



Uniwersytet Kazimierza Wielkiego  
Wydział Nauk Biologicznych  
Katedra Fizjologii i Toksykologii



mgr Robert Kosicki

# **Ocena współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym**

promotor: dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Bydgoszcz 2022 r.



## Podziękowania

Pragnę wyrazić szczerą wdzięczność wszystkim, którzy na różne sposoby wspierali mnie w trakcie przygotowywania pracy. Szczególne podziękowania dla:

Pani dr hab. Magdalenie Twarużek, prof. uczelni, Promotor pracy, za jej wskazówki, stałe wsparcie, cenne sugestie i uwagi, które wpłynęły na ostateczny kształt tej pracy. Dziękuję również za umożliwienie mi uczestniczenia w konferencjach naukowych odbywających się na terenie całej Europy,

Panu Profesorowi dr hab. inż. Janowi Grajewskiemu, kierownikowi Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW, za umożliwienie wykonania badań w Laboratorium Badawczym Mikotoksyn, a także za życzliwość, nieustanne zachęcanie i zaufanie do mnie,

Wszystkim Pracownikom Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW, za stworzenie bardzo przyjaznej i ciepłej atmosfery w pracy,

Moim Rodzicom, za ich bezwarunkową miłość, cierpliwość i zaufanie, że zrealizuję swoje cele,

Annie, mojej Żonie i najlepszej przyjaciółce, za jej miłość, wsparcie, cierpliwość oraz za niekończącą się zachętę. Nie ma wystarczająco dużo słów, aby wyrazić moją najgłębszą wdzięczność za wszystko co zrobiłaś,

Chciałbym również podziękować mojej najwspanialszej córce Marcie, za pokazanie ile energii może być skumulowane w tak małej osobie.



## Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu .....	7
Wykaz skrótów .....	8
Wykaz tabel .....	10
Wykaz rysunków .....	11
Streszczenie .....	12
Abstract .....	14
1.1. Wprowadzenie .....	16
1.2. Regulacje prawne .....	18
1.3. Społeczny i ekonomiczny wpływ mikotoksyn .....	20
1.4. Charakterystyka głównych grup mikotoksyn .....	21
1.4.1. Aflatoksyny .....	21
1.4.2. Trichoteceny .....	22
1.4.3. Zearalenon .....	24
1.4.4. Fumonizyny.....	24
1.4.5. Ochratoksyna A .....	25
1.4.6. Mikotoksyny modyfikowane oraz „nowo” pojawiające się.....	26
1.5. Techniki analityczne .....	28
1.5.1. Ekstrakcja .....	28
1.5.2. Oznaczanie mikotoksyn .....	30
1.6. Strategie wyeliminowania zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w materiałach roślinnych .....	32
2. Cele pracy .....	34
3. Materiały i metody .....	36
3.1. Materiały, odczynniki i substancje wzorcowe .....	36
3.2. Aparatura i wyposażenie .....	38
3.3. Metody .....	39
3.3.1. Metodyka oznaczania aflatoksyn w surowcach i paszach .....	39
3.3.2. Metodyka oznaczania ochratoksyny A w zielonej kawie, surowcach i paszach .....	40
3.3.3. Metodyka oznaczania ochratoksyny A w piwie .....	40
3.3.4. Metodyka oznaczania ochratoksyny A w płynie ustrojowym .....	41
3.3.5. Metodyka oznaczania cytryny w zielonej kawie .....	41
3.3.6. Metodyka oznaczania trichotecen i zearalenonu w zielonej kawie, surowcach i paszach .....	41
3.3.7. Metodyka oznaczania trichotecen i zearalenonu w piwie .....	42

3.3.8. Metodyka oznaczania fumonizyn surowcach i paszach .....	43
3.3.9. Wieloskładnikowa metoda oznaczania mikotoksyn w materiale roślinnym .....	44
4. Wyniki i dyskusja .....	46
4.1 Opracowanie metod badawczych oznaczania mikotoksyn.....	46
4.2. Ocena zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w paszach .....	63
4.2.1. Przeprowadzenie za pomocą opracowanych metod badawczych oceny występowania mikotoksyn w materiale roślinnym i paszach .....	63
4.2.2 Ewaluacja współwystępowania mikotoksyn materiale roślinnym i paszach.....	75
4.2.3. Określenie korelacji między badanymi mikotoksynami w surowcach i paszach.....	77
4.3. Ocena zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w żywności.....	79
4.3.1. Przeprowadzenie za pomocą opracowanych metod badawczych oceny występowania mikotoksyn w piwie i zielonej kawie .....	79
4.3.2. Ewaluacja współwystępowania mikotoksyn i określenie narażenia konsumentów, związanego ze spożywaniem piwa zawierającego mikotoksyny .....	82
4.4. Porównanie występowania i poziomów ochratoksyny A w próbkach surowicy osób dializowanych i zdrowych .....	84
5. Wnioski.....	86
6. Piśmiennictwo .....	88
Prace naukowe wchodzące w skład cyklu.....	110
Oświadczenia współautorów prac naukowych wchodzących w skład cyklu .....	182

## Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu:

- D1. **Kosicki R**, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Anim Feed Sci Technol.* 2016; 215:165-180. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012 (punkcja MEiN = 200; IF = 1,755)  
Udział procentowy: **Kosicki R 60%**, Błajet-Kosicka A 20%, Grajewski J 10%, Twarużek M 10%
- D2. **Kosicki R**, Twarużek M, Dopierała P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). *Toxins (Basel).* 2020; 12(6):423. doi: 10.3390/toxins12060423 (punkcja MEiN = 100; IF = 4,546)  
Udział procentowy: **Kosicki R 50%**, Twarużek M 20%, Dopierała P 10%, Rudzki B 10%, Grajewski J 10%
- D3. **Kosicki R**, Twarużek M, Kannenberg K, Grajewski J. Contamination of Acorns of Pedunculate Oak (*Quercus robur L.*), as Feed Material, by Moulds and Mycotoxins. *Ann Anim Sci.* 2021; 21(3):977-990. doi: 10.2478/aoas-2021-0020 (punkcja MEiN = 100; IF = 2,090)  
Udział procentowy: **Kosicki R 70%**, Twarużek M 10%, Kannenberg K 10%, Grajewski J 10%
- D4. Grajewski J, **Kosicki R**, Twarużek M, Błajet-Kosicka A. Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption. *Toxins (Basel).* 2019; 11(5):254. doi: 10.3390/toxins11050254 (punkcja MEiN = 100; IF = 3,531)  
Udział procentowy: Grajewski J 20%, **Kosicki R 50%**, Twarużek M 10%, Błajet-Kosicka A 20%
- D5. Twarużek M, **Kosicki R**, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Ałtyn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon.* 2020; 188:172-177. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.10.021 (punkcja MEiN = 100; IF = 3,033)  
Udział procentowy: Twarużek M 20%, **Kosicki R 50%**, Kwiatkowska-Giżyńska J 10%, Grajewski J 10%, Ałtyn I 10%
- D6. **Kosicki R**, Buharowska-Donten J, Twarużek M. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. *Toxicon.* 2021; 200:183-188. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.08.002 (punkcja MEiN = 100; IF = 3,033)  
Udział procentowy: **Kosicki R 70%**, Buharowska-Donten J 20%, Twarużek M 10%

Łączny Impact Factor (IF) dla prac naukowych wchodzących w skład cyklu wynosi 17,988. Suma punktów według polskiej oceny czasopism MEiN (z roku opublikowania, dla prac opublikowanych przed rokiem 2019 punkcja zgodna z wykazem czasopism MEiN z 2019 roku) wynosi 700. Łączna liczba cytowań w bazie Scopus (stan na 6.06.2022) wynosi 77.

## Wykaz skrótów

15-Ac-DON	15-acetylo-deoksynivalenol (ang. <i>15- acetyl-deoxynivalenol</i> )
3-Ac-DON	3-acetylo-deoksynivalenol (ang. <i>3- acetyl-deoxynivalenol</i> )
AF	aflatoksyny (ang. <i>aflatoxins</i> )
AFB <sub>1</sub>	aflatoksyna B <sub>1</sub> (ang. <i>aflatoxin B<sub>1</sub></i> )
AFB <sub>2</sub>	aflatoksyna B <sub>2</sub> (ang. <i>aflatoxin B<sub>2</sub></i> )
AFG <sub>1</sub>	aflatoksyna G <sub>1</sub> (ang. <i>aflatoxin G<sub>1</sub></i> )
AFG <sub>2</sub>	aflatoksyna G <sub>2</sub> (ang. <i>aflatoxin G<sub>2</sub></i> )
AFM <sub>1</sub>	aflatoksyna M <sub>1</sub> (ang. <i>aflatoxin M<sub>1</sub></i> )
ASE	przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ang. <i>accelerated solvent extraction</i> )
BEN	bałkańska endemiczna nefropatia (ang. <i>Balkan Endemic Nephropathy</i> )
CEN	Europejski Komitet Normalizacyjny (fr. <i>Comité Européen de Normalisation</i> )
DAS	diacetoksyscirpenol (ang. <i>diacetoxyscirpenol</i> )
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DON	deoksynivalenol (ang. <i>deoxynivalenol</i> )
DON-3-G	deoksynivalenol-3-glukozyd (ang. <i>deoxynivalenol-3-glucoside</i> )
d-SPE	dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>dispersive solid phase extraction</i> )
EDI	szacowane dzienne spożycie (ang. <i>estimated daily intake</i> )
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
ESI	jonizacja przez rozpylenie w polu elektrycznym (ang. <i>electrospray ionization</i> )
FAO	Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FB	fumonizyny (ang. <i>fumonisin</i> )
FB <sub>1</sub>	fumonizyna B <sub>1</sub> (ang. <i>fumonisin B<sub>1</sub></i> )
FB <sub>2</sub>	fumonizyna B <sub>2</sub> (ang. <i>fumonisin B<sub>2</sub></i> )
FB <sub>3</sub>	fumonizyna B <sub>3</sub> (ang. <i>fumonisin B<sub>3</sub></i> )
FHB	fuzarioza kłosów (ang. <i>Fusarium Head Blight</i> )
FLD	detektor fluorescencyjny (ang. <i>fluorescence detector</i> )
FPIA	test immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (ang. <i>fluorescence polarization immunoassay</i> )
GC	chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i> )
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> )



