишават екскрецията или модифицират начина им на действие в гастро-интестиналния тракт“. Тези ФД може да* ***намалят бионаличността на микотоксини, да ги разграждат или трансформират в по-слабо токсични метаболити***.

Пример:

- *За намаляване на AFB1се прилагат байндери като глина и зеолити.*
- *При OTA, ZEA и FB1 по-добър ефект имат биологичните сорбенти, които се изучават по-интензивно, поради недостатъците на минералните адсорбенти.*
- *DON, T-2 и HT-2 не се свързват ефективно с нито един от байндерите.*
- *Химична и биологична трансформация на трихотецени са разгледани тук: (He et al., 2010).*

В Европейския съюз е разрешено прилагането на байндери **само при фуражи. Байндерите са включени в регистъра**[30] **на фуражните добавки**.

Известни са неорганични, органични и биологични адсорбенти/байндери.

Б. НЕОРГАНИЧНИ АДСОРБЕНТИ

Към неорганичните микотоксин–адсорбиращите агенти се отнасят:

1. **хидратиран натриево-калциев алумосиликат** (*HSCAS*).

Тези сорбенти имат слаб афинитет към ***OTA*** *(Huff et al., 2008). По отношение на* ***ZEA****, резултатите са противоречиви – някои изследвания показват понижаване на нивото на хромозомните аберации при мишки (Abbes et a;., 2007), а други – удължаване времетраенето на бременността при норки. По отношение на DON – авторите (Patterson and Young, 1993), на проучване с прилагане на HSCASs при свине, не установяват никаква разлика при групи животни, когато едни от тях са били третирани с HSCASs, а други – не.*

Описаните в литературата изследвания посочват, че с добавяне на хидратиран натриево-калциев алуминосиликат (HSCAS) във фуражи се постига почти пълна защита срещу афлатоксикоза, но ефикасността му срещу останалите видове микотоксини е много ниска. Накои автори посочват, че при HSCASs, отговорът е дозово зависим (*Smith et al.,* 1994).

2. **Бентонити, зеолити, клиноптилолити** и други – някои от които ненапълно охарактеризирани: бентонитът е основен глинен материал, произхожда от вулканична пепел и съдържа предимно монтморилонит: хидратиран натрий-калций-алуминиево-магнезиев силикатен хидроксид. Структурата наподобява силициеви листове с високо съдържание на вода. Формираните канали са с различни размери, позволяват движение на молекули навътре и навън от структурата. Благодарение на тази структура, зеолитът притежава огромна специфична повърхност **(около 1000 m^2 на g зеолит).** Зеолитните минерали показват много по-ниски абсорбционни свойства на афлатоксини спрямо избелващите глини, дори за някой по-чувствителни животни може да са токсични.

Бентонитът и монтморилонитът адсорбират от 40 до 100% от ***OTA*** във виното (*Kurtbay et al.* 2008). *Lemke et al.,* 2001a не успява да покаже положителен *in vivo* ефект върху плъхове. Всъщност теглото на матката на плъхове се увеличава с лечение на монтморилонит, което предполага *повишаване на естрогенната токсичност при лечение*. Лек положителен ефект е наблюдаван от *Carson и Smith* (1983a) за добавяне на бентонит в ***T-2*** замърсена с токсини храна, тъй като 8% от телесното тегло е възстановен след лечението. 9% наддаване на телесно тегло е наблюдавано при пилета, третирани с бентонит, когато фуражът е съдържал смес от ***AFB1*** **и** ***FB1*** (*Miazzo et al. 2005 г.*).

Някои видове **клиноптилолити** не може да бъдат използвани като свързващо вещество, тъй като добавянето им в присъствие на *AFB1* причинява тежки лезии, които се обясняват с неспецифична адсорбция на важни съединения, които се освобождават в резултат от патологичнте процеси при афлатоксикоза (*Mayura et al.* 1998).

[30] https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03.pdf

3. Редица изследвания са проведени с **химически модифицирани силикати**.

Do¨ll et al. (2004) разглежда химически модифициран алумосиликат, който показва добро свързване със *ZEA in vitro*, което потвърждава предишен резултат (*Lemke et al. 1998; Tomašević-Canovic et al. 2003 г.*). Химически модификации силикати са увеличили свързването на *HSCAS* със *ZEA* (*Pimpukdee et al.*, 2004).

4. Хидрофобни зеолити (октадецилдиметилбензил, обработен с амоняк зеолит) се използва най-вече за адсорбиране на **OTA и ZEA** (*Дакович и др. 2003 2005 2007*). Адсорбцията ефективността на хидрофобните зеолити може да се обясни чрез хидрофобни взаимодействия между OTA и ZEA и свързващото вещество.

5. Избелващите глини (монтморилонити / бентонити) потискат влиянието на афлатоксин B1 в хранителните режими на много видове селскостопански животни; Някои сорбенти като *NovaSil* (глина) действат като **селективни ентеросорбенти** – оказва се, че **те не свързват молекули на витамини, минерали и други хранителни вещества при хора** (*Afriyie-Gyawu et al.*, 2008).

6. Активен въглен – получава се чрез пиролиза на органични материали. Силно порьозен материал, който има голяма активна повърхност и може да работи във водна среда. Употребата му при това условие е универсална. За пръв път е изпитан в опити за адсорбция на афлатоксин B1. При следващи проучвания ефектите на активния въглен са се оказали променливи. *Galvano et al.* (1996) показват, че остатъци от афлатоксин в краве мляко са намалели, независимо от източника на активен въглен, но ефектът не надвишава този, при използване на глина, хидратиран натриево-калциев алумосиликат (*HSCAS*) като свързващо вещество (*Diaz et al.* 2004). Резултатите не са еднозначни и някои от тях показват, че ефикасността на свързване на афлатоксин с байндери на базата на глина, са по-добри (*Edrington et al.* 1996, 1997).

Активният въглен може да се окаже подходящ за свързване на ZEA и / или DON (*Do¨ll et al. 2004; Bueno et al. 2005; Sabater-Vilar et al. 2007* г.). В *in vitro* стомашно-чревен модел, активният въглен намалява количеството на ZEA, DON и NIV (*Avantaggiatto et al.* 2003, 2004). Въпреки това, адсорбцията на охратоксин A (OTA) няма положителен ефект върху телесно тегло на пилета (*Rotter et al.* 1989). За FB1, съотношението сфинганин / шингозин не е промемено при плъхове след добавяне на въглен към замърсени фуражи (*Solfrizzo et al.* 2001). За токсините T-2 и HT-2, резултатите са променливи, в зависимост от вида животно.

При проведен опит е установено, че 50% от мишките са оцелели, когато са били хранени със замърсен фураж, докато 90% е била преживяемостта след добавяне на активен въглен (*Fricke и Хорхе* 1990). От друга страна, при птици не е бил наблюдаван такъв ефект: с или без лечение, телесната маса на наблюдаваните птици е намаляла с 20%.

Важно е да се отбележи, че против микотоксини, ***липсват специфични антидоти****.*
Активният въглен *е най-подходящият адсорбционен агент при висока токсичност в резултат на случайно поглъщане на високи дози микотоксини/остра експозиция.*
Ограничения при минералните сорбенти

Те са обикновено активни против AFB1, но ефикасността им при други микотоксини варира. Още повече, при някои от тях ***прибавянето на глина увеличава степента на ефекта при микотоксикоза****.*

В. ОРГАНИЧНИ СОРБЕНТИ

Според някои автори, използването на микробни агенти за детоксикация (живи клетки) намалява поради регулаторни, токсикологични и потребителски съображения.

Прилагането на ензими за детоксикация представлява специфичен алтернативен метод за намаляване на нивата на микотоксини. С помощта на техники на молекулярното инженерство са получени гени (*Takahashi-Ando et al.* 2004), които позволяват клониране и включване в генома на безопасно микроорганизми, от които се получат колечиства рекомбинантни ензими. Методът позволява промишленото им производство и детоксикация в индустриален мащаб (*Althali и Deeb* 2009).

Все пак, органични свързващи вещества и микроорганизмите са обещаваща алтернатива на неорганичните адсорбенти за детоксикация на микотоксините, като например[31]: **компоненти на клетъчната стена на дрожди (**лиофилизирани продукти**), синтетични полимери (холестирамин, поливинилпи-ролидон), хуминови киселини и фибри (диетични влакна).**

1. Синтетични полимери

Холестирамин и поливинилпиролидон имат способност да адсорбират мико-токсини.

Холестирамин – адсорбира *ZEA* и *FBI*; при плъхове увеличава екскрецията на OTA; слабо – до 5% - адсорбира *DON* в храносмилателния тракт.

Поливинилпиролидон – водоразтворим полимер, който се свързва с *AFB1, ZEA in vitro*, но няма данни де понижава токсичността на *DON* при прасета.

2. Хуминови киселини (*humic acids*) – сложни органични съединения, компонент на хумуса. Те поглъщат микотоксини, особено *AFB1* и *ZEA* (*Jansen van Rensburg et al.,* 2006), но не и *DON*.

3. Търговски адсорбенти – представляват смес от различни субстанции. Такъв е *Standart Q/FIS* – комбинация от активен въглен и *HSCAS* (*Avantaggiato et al.,* 2007).

4. Фибри - несмилаемите фибри имат ограничен адсорбционен потенциал. Фибрите са въглехидрати, които се намират в растителни култури и продукти от тях. За разлика от другите въглехидрати, те не се усвояват в тънките черва, а достигат дебелите черва – колона. Преживните животни (сложен стомах), могат да усвояват целулозата благодарение на **микробиота**, който обитава стомаха им. Същата причина ги прави и най-малко чувствителни на микотоксини, които претърпяват изменения и биват доведени до слаботоксични продукти. Въпреки посочените обстоятелства, продукцията *(мляко, месо и вълна),* репродукцията и растежът може да се променят когато преживните животни поемат зъмърсен с микотоксини фураж за по-продължително време *(Hussein & Brasel, 2001).*

Групата на фибрите[32] е представена от **разтворими и неразтворими вещества**. Разтворимите, като например пектин и бета-глюкани се намират в плодове,

[31] https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mycotoxin/pdf
[32] https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004851

зеленчуци и овес, а най-типичен пример за неразтворими фибри е **целулозата –** полизахарид, който се намира в растенията.

Фибрите намаляват ефектите от *ZEA* (*Tangni et al.,* 2006) при плъхове и свине, а от ***T-2* то**ксин – при плъхове.

Микронизирани фибри показват ефективност срещу микотоксини: намаляват абсорбцията, съответно и бионаличността им и свързаните токсини. По-ефикасните сорбенти са и по-скъпи, което често кара хората да търсят алтернативни материали, като **отпадъци от захарна тръстика, дървени въглища, торф, пръст, хитин, пепел**. Такива сорбенти нямат свойства да свързват ефикасно микотоксини и трябва да бъдат вложени в по-големи количества.

Г. БИОЛОГИЧНИ СОРБЕНТИ

Поради ограниченията при минералните и органичните сорбенти, проучванията се насочват към биологични сорбенти (живи бактерии), в опит да се постигне по-висока специфичност и да се избегне влиянието върху хранителната стойност на фуражи.

Биологични сорбенти са живи непатогенни микроорганизми (бактерии или нетоксогенни гъбички).

Интересно е, че **млечнокиселите бактерии и бифидобактериите** се свързват с *AFB1*, но в научните среди се приема, че е необходимо провеждане на изследвания върху точния механизъм на свързване на микотоксина с привлечените от него молекули, при което да се изяснят условията, които биха довели до десорбция на токсините, с цел избягването им.

1. Добавянето на **естерифициран глюканов полимер** към замърсени с афлатоксин фуражи за млечните крави, значително намалява афлатоксина в млякото (*Diaz et al.* 2004). Наблюдавано е възстановяване на телесната маса и биохимичните параметри, при коне след добавяне на **глюкоманан** към диетата им (*Raymond et al.* 2003 г.). *Yiannikouris и др.* (2004) демонстрира механизма на свързване на глюкан, модифициран с дрожди, със *ZEA*. Глюканов полимерен продукт също оказва защитен ефект при свине, бройлери (*Swamy et al.* 2002b; *Swamy et al.* 2002a) и кокошки (*Chowdhury and Smith* 2004) срещу някои от вредните ефекти на комбинация от микотоксини, но без възстановяване на темпа на растеж. *Aravind et al.* (2003), използвайки хранителни добавки с 0,5% естерифицирани глюкоманан, облекчена депресия на растежа при бройлерите свързани с естествено замърсени диети, съдържащи *AFB1, OTA, ZEA* и *T-2* токсин.

Глюкановият полимерен продукт не облекчава токсичните ефекти при диети за норки, при замърсяване с *FB1, OTA*, монилиформин и *ZEA* (*Bursian et al.* 2004 г.). Отрицателните ефекти на *ZEA* и *DON*, измерени чрез биохимични и имунологични параметри при прасета са облекчени чрез добавяне на екстракт от мая, обогатен с глюкоманан към диетата им (*Swamy et al.* 2002b).

Distribution of ochratoxin A in plasma and tissues of rats fed a naturally contaminated diet amended with micronized wheat fibres: Effectiveness of mycotoxin sequestering activity
https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.029

При *in vitro* експеримент, 183 mg T-2 / HT-2 токсинът се адсорбира върху глюкан, модифициран с дрожди (*Freimund et al.* 2003). Адсорбция на FB1 от дрожди или екстракт от тях е ограничен (*Yiannikouris* 2004), но при T-2 и HT-2 отговорът на свързване е променлив когато е приложен глюкан, модифициран в резултат от действието на дрожди (*Freimund et al.* 2003).

2. Млечнокисели бактерии

Propionibacterium spp. и *Bifidobacterium* spp. имат свойство да свързват микотоксини (*El-Nezami et al.* 2000 2002a; *Haskard et al.* 2001; *Oatley et al.* 2000). Според авторите, свързването няма химичен характер, а е с физическа природа, когато става дума за *DON*, диацетоксисерпенол, ниваленол и други микотоксини. Друг екип изследователи са установели, че свързването се осъществява чрез хидрофобни джобове върху бактериалната повърхност (*Haskard et al. 2000; El-Nezami et al. 2004*).

Ефективността на адсорбцията зависи от щама (Peltonen) и др. 2001 г.). Адсорбция на AFB1 и AFM1 е обратима и е възможна с живи или убити бактерии. Киселинно или топлинно инактивиране на млечнокисели бактерии повишават адсорбционната ефективност (El-Nezami и др. 1998 2000 2002b; Pierides et al. 2000; Haskard и др. 2001; Bueno et al. 2007; Fazeli et al. 2009 г.). OTA може да се адсорбира и от млечнокисели бактерии (Fuchs и др. 2002), което води до намаляване на токсичността върху човешки чернодробни клетки (Del Prete et al. 2007). ZEA се адсорбира при pH между от 4 до pH 8 (El-Nezami et al. 2002b); при по-ниска температура и в киселла среда, се наблюдава повишена ефективността на адсорбцията (Niderkorn et al. 2006; El-Nezami et al. 1998, 2002б). Свързването на FB1 и DON от Lactobacillus rhamnosus не показва особено висока ефективност (Niderkorn et al. 2006); смята се че в процеса на свързване участват хидрофобни взаимодействия (Haskard et al. 2001 г.).

Микроорганизми, като **млечнокисели бактерии** с техните противогъбични свойства, изглежда са потенциално много ефективни за превенция (*Kabak et al.* 2003) на образуването на микотоксин. Все още не са уточнени противогъбичните свойства на млечнокиселите бактерии. Предполага се **микробна конкуренция**, както и извънклетъчни метаболити, които са устойчиви на топлина и са нискомолекулни.

3. Гъбичните конидии (спори чрез които гъбичките се размножават безполово) свързват микотоксини, особено *ZEA* и *OTA*, поотделно или заедно (*Jard et al. 2009*). Между 29 и 60% от *ZEA* се елиминира, в зависимост от изолата и времето за инкубиране. *Jard et al.* (2009).

Има данни, че конидиите може да се използват за детоксикация на вино, засегнатото от *OTA* (*Bejaoui et al.* 2005).

5. Дрожди или екстракти от тях: афинитетът на клетъчната им стена спрямо определени микотоксини представлява интерес, но са сравнително слабо проучена алтернатива на неорганичните адсорбиращи агенти; не са ефективни по отношение на афлатоксин M1.

Дрожди от вид *Saccharomyces Cerevisiae*, някои щамове на млечнокиселите бактерии (*Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus rhamnosus LC-705*), а също и вид *Streptococcus Thermophilus NG40Z*, проявяват адсорбиращи свойства.

За *Saccharomyces cerevisiae* е доказано, че свързва *AFB1* (*Shetty and Jespersen* 2006) и намалява негативните ефекти на *AFB1* при бройлери (*Stanley et al.* 1993) и при плъхове (*Madrigal-Santilla´n et al.* 2006). **Защитният ефект на живи дрожди срещу афлатоксина е потвърден при плъхове, но термично обработени дрожди/мая се оказват неефективни** (*Babtista et al.* 2002).

За разлика от тях, някои термолизирани клетъчните стени на дрожди са по-ефективни при адсорбиране на *ZEA* (*Yiannikouris* 2004).

Естерифицираният глюкоманан (полимер), изолиран от клетъчната стена на дрожди, се свързва с *AFB1, OTA* (*Bejaoui et al.* 2004; *Cecchini et al.* 2007; *Angioni et al.* 2007 г.) и *T-2* токсин (Freimund et al., 2003), поотделно и в комбинация (*Raju и Devegowda* 2000; *Aravind et al.* 2003; *Yiannikouris* 2004; Karaman et al., 2005 г.). Прибавяне на естерифицирани глюкоманан от 0,5 или 1,0 g kg^{-1} към диети, съдържащи 2 *mg* от общото количество афлатоксин, показва дозозависим отговор при пилета бройлери (*Basmacioglu et al.* 2005).

Д. ХИМИЧНИ МЕТОДИ

Известни са методи като аминиране (9) (третиране с амоняк), обработване с киселини (10), алкална хидролиза (11), пероксидация (12), озониране (13) и прилагане на бисулфити (14), но **приложението им е ограничено**, което е свързано с потенциална токсичност на остатъчни количества вещества (онечиствания), които не са отстранени след обработката, недобрата ефикасност, високи разходи или отрицателни ефекти върху качеството на третираните продукти.

В рамките на ЕИО, към момента, обработка чрез химични методи не е разрешена за продукти, предназначени за консумация от хора.

Има вероятност, за в бъдеще, разработените методи за детоксикация по химичен път, да бъдат въведени и при храни. Засега те не се смятат като безопасни за хора, поради това че в крайните продукти не винаги се откриват веществата, до които са се разградили микотоксините, което оставя съмнения за токсичността им. Освен това, се намират остатъци от приложения химичен агент, което променя органолептичните свойства на храната.

Химична детоксикация е възможна, когато се вземе решение, контаминирани продукти да бъдат обработени при промяна на предназначението им, без това да води до риск за безопасността. Тук се има предвид възможността, която по-високите стойности за пределно допустими нива микотоксини при фуражи дават, когато определени продукти предназначени за храни не може да бъдат пуснати на пазара.

1. Оксидация / окисляване

Озон и водороден пероксид често се прилигат за детоксикация, тъй като реагират с много функционални групи. Продукти на тази база намаляват микробиологичното замърсяване, но проучвания показват, че не липсват странични ефекти. Прилагането на 10%-ен водороден пероксид разгражда 84% от *ZEA* при 80°C за 16 часа (*Lemke et al.,* 1999). Биологичната активност на трихотецени се променя при

третиране с озон, като най-вероятно атакува двойната връзка, който имат трихотецените (*McKenzie et al.,* 1997).

2. Редукция

Редуциращи агенти, като аскорбинова киселина (витамин С), $NaHSO_3$ (натриев бисулфит), $Na_2S_2O_5$ (натриев метабисулфит), понижават нивата на микотоксини, особено на *AFB1* и *DON* (Kabak et al., 2006). Проучвания показват, че намаляването на токсичността на *DON* което намалява потискащия ефект на токсина и подобрява храненето при прасета.

3. Аминиране

Третиране чрез химични процеси за детоксификация на афлатоксини – например с амоняк, е разрешено в Съединените щати, но не и в ЕС. Такова третиране не е разрешено в ЕС за продукти, предназначени за хора (*EU Commission Regulation 2001*). Причина за това е, че трансформацията чрез добавяне на химични субстанции може да доведе до токсични производни в третираните продукти. Тези странични ефекти ограничават прилагането им във фуражи (*Kabak et al.* 2006).

Често се прилага при фуражи за намаляване на токсичността на AFB1, който преминава в *AFD1*. Тази практика е използвана с години. Процесът е ефективен при висока температура и под налягане. Други микотоксини не се повлияват при това третиране. Методът е скъп, а и повлиява качеството на продуктите поради остатъци от количество амоняк.

4. Алкализиране

Структурата на микотоксините може да се променя в алкална среда. Например, 12-13 епокси групата на DON може да се отвори (*Bretz et al.,* 2006).

5. Подкисляване

Третирането със силни киселини прави *AFB1* биологично неактивен, като го превръща в друга форма. Третиране със солна киселина (pH 2) намалява нивата на *AFB1* с 19% в рамките на 24 часа.

6. Деаминиране

Прибавянето на $NaNO_2$ (натриев нитрит) във водна среда деаминира *FB1*, при което токсичността намалява.

Химичните методи показват **недостатъци**: висока цена, лошо качество на продуктите след третирането им, недостатъчна ефикасност, ниска специфичност, консуматорите имат резерви по отношение на този начини за детоксикация.

Независимо от сериозните усилия, количеството на микотоксини да бъде ограничено чрез мерки, които се прилагат преди и/или след засяване на културите (вкл. отстраняване чрез химични и физични методи), изводът е, че биотрансформацията е значително по-обещаваща алтернатива, но трябва да се има предвид, че крие редица предизвикателства[33].

Е. БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ - БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЧРЕЗ ЕНЗИМИ

[33] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408185/ doi: 10.3390/toxins9040111 (Toxins (Basel). 2017)

Ензимната трансформация се дефинира като разпадане на микотоксини до по-слабо токсични метаболити при използване на бактерии/гъбички/дрожди или ензими – **микотоксин–биотрансформиращи агенти** (15) в храносмилателния тракт на животни – преди да настъпи резорбция.

Използването на микроорганизми за детоксикация на микотоксини се прилага само при фуражи и изисква съблюдаване на определени предварителни изисквания:

- идентифициране на биотрансформиращия потенциал на микроорганизми да разграждат токсини;
- идентифициране и определяне на токсичността на получените в резултат от детоксикацията субстанции, а когато това е възможно, проверка чрез прилагане на различни методи;
- получените в резултат на адсорбиране продукти, да не притежават токсичност;
- биотрансформацията да е бърза и микроорганизмите да са ефективни при различни количества кислород в средата или при различно pH, особено когато се касае за трансформация по време на храносмилането;
- микроорганизмите да са непатогенни;
- микроорганизмите да са активни в среда на много други субстанции и да не се инхибират от хранителни вещества (специфичност);
- ефективността на трансформацията трябва да бъде оценена *in vivo*.
- при разграждане на микотоксините, да водят до нетоксични метаболити както при аеробни, така и при анаеробни условия;
- да са безопасни за животните и стабилни в стомашно-чревния тракт.

В литературата са посочени няколко вида **микроорганизми, които отговарят на тези изисквания:**

1. Бактерии от вида *H. corynebacteroides* са високо ефективни по отношение детоксикацията на афлатоксини в различни субстрати, в това число и на фуражи; Установено е, че бактериите от този вид са безопасни за пилета;

2. По отношение на трихотецетените само два щама от вид *Eubacterium* (BBSH 797 и LS100) са подходящи за влагане във фуражи. Те понижават въздействието на деоксиниваленола при свине и крави, а също понижават и въздействието на Т-2 токсините при бройлери.

3. Видът *Trichosporon mycotoxinivorans* е единственият микроорганизъм, който разгражда охратоксин А и показва добър потенциал за разгражданене на зеараленон и отговаря на всички условия за употреба като фуражна добавка.

4. Един от представителите на зеараленон-биотрансформиращите агенти е *Gliocladium roseum.* Това е гъбичка, която понижава неговото токсичното действие. Други представители със сходно биотрансформиращо действие са *Rhodococcus erythropolis* и *Nocardia globulera*. До този момент няма данни относно практическото приложение на тези видове като фуражни добавки.

Независимо, че има много публикации по отношение биологичната трансформация на микотоксините от микроорганизми, **тяхното приложение за детоксикация на фуражи е ограничено.** Това вероятно се дължи на липсата на

информация относно механизмите на трансформация, а също и степента на токсичност на получените продукти и това, какви ефекти предизвикват при животните.

5. Международният институт за селскостопански изследвания (*IITA*) е пионер в тази техника. Има разработен продукт, наречен *Aflasafe*. *Aflasafe* се оказа успешен и е изпитан на редица култури[34].

6. Други доклади за биологичен контрол са въвеждането на нетоксогенни щамове от *A. flavus и A. parasiticus* в почвата на развиваща се култура, което води до 74,3 до 99,9% намаляване на замърсяването с фъстъци с афлатоксин в САЩ (16) и 68-87% намаляване на замърсяване с афлатоксин в семена от памук[35].

7. *Saccharomyces cerevisiae* намалява концентрацията на AFB1 във фъстъци със 74,4%[36,37]. Съобщава се и за контрол на гъби, произвеждащи FUM от ендофитни бактерии (17). Наскоро се съобщава за трихоспорон гъбички, използвани като дезактиватор на OTA в храни за бройлери (18). Млечнокиселите бактерии като *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus rhamnosus* се предлагат като обещаваща стратегия за биологичен контрол на PAT във водни разтвори (19). Показано е също, че гъбичните щамове на *Trichoderma* контролират патогенните гъбички чрез механизми, като конкуренция за хранителни вещества и пространство, фунгистаза, антибиоза, модификация на ризосфера (тънък слой почва, прилежащ към корените на растенията, попадащ под непосредственото въздействие на корновите разклонения и почвените микроорганизи, с дебелина около 2-5 *mm*), микопаразитизъм, биоторене и стимулиране на механизмите за защита на растенията (20).

Живи микроорганизми се използват като биокатализатори. Касае се за цели клетки, които разграждат микотоксини. За прилагане на метода не се изискват особени капиталовложения.

Това е ефективна стратегия, особено когато за постигане на очаквания резултат е необходимо да се докаже, че токсинът претърпява трансформация чрез поредица от реакции и когато микроорганизмът е идентифициран, характеризиран и определен като безопасен и ефективен като безопасен и се използва в индустриални процеси (21, 22).

В случай на високи нива на замърсяване с микотоксини, е възможно растежът и физиологичните процеси на микроорганизмите да се променят или инхибират, което налага по-продължителната им адаптация, преди да бъде постигнат задоволителен резултат – понижаване на нивата на микотоксините (деконтаминиране).

По-голямата част от изследванията, които описват разграждащата микробна активност, **рядко различават физичната адсорбция и ензимното разграждане**. Това значително усложнява идентифицирането на *DPs* (degradational products – продукти на разграждането) и оценяването на токсичността им. Натрупването на знания в тази област е от съществено значение при оценяване на биотрасформиращите ензими.

---

[34] https://www.omicsonline.org/open-access/an-overview-of-mycotoxin-contamination-of-foods-and-feeds-95992.html#134
[35] https://www.omicsonline.org/open-access/an-overview-of-mycotoxin-contamination-of-foods-and-feeds-95992.html#136
[36] https://www.omicsonline.org/open-access/an-overview-of-mycotoxin-contamination-of-foods-and-feeds-95992.html#137
[37] https://www.omicsonline.org/open-access/an-overview-of-mycotoxin-contamination-of-foods-and-feeds-95992.html#138

Проучванията са показали, че **не всяка реакция води до действителна детоксикация**, **дори е възможно метаболизираният микотоксин да придобие по-силно изразена токсичност** в сравнение с базовия токсин. Такъв е случаят с биотрансформацията на ***ZEN***, извършена *in vivo* от дрожди: те преобразуват ***ZEN*** в ***α-ZEL***, който показва по-силно изразени естрогенни свойства в сравнение със ***ZEN*** (23).

Идентифицирането и характеризирането на разграждащия ензим (***DE*** – *degrading enzyme*) може да бъде предизвикателство и отнема много време, но това е необходима стъпка за разбиране на механизма на действие, оптимизиране на процеса, което служи за база при разработване на методи за детоксикация.

Има и други методи, при които се използват *микроорганизми или ензими*, които са в състояние да метаболизират, унищожават или деактивират токсини, като ги преобразуват в стабилни, по-малко токсични и „безобидни“ съединения (24).

При спазване на изискванията към процеса и резултата от детоксикацията, **методът на ензимна трансформация** се приема за ефективен, гарантира специфичност на процесите и възпроизводимост на резултата, както и хомогенност на характеристиките на получените метаболити. Работата с тях е лесна, особено в сравнение с работата с живи микроорганизми. При работа с ензими няма риск от замърсяване на средата, както и опасения за безопасността за операторите.

Проучване на нови възможности за биологична детоксикация

Скринингът на популации почвени микроорганизми служи за намиране на нови начини за деконтаминиране от микотоксини, което е ефективна, бърза и обещаваща стратегия за откриване на разрушаващи микроби и проучване на механизма им на действие (25, 26, 27). Ефектът от скрининга може да бъде подобрен при съчетаването му с други подходи, като пример за това са съвременни постижения, като **метагеномика**[38] и **функционална метагеномия** (28).

В допълнение, генното инженерство дава възможност за **клониране и експресиране на хетероложни ензими** (29) в бактерии, дрожди, гъбички и растителни клетки, когато се цели получаване на големи количества, по-евтино и не толкова трудоемко производство. Съобщава се, че много ензими премахват или намаляват замърсяването с микотоксин както *in vitro*, така и в реални матрици. Независимо от това приложението им във фуражи е много ограничено поради липсата на информация за потенциалните токсични ефекти на генерираните продукти и влиянието им върху хранителната стойност на фуражите. Тези данни са задължителни, за да бъдат разрешени като възможен биотрансформиращ агент в рамките на Европейския съюз.

Търговски продукти – биотрансформиращи фуражни добавки

Налични са малко търговски биотрансформиращи фуражни добавки: Mycofix®, FUMzyme®, Biomin® BBSH 797 и Biomin® MTV (Biomin Holding GmbH, Getzersdorf,

[38] **Метагеномика** – изучава генетичния материал възстановен директно от проби, взети от околната среда (в по-широк смисъл може да се говори за геномика на околната среда, екогеномика или геномика на общности). Разликата с традиционната микробиология, геномното секвениране и геномиката се състои в това, че те разчитат на **култивирани клонални култури**. Работата в тази област е показала, че огромно множество от микробно разнообразие се изпуска при методите на култивиране: Hugenholz, P; Goebel BM; Pace NR (1 September 1998). "Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity". J. Bacteriol. 180 (18): 4765–74. PMC 107498. PMID 9733676.

Австрия) са някои примери, **но само FUMzyme® използва пречистен ензим**, естераза, за да изпълни разграждане на фумонизин.

Ж. МЕТОДИ ЗА ДЕТОКСИКАЦИЯ ПРИ ХРАНИ

Опитите да бъде постигнат желаният резултат при храни, продължават. Не липсват и резултати.

Наскоро, за обработка на храни, са били приложени нетрадиционни методи и стратегии, като например, **студена плазма** (30, 31, 32) **облъчване със светлина** (33, 34) и **обработване с микровълни** (35). Независимо от това, недостатъчните засега познания за продуктите на разграждане (*DPs*), нежелано намаляване на хранителната стойност, както и органолептични промени, предизвикани от тези обработки, ограничават тяхното прилагане.

Напоследък има все по-голям интерес към употребата на **бактерии, дрожди и гъбички,** които спомагат за намаляване на токсичния ефект на микотоксините. Докато повечето проучвания за детоксикацията на микотоксини от микроорганизми са проведени при лабораторни условия, *има данни за ефективната употреба на F. aurantiacum при детоксикиращия AFB1 от различни хранителни продукти, включително мляко, фъстъци, царевица и червен пипер, без да остават токсични крайни продукти*. Един потенциален недостатък тук е **ярко оранжевият пигмент**, продуциран от микроорганизма, което ограничава употребата му за детоксикацията на храни и при ферментация на фуражи.

3. ДРУГИ ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА ДЕТОКСИКАЦИЯ НА МИКОТОКСИНИ

В научната литература може да бъдат намерени много публикации, които показват ефективност или липса на ефект от прилагане на разнообразни средства за намаляване на концентрациите микотоксини или комбинации от тях в различни матрици. В този раздел са посочени някои от публикациите, които може да послужат за разрешаване на конкретни случаи със замърсяване на суровини или продукти с микотоксини.

Преди да бъдат прилагани тези методи, трябва да се държи сметка за приложимостта им от гледна точка на законодателството, което определя границите в които третиране е допустимо, както и изискванията към крайния резултат.

1. Деоксиниваленол[39]/DON (36) е един от най-често срещаните микотоксини, открити в зърнени култури и продукти от тях.

Понастоящем няма приложим метод за отстраняване на засегнатите зърна. Разработването на биологичен метод за детоксикация става все по-възможно с откриването на микроорганизми, които да трансформират DON в сравнително нетоксичен стереоизомер, 3-epi-DON.

Бактериите, способни да детоксикират DON, са известни, но едва **наскоро е установен ензимът, който е отговорен за това**. В *Devosia mutans 17-2-E-8* (*Devosia sp*.

[39] 17 July 2018 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01573
https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01573/full
The Identification of DepB: An Enzyme Responsible for the Final Detoxification Step in the Deoxynivalenol Epimerization Pathway in Devosia mutans 17-2-E-8

17-2-E-8. Наскоро DepA беше идентифициран като ензим, отговорен за превръщането на *DON* в 3-кето-*DON*, и в този доклад *DepB*, зависима от *NADPH* дехидрогеназа, е идентифициран като втори и последен етап в метаболитния път. *DepB* лесно катализира редукцията на 3-кето-DON до 3-epi-DON. Показано е, че *DepB* е умерено термостабилен, тъй като не е загубил значителна активност след термична обработка при 55°C и е податлив на лиофилизация. *DepB* функционира в диапазон на pH-стойности от 5 до 9 и функционира еднакво добре в множество буфери.

Предстои изучаване на възможностите активността на ензимите Dep да бъде запазена в индустриални условия и да се тества функционалността им, когато са приложени *при смилане на царевица, ферментация на гориво с етанол или директно* ***във фуражи****.*

Изучен е потенциалът на почвената бактерия ***Devosia mutans*** да трансформира *DON* в нетоксична форма, при вземане под внимание на условията на околната среда, включително температура, неутрално pH и при аеробни условия.

Анализът е показал, че *Devosia mutans,* променя DON в две различни форми: 3-keto-DON или epi-3-DON. Изисквала се е проверка, която да дава сигурност, че тези форми са по-слабо токсични от „оригиналния“ микотоксин.

Ензимите, които бактерията е продуцирала са два*:* ***DepA*** **и** ***DepB***. Учените са направили извод, че е възможно да се стигне и до синтезиране на ензимите, без синтезът да е зависим от намножаване на почвената бактерия.

Важно е да е ясно, в каква форма е материалът, който ще бъде обработван с ензимите – **течна или твърда**. Опитът е бил направен при лабораторни условия, но засега действието им в промишлен мащаб.

Интерес представлява да бъде установено, доколко този метод може да се приложи при производство на **царевично нишесте**, **както и на зърнен остатък**, който остава като продукт на производство на етанол – зърното би следвало да се обработи преди процеса на изсушаване за получаване на ***DDGS***. Ако се окаже, че ензимите може да се прилагат още в процеса на ферментация, това е възможно да доведе до добри резултати. Друга възможност е, процесът да се проведе преди изсушаването на страничния продукт *(DDGS)*.

Детоксикираният продукт е бил даден на мишки и е тестван при тъкани от мишки. Предстои да бъде тестван *in vivo* при животни, отглеждани във ферми.

Прилагане на метода преди прибиране на реколтата

В последно време фермерите са силно заинтересовани от **употребата на бактерията преди жътвата**, така че се работи върху потенциалното използване на този етап по веригата. Трябва да се проучат възможностите за третиране на семена или добавяне в почвата, където се отглеждат културите.

2. Има данни, че **филосиликатна глина** – хидратиран натриев, калциев алумосиликат, който се прилага с цел да намали слепването на компонентите при производство на фуражи, **абсорбира Афлатоксин B1** с висок афинитет и капацитет във водни разтвори (включително и мляко), но по отношение на зеараленон (*ZEA*) и охратоксин А (*OTA*) е с ограничена способност за свързване, а при трихотецени като Т-

2 токсин, диацетоксискрипенол и диоксиниваленол е напълно неефективен (*Huwig et al.,* 2001).

3. Дрожди и продукти от клетъчната им стена показват *in vitro* ефект на намаляване на *OTA* (*Molnar et al., 2004; Petteri et al., 2007; Ringot et al., 2007*) и *ZEA* (*Freimund et al., 2003; Yannikouris et al., 2003*), както и *in vivo* при прилагане на **живи дрожди** – *Saccharomyces cerviciae*, намалява нежелания ефект от **афлатоксикоза при птици** (*Santin et al.,* 2003).

4. В опит, проведен с двуседмична експозиция на плъхове, за проучване на ефекта от влагане в замърсен с **охратоксин А** фураж. Животните са били разделени в четири групи – една отрицателна и една положителна контрола; една група, в която животните са били хранени с гранулиран фураж, в който са добавени микронизирани пшенични фибри (**MWF** – micronized wheat fibres) и пшеница с наличие на охратоксин А (естествено контаминирана) и една група, в която към условията на третата група са били добавени и клетъчни стени от дрожди (***YCW*** - *Yeast Cell Walls*). Резултатите от опита показват, че: животните, които са поели охратоксин А са били с по-ниска телесната маса – този ефект не е бил повлиян от прибавянето на **MWF и YCW** (същият ефект е бил наблюдаван при опит на други автори с птици); бъбреци и черен дроб са основни целеви органи на натрупване на охратоксин А: получените данни по отношение на масата на тези органи при животните от контролната група, сравнени с двете експериментални групи, не показва сериозни отклонения. Това до известна степен може да бъде обяснено с факта, че при експозиция на токсина, чернодробната и бъбречната тъкан дори да има тенденция да намалява, компенсирането на масата може да се дължи на дегенеративни процеси, до които токсинът води. При това изследване все пак се наблюдава макар и незначително намаляване на масата на тези органи, което може да бъде обяснено както е посочено по-горе. При птици, понижаването на масата на черния дроб достига до 32,5%.

Изненадващо, комбинацията м/у *MWF* и *YCW* е дала по-нисък протективен ефект, в сравнение с ефекта на прилагане само на *MWF*. Тези резултати са противоположни на резултатите *in vitro*. Показателен резултат за необходимостта, *in vitro* изпитванията да бъдат потвърждавани от *in vivo* опити. Добавянето на MWF води до по-голямо количество екскретирани *OTA* чрез екскрементите на опитните животни. При това има данни, че количеството *OTA* в урината е било по-ниско от очакваното (*Piva and Galvano,* 1999).

Високият афинитет на *OTA* към серумни протеини най-вероятно е причина за хронични ефекти, дори при акутна експозиция.

Опитът дава обнадеждаващи резултати за протективното действие на *MWF* и *YCW*, което според авторите се дължи на намаляване на интестиналната експозиция поради **по-висока екскреция на токсина**. MWF се смята за ефективен антидот за OTA. Възможно е MWF да покаже ефективност и при други токсини: *цитрин, афлатоксин, патулин, зеараленон, микофенолна киселина и други токсични вещества*.

5. Ефект от прилагане на **комбиннации от пробиотици** с микотоксин-разграждащ ензим върху детоксикиращия афлатоксин B1 и зеараленон.[40]

[40] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29877214

Резултатите от изследванията са показали, че степента на разграждане на *AFB1* и *ZEA* е **38,38% и 42,18%** при отделни *Bacillus subtilis* (P <0,05); степента на разграждане на AFB1 и ZEA се увеличава до **45,49% и 44,90% (P <0,05), когато са прилаени три пробиотични вида като *Bacillus subtilis, Lactobacillus casei и Candida utilis*** в съотношение 1: 1: 1, което съответства на прогнозната стойност на модела *RSM*. Експериментите са показали, че степента на разграждане на *AFB1* и *ZEA* е **63.95% и 73.51%** (P <0.05), когато са приложени трите покочени пробиотични микроорганизма, в комбинация с ензими за разграждане на микотоксин, продуцирани от *Aspergillus oryzae* в съотношение 3:2.

Този резултат ясно илюстрира предимствата на комбинации от пробиотици и ензими за разграждане на микотоксин. Методът е обещаващ нов подход за едновременна детоксикация на AFB1 и ZEA.

6. Опитите за биотрансформация на **AFB1** доскоро е са давали добър резултат. Наскоро са намерени няколко бактериални вида, които имат потенциал за детоксикация на *AFB1*. В някои случаи се изпалзват клетъчните стени, в други вътрекретъчни ензими.

Някои от кандидатите, за които вече има събрани данни, макар и не достатъчно изчерпателни, са: *Flavobacterium aurantiacum, Stenotrophomonas maltophylia, Bacillus subtilis, Mycobacterium fluoranthenivorans, Rhodococcus erythropolis, Pleurotus ostreatus.*

7. Има бактерии, плесени, гъбички и растения, които са способни да трансформират *OTA* в *OTα (Galtier and Alvinerie 1976; Wegst and Lingens, 1983; Kiessling et al. 1984; Hwang and Draughon 1994; Skrinjar et al. 1996; Abrunhosa et al., 2002; Pe´teri et al. 2007),* което съединение е по-слабо токсично. При тази трансформация, в резултат се получават ***OTα*** **и фенилаланин** – една от незаменимите аминокиселини.

8. Плесени от род *Aspergillus, Rhysopus* и *Penicillium* са особено активни срещу *OTA* (*Varga et al. 2000; Abrunhosa et al. 2002; Bejaoui et al. 2006*). *Aureobasidium pullulans* се използват за **биоконтрол на вино** чрез предотвратяване на контаминиране на гроздето (De Felice et al. 2008).

9. Растения, като пшеница и царевица (*Ruhland et al.* 1996) или гъбички – *P. ostreatus* (*Engelhardt* 2002) могат да премахнат *OTA*, но при опитите засега не са били установени продуктите на трансформация, което не позволява прилагането на метода в практиката.

10. *Trichosporon mycotoxinivorans* е разработен като търговски продукт за премахване на токсини продуцирани от *OTA* във фуражи (*Molnar et al.* 2004). **Наблюдава се пълна трансформация от *OTA* в *OT* за 2.5 часа.**

11. *Schatzmayr et al.* (2003, 2006) доказват, че прибавянето на дрожди към фуража на пилета води до намаляване на токсичния ефект на *OTA*. Идентифицирани и характеризирани са микроорганизмите, които основно трансформират *OTA* в *OT*, а те са тези, които продуцират **карбокспептидази** /*carboxypeptidases* (EC 3.4.17.1). Произведени са и пречистени ензими, които разцепват *OTA* (*Stander et al. 2000; Abrunhosa et al. 2006*).

12. При **окисление**, *ZEA* може да се трансформира до *zearalanone*; **хидроксилирането** води до производни като *zearalenol*; **метилиране** – до производни като gluco- или sulfo-конюгати и хидролизирани продукти. Тези видове трансформиця

се получават в резултат на действието на бактерии, дрожди, плесени и растения (*El-Sharkawy and Abul-Hajj* 1987a,b 1988).

Трансформирането до ***α- zearalenol*** не се смята за добър вариант, тъй като това съединение има естрогенен ефект, <u>който е по-силен от този на *OTA*</u> (*Fitzpatrick et al.* 1989; *Minervini et al.* 2005).

Duvick and Rood 2000; Karlovsky et al. 2003 са патентовали *Rhodococcus* или *Nocardia* за получаване на трансгенни растения.

Jard et al. (2010), използва ***MCF*-7 клетъчна линия**[41] и твърди, че **сулфонирането** на *ZEA* води до намаляване на естрогенната токсичност. Не е доказано обаче, че сулфонирането води до ефективна детоксикация, тъй като не е изключено при хидролиза в храносмилателния тракт, полученият конюгат да се разпадне, като освободи микотоксина.

Освен дрожди, бактерии и гъбички, **някои растения** също са в състояние да трансформират *ZEA* в *ZEA*-гликозид (*Schneweis et al.* 2002), което обаче води до преобразуване с поява на „маскирани“ микотоксини. Засега тези форми не са били определени, което прави метода неприложим. Опитите да бъдат намерени продуктите на трансформацията продължават. Наблюдавани са и други продукти на разграждане, включително съединения, които са резултат от декарбоксилиране и хидролиза – (*El-Sharkawy and Abul-Hajj* 1988; *Duvick and Rood* 2000; *Kakeya et al.* 2002; *Takahashi-Ando et al.* 2002; Karlovsky et al. 2003; Igawa et al. 2007). Ензимната активност в тези растения е използвана, за да се изолира отговорният **ген**, той да бъде клониран и трансфериран на други видове организми – в случая, дрожди (*Takahashi-Ando et al.* 2005) и растения (*Kakeya et al.* 2002; *Takahashi-Ando et al.* 2002; *Igawa et al.* 2007).

Интересен факт е, че **почвени бактерии** (*Pseudomonas spp.*), след прилагането им върху *ZEA*, са повлияли така, че след това, <u>микотоксинът не е бил намерен в продукта</u> *(El-Deeb 2005),* но отново не са били открити продуктите на трансформация. **Микс от различни почвени видове бактерии** също са показали добри резултати, което е обнадеждаващо за намиране на решение на въпроса със *ZEA*. По-рационален път за подобна трансформация е откриването на ензимите, чрез които тя се реализира.

13. Трихотецени: *Zhou et al. (2008) and He et al.* (*2010*) са авторите, които първи са обобщили известните данни за трансформацията на трхотецени от микроорганизми. В това проучване е направен извод, че 12-13-епокси пръстенът на ***DON* и *T-2*** токсина е този, на който се дължи токсичността им. Отварянето на пръстена води до намаляване на токсичността (*Swanson et al. 1988; Zhou et al. 2008*).

Двата основни метаболита, в които се трансформира DON са **деепоксипроизводни** съединения. Те са по-слабо токсични – проявяват значително намалена **имунотоксичност**.

Eubacterium spp., щам BBSH 797 е разработен в търговски продукт - ***Mycofix plus***[42], който се прилага за детоксикация при замърсяване на фуражи с трихотецени.

Намерен е ензим, наречен ***MDE*** (*mycotoxin-degrading enzyme*), който все още не е идентифициран, но има доказателство, че разгражда *DON* и *ZEA* (*Cheng et al.* 2006).

---

[41] MCF-7 е клетъчна линия, изолирана през 1970 г. от карцином на млечната жлеза.
[42] Продуктът е разработка на *Biomin*.

Binder and Binder 2004; Vo¨lkl et al. 2004; Guan et al. 2009 **са установили, че бактерия, изолирана от черва на риба трансформира 100% от *DON* и *ZEA* за 96 h.**

14. Някои от метаболитите на *T-2* и *TH-2* токсините са деацетилирани и епокси- техни производни, които са с по-слаба токсичност. Намножени бактерии, изолирани от контаминирана почва или вода може да трансформират *T-2* токсина в *T-2* триол, който е **20 пъти по-слабо токсичен** от Т-2 токсина (*Ueno et al.* 1983). Подобна трансформация е била постигната като токсинът е бил подложен на действието на **карбоксилестераза**, **изолирана от черен дроб на плъх**.

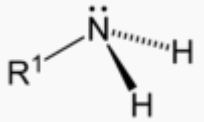
Ензимът е „вграден“ в генома на царевица – получената трансгенна царевица е станала устойчива на фумонизини (*Duvick et al. 2003*).

Други ензими са участва в разграждането на FB1 и са описани някои производни продукти (*Blackwell et al. 1999*). Патент беше изведен през 2003 г. (*Duvick et al. 2003*) за естераза, способна да детоксикира фумонизини.

Някои гъбички/плесени могат да трансформират Т-2 токсина, като при това са наблюдавани две последователни стъпки: първоначално, молекулата на Т-2 токсина се преобразува в НТ-2 чрез деацетилиране и след това се наблюдава трансформация в ***T-2* тетраол**.

15. Често царевицата е контаминирана с **фумонизини.** Затова консумирането на царевица може да причини отравяния, особено когато се ползва като основна храна. Тъй като голяма част от мероприятията за борба със замърсяването се провежда преди прибирането на реколтата, има ограничен брой възможни мерки, които може да се предприемат:

Разположението на аминната група ***FB1*** (първичен амин), както е посочено на фигурата, придава токсични свойства на съединението.

Първичен амин


Деаминиране на този молекула значително намалява неговата токсичност.

Много малко изследвания са направени върху биологичното разграждане на ***FB1***. Основният микроорганизъм, способен да разгради *FB1*, е **черната мая**, *Exophiala spinifera,* с който микроорганизъм опитите продължават.

Преобразуването на микотоксин изглежда **дава надежда като техника** за повишаване на качеството на храни и фуражи. **Проучванията, свързани с биотрансформация**, дават окуражаващи резултати, но са необходими допълнителни проучвания, за да се гарантира безопасността на метода.

17. ИЗВОДИ

Практиката и натрупаните научни данни подсказват редица начини за намаляване на нивата микотоксини по хранителната верига.

Изводи:

1. Липсва универсален метод за намаляване на микотоксини по хранителната верига. Това налага прилагане на повече от един подход, което повишава вероятността от ограничаване на експозицията на хора и животни;

2. Не са намерени специфични антидоти, приложими при експозиция на микотоксини. Прилагат се неспецифични антидоти, като най-подходящ при остро отравяне се оказва активният въглен;

3. По-краткото транспортиране на суровини и продукти намалява риска от намножаване на гъбички, съответно образуване на микотоксини. Съблюдаване на температурен режим и намаляване на риска от овлажняване, дават най-добри резултати за контрол;

4. При съхранение, помещенията да се поддържат сухи, прохладни и проветриви, да са защитени от насекоми и други вредители;

5. Суровини и продукти да се закупуват само от одобрени доставчици или търговци. Когато се касае за отглеждане на животни за собствена консумация (особено когато се добива мляко и то се преработва в млечни продукти), фуражите да са преминали препоръчителния за промишлено отглеждане тестове. Когато се касае за храни от растителен произход, стриктно да се следи за видими прояви на контаминиране с гъбички, засегнатите продукти да се отстраняват и не се допускат за консумация;

6. Засегнатите от гъбички продукти, да бъдат унищожавани, при спазване на изискванията на законодателството по управление на отпадъци;

7. Да се има предвид, че разнообразното хранене намалява до голяма степен, дори е в състояние да премахне риска от експозиция на микотоксини;

8. Мнението на някои специалисти е, че разрешаването на байндери (свързващи агенти) за намаляване на количествата на микотоксини във фуражи, оставя съмнение, че това насърчава доставянето на замърсени с микотоксини продукти. Чрез предприемане на превантивни мерки, в съчетание с прилагане на други страгегии би могло да даде нужните гаринции за безопасност по отношение на микотоксини. Не трябва да се забравя, че валидно доказателство за неналичие на микотоксини може да дадат единствено лабораторни изследвания, проведени в акредитирана за съответния метод и матрица лаборатория;

9. Очакването, че превантивната страгетия на прилагане на бактерии като трансформиращи микотоксини агенти би дала най-добри резултати, не е винаги оправдана: опитите показват, че прилагането ѝ не е достатъчно ефикасно, поради което автори препоръчват прилагана на комбинация с други подходи**;**

10. С натрупване на научни и практически данни, разбирането за това, кое ниво на експозиция на химични замърсители е приемливо, се променя: на тази база, зако-нодателството периодично претърпява промени;

11. Кокто подчертават много от авторите в специализирани издания, свързани с безопасност на храни и фуражи, трябва да бъдат намерени пътища за информиране на хората за опасностите от наличие на замърсители в суровини и продукти, както и прилагането с внимание на начините, чрез които може да се постигне ограничаване на риска от експозиция на микотоксини;

12. Поради разликата в МДН микотоксини при фуражи и храни (по-ниски са допустимите нива при храни), е възможно, при съблюдаване на норми фиксирани в приложимото законодателство, пренасочване на храни за хранене на животни;

13. Натрупване на данни за реална, а не само прогнозна експозиция, както и на епидемиологични данни, може да стане възможно, когато медицински и ветеринарноме-дицински специалисти имат достъп до най-новите постижения за диагностика на микотоксикози, (например, биомаркери). Тази цел може да бъде постигната както посредством специализирани, така и чрез популярни печатни издания.

14. Смята се, че засега не е целесъборазно въвеждане на нулева толерантност към микотоксини, независимо че някои от тях са канцерогени. Подобен подход, дори да бъде въведен, прилаганият при потвърдителен анализ количествен лабораторен метод има ограничени възможност, всяка субстанция има граница на откриване (*limit of detection*). Нулева толерантност е изключително трудно постижима, тъй като микотоксините са продукти на природно затвърден конкурентен механизъм.

18. КАКВО ПРЕДСТОИ

Част от методите и средствата за постигане на безопасност по отношение на микотоксини в храни и фуражи са по-добре проучени и се прилагат в практиката, но съществуват и нови постижения на науката, които все още не се прилагат поради необходимост от прецизиране или по други причини.

Предстои, съвременното разбиране за взаивоотношенията между организмите в екосистемите, което включва и микробиота на човешкия организъм и отношението му към други организми в непосредствената среда на обитание, да бъде доведено до практиката за намаляване до разумен минимум на микотоксините.

В статияга *Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota*) [43], е разгледана тази **изцяло нова гледна точка.** На преден план е изведена **двупосочната връзка между микотоксините** като ксенобиотици **и микробиота на червата при хора и животни**.

В статията е подчертано, че здравословният микробиот на червата е до голяма степен „отговорен“ за цялостното здраве на гостоприемника. Констатациите показват, че чревните **микроорганизми са в състояние да елиминират микотоксини** от гостоприемника по естествен начин, при условие че гостоприемникът е здрав и с балансирана червна микрофлора. Освен това, се доказва влиянието на микотоксините за промени в състава на червната микрофлора, които се оказват видово специфични. **Взаимодействията между червния микробиот и микотоксините имат важна роля и в прогнозата при микотоксикози** (в статията са посочени данни за хепатоцелуларен карцином). Подобни открития стимулират разработването на нови и иновативни стратегии за превенция и терапия при случаи на риск от експозиция на микотоксини, съответно при микотоксикози.

Когато микотоксините се въвеждат в организма чрез храната, те първо влизат във взаимодействие със стомашно-чревния (GI) тракт (*Assunção et al.,* 2016). **GI**

[43] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5834427/ ; doi: 10.3389/fcimb.2018.00060

трактът е мястото, където микробиота на червата пребивава: тя е известна с ролята си в **модулирането на имунната система и храносмилателните процеси**.

Във връзка с прилаганите понастоящем и стратегиите до които науката достига едва сега, предстои много работа. Дори това да отнеме по-продължително време, усилията си заслуават, тъй като срещу това е заложено здравето на хора и животни.

УЧЕНИТЕ НАМИРАТ ЗА НЕОБХОДИМО ПРОВЕЖДАНЕ НА ПРОУЧВАНИЯ В СЛЕДНИТЕ НАПРАВЛЕНИЯ:

- Токсичност – необходимо е провеждане на разширени токсикологични проучвания за някои от микотоксините, за които вече са налични данни, но те не са достатъчни; особено внимание изискват нововъзникващи токсини, като енниатини, бовеверицин, фузарова киселина и монилиформин (необходими са *in vivo* данни за токсичност при хора); не трябва да прекъсва търсенето на нови, неизвестни микотоксини;
- Експозиция – за нуждите на практиката и контрола се прилагат данни, получени чрез изчисляване – прогнозна експозиция. Те все още са далеч от изчерпателни, но постоянно се правят усилия за натрупването им. Към този момент особено важно е натрупването на дадни за експозиция на кърмачета, малки деца и бременни жени, което най-вероятно ще доведе до промени в законодателството – максимално допустимите нива на микотоксини в определени храни;
- Необходимо е провеждане на епидемични проучвания при хора в степен, която да позволява защита на особено чувствителни групи от населението, като кърмачета, малки деца и бременни жени. За тази цел е необходимо разработване на биомаркери за микотоксини, за които такива все още не съществуват;
- Омекотяване на ефектите от експозиция, особено при хора: това е причина все по-често научният интерес се насочва към разработване на превантивни мерки срещу микотоксини или деконтаминиране на храни;
- Все по-актуална е необходимостта от събиране на данни за комбинирана експозиция при хора и при животни. Това се отнася не само за комбинации от микотоксини, но и смеси от микотоксини с други токсични субстанции, на които са изложени хора и животни;
- Маскираните и скрититите форми на микотоксини са в центъра на вниманието на учените. Засега данните за тях са недостатъчни, което определя необходимост от по-интензивни проучвания;
- Аналитични аспекти – методи за откриване на скрити (конюгирани форми) на микотоксини, подобряване на скриринг-методите (намаляване на вероятността от получаване на фалшиви (положителни и отрицателни) резултати;
- По-задълбочено проучване на възможности за предприемане на действия при комбинирано замърсяване на суровини и продукти – в областта на детоксикация и третиране на засегнати хора и животни;
- Разработване на ензимни методи за детоксикация на възможните нива по веригата, включително на полето или при съхранение на суровини и продукти, чието прилагане би било високоефикасно поради специфичността на реакциите;

➢ Прилагане в практиката на методи, които отчитат влиянието върху резорбцията на микотоксини на микробиота на хора и животни;

➢ Промени в **законодателството**, които да отчитат научно и практически доказани нови подходи за намаляване на негативните ефекти на микотоксини при хора и животни;

➢ Популяризиране на практически приложими начини за осигуряване на безопасност по отношение на микотоксини **в домакинствата**.

Във връзка с минимизиране на риска от експозиция на хора на последния етап от хранителната велига – приготвяне на храна и консумация, ***JECFA* съветва хората да прилагат някои неспецифични мерки**:

➢ *Да внимават при консумацията на пълнозърнести храни (особено царевица, сорго, пшеница, ориз), сушени смокини и ядки като фъстъци, шам-фъстък, бадем, орех, кокос, бразилски орехи и лешници, които редовно се замърсяват с афлатоксини за наличие на плесен и изхвърлете тези, които изглеждат плесенясали, обезцветени или стари;*

➢ *Да избягват увреждането на зърната преди и по време на сушене и при съхранение, тъй като повреденото зърно е по-податливо на нахлуване на плесени и следователно замърсяване с микотоксин;*

➢ *Да купуват зърнени култури и ядки възможно най-пресни;*

➢ *Да се уверят, че храните се съхраняват правилно – че няма насекоми, че са сухи и не прекалено топли;*

➢ *Да не съхраняват храни продължително време, преди да ги използват; и*

➢ *Да си осигурят разнообразна диета – това не само помага за намаляване на излагането на микотоксини, но и подобрява храненето.*

Изготвил:
Д-р Марина Загорова
Център за оценка на риска по хранителната верига – МЗХГ

Друга информация в областта на фуражи, може да бъде намерена на интернет страницата на ЦОРХВ: http://corhv.government.bg/?cat=29

Източници: Линковете към цитираните статии са посочени под черта на съответната страница.

Автори:

1. Bennett J.W., Klich M. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 2003;16:497–516. doi: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
2. Sharma R.P. Immunotoxicity of mycotoxins. J. Dairy Sci. 1993;76:892–897. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77415-9.;
3. Zain M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 2011;15:129–144. doi: 10.1016/j.jscs.2010.06.006
4. From: *Handbook of Immunoassay Technologies*, 2018
5. Safety Assessment including Current and Emerging Issues in Toxicologic Pathology Wanda M. Haschek, Kenneth A. Voss, in Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition), 2013 8 Summary/Conclusion

6. Appl Microbiol Biotechnol. 2012 Feb;93(3):931-40. doi: 10.1007/s00253-011-3777-2. Epub 2011 Dec 16. Synthesis and assembly of fungal melanin.

7. *Mycotoxins. Bennett JW, Klich M, Clin Microbiol Rev. 2003 Jul; 16(3):497-516.*

8. Biodegradation of Mycotoxins: Tales from Known and Unexplored Worlds. *Vanhoutte I, Audenaert K, De Gelder L Front Microbiol. 2016; 7():561.*

9. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *Park DL, Lee LS, Price RL, Pohland AE J Assoc Off Anal Chem. 1988 Jul-Aug; 71(4):685-703.*

10. Decomposition and detoxification of aflatoxin B1 by lactic acid. Aiko V, Edamana P, Mehta A J Sci Food Agric. 2016 Apr; 96(6):1959-66.

11. Müller H.M. Entgiftung von Mykotoxinen: II. Chemische Verfahren und Reaktion mit Inhaltsstoffen von Futtermitteln. Übers Tierernährg. 1983;11:47–80.

12. Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. Fouler SG, Trivedi AB, Kitabatake N J AOAC Int. 1994 May-Jun; 77(3):631-7.

13. Maeba H., Takamoto Y., Kamimura M.I., Miura T.O. Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. J. Food Sci. 1988;53:667–668. doi: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb07786.x.

14. Altug T., Youssef A.E., Marth E.H. Degradation of aflatoxin B1 in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. J. Food Prot. 1990;53:581–628.

15. Boudergue C., Burel C., Dragacci S., Favrot M., Fremy J., Massimi C., Prigent P., Debongnie P., Pussemier L., Boudra H., et al. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. EFSA Support. Publ. 2009;6 doi: 10.2903/sp.efsa.2009.EN-22.

16. Dorne JW, Cole RJ (2002) Effect of application of nontoxigenic strain of Aspergillus flavus and A. parasiticus on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. J Stored Prod Res 38: 329-339.

17. Bacon CW, Yates IE, Hinton DM, Meredith F (2001) Biological control of Fusarium moniliforme in maize. Environ Health Perspect 109: 325-332.

18. Hanif NQ, Muhammad G, Muhammad K, Tahira I, Raja GK (2012) Reduction of ochratoxin A in broiler serum and tissues by Trichosporon mycotoxinivorans. Res Vet Sci 93: 795-797.

19. Hatab S, Yue T, Mohamad O (2012) Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria. J Food Sci 77: 238-241.

20. Benítez T, Ana M, Rincon M, Carmen LA, Codon C (2004) Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. Int Microbiol 7: 249-260.

21. Hassan Y.I., Zhou T., Bullerman L.B. Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents. Food Sci. Technol. Int. 2015;22:79–90.

22. Hassan Y.I., Bullerman L.B. Cell-surface binding of deoxynivalenol to Lactobacillus paracasei subsp. tolerans isolated from sourdough starter culture. JMBFS. 2013;2:2323–2325.

23. Metabolism of the Fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. Böswald C, Engelhardt G, Vogel H, Wallnöfer PR Nat Toxins. 1995; 3(3):138-44.

24. Commission Regulation 2015/786/EU Defining Acceptability Criteria for Detoxification Processes Applied to Products Intended for Animal feed as Provided for in Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council. [(accessed on 3 November 2016)]. Available online: http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eur144560.pdf.

25. Biodegradation of Ochratoxin A by Bacterial Strains Isolated from Vineyard Soils. De Bellis P, Tristezza M, Haidukowski M, Fanelli F, Sisto A, Mulè G, Grieco F Toxins (Basel). 2015 Nov 27; 7(12):5079-93.

26. Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. Sato I, Ito M, Ishizaka M, Ikunaga Y, Sato Y, Yoshida S, Koitabashi M, Tsushima S FEMS Microbiol Lett. 2012 Feb; 327(2):110-7.

27. Aerobic De-Epoxydation of Trichothecene Mycotoxins by a Soil Bacterial Consortium Isolated Using In Situ Soil Enrichment. He WJ, Yuan QS, Zhang YB, Guo MW, Gong AD, Zhang JB, Wu AB, Huang T, Qu B, Li HP, Liao YC Toxins (Basel). 2016 Sep 24; 8(10).

28. Ludmila Chistoserdova (2009) Functional Metagenomics: Recent Advances and Future Challenges, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 26:1, 335-352, DOI: 10.5661/bger-26-335; https://doi.org/10.5661/bger-26-335

29. Heterologous expression is the expression of a gene in a host that naturally don't have the gene. This process is facilitated by the use of recombinant DNA technology. Homologous expression refers to over-expression of a gene in an organism where the gene is naturally found.

30. Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. Schlüter O, Ehlbeck J, Hertel C, Habermeyer M, Roth A, Engel KH, Holzhauser T, Knorr D, Eisenbrand G Mol Nutr Food Res. 2013 May; 57(5):920-7.

31. Bong J.P., Kosuke T., Yoshiko S.K., Ik-Hwi K., Mi-Hee L., Dong-Wook H., Kie-Hyung C., Soon O.H., Jong-Chul P. Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. Surf. Coat. Technol. 2007;201:5733–5737.

32. Kriz P., Petr B., Zbynek H., Jaromir K., Pavel O., Petr S., Miroslav D. Influence of plasma treatment in open air on mycotoxin content and grain nutriments. Plasma Med. 2015;5:145–158.

doi: 10.1615/PlasmaMed.2016015752.

33. Herzallah S., Al Shawabkeh K., Al Fataftah A. Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, g-radiation, and microwave heating. J. Appl. Poult. Res.

34. Fanelli F., Geisen R., Schmidt-Heydt M., Logrieco A.F., Mulè G. Light regulation of mycotoxin biosynthesis: New perspectives for food safety. World Mycotoxin J. 2016;9:129–146. doi: 10.3920/WMJ2014.1860

35. Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. Bretz M, Beyer M, Cramer B, Knecht A, Humpf HU J Agric Food Chem. 2006 Aug 23; 54(17):6445-51.

36. 17 July 2018 | The Identification of DepB: An Enzyme Responsible for the Final Detoxification Step in the Deoxynivalenol Epimerization Pathway in Devosia mutans 17-2-E-8

https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01573

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01573/full