HT-2	toksyna HT-2 (ang. <i>HT-2 toxin</i> )
IAC	kolumnienka powinowactwa immunologicznego (ang. <i>immunoaffinity column</i> )
LC	chromatografia cieczowa (ang. <i>liquid chromatography</i> )
LFD	immuno chromatograficzny test paskowy (ang. <i>lateral flow test</i> )
LLE	ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. <i>liquid-liquid extraction</i> )
LOD	granica wykrywalności (ang. <i>limit of detection</i> )
LOQ	granica oznaczalności (ang. <i>limit of quantification</i> )
MAE	ekstrakcja wspomagana mikrofalami (ang. <i>microwave assisted extraction</i> )
MAS	monoacetoksycirpenol (ang. <i>monoacetoxyscirpenol</i> )
MIP	polimery z nadrukiem cząsteczkowym (ang. <i>molecularly imprinted polymers</i> )
MRM	tryb obserwowania wielu reakcji fragmentacji (ang. <i>multiple reaction monitoring</i> )
MS/MS	tandemowa spektrometria mas (ang. <i>tandem mass spectrometry</i> )
NDP	najwyższy dopuszczalny poziom (ang. <i>maximum level</i> )
NIW	niwalenol (ang. <i>nivalenol</i> )
OTA	ochratoksyna A (ang. <i>ochratoxin A</i> )
PBS	stabilizowana buforem fosforanowym sól fizjologiczna (ang. <i>phosphate-buffered saline</i> )
QuEChERS	szybka, prosta, tania, efektywna, elastyczna, bezpieczna metoda przygotowania próbki (ang. <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i> )
RASFF	System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach (ang. <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> )
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i> )
SFE	ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (ang. <i>supercritical fluid extraction</i> )
sMRM	tryb zaplanowanego obserwowania wielu reakcji fragmentacji (ang. <i>scheduled multiple reaction monitoring</i> )
SPE	ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid phase extraction</i> )
T-2	toksyna T-2 (ang. <i>T-2 toxin</i> )
TDI	tolerowane dzienne spożycie (ang. <i>tolerable daily intake</i> )
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i> )
TWI	tolerowane tygodniowe spożycie (ang. <i>tolerable weekly intake</i> )
UE	Unia Europejska (ang. <i>European Union</i> )
ZEN	zearalenon (ang. <i>zearalenone</i> )
$\alpha$ -ZAL	$\alpha$ -zearalanol (ang. <i><math>\alpha</math>-zearalanol</i> )
$\alpha$ -ZOL	$\alpha$ -zearalenol (ang. <i><math>\alpha</math>-zearalenol</i> )

## Wykaz tabel

Tabela 1. Najwyższe dopuszczalne poziomy mikotoksyn w surowcach i produktach pochodzenia zbożowego przeznaczonych dla ludzi .....	18
Tabela 2. Dopuszczalne oraz zalecane poziomy mikotoksyn w materiałach paszowych i paszach ..	19
Tabela 3. Parametry detekcji trichotecen i zearalenonu w tandemowym spektrometrze mas .....	41
Tabela 4. Parametry detekcji fumonizyn w tandemowym spektrometrze mas .....	43
Tabela 5. Parametry pracy układu MS/MS dla analitów w metodzie wieloskładnikowej .....	44
Tabela 6. Parametry walidacyjne metodyki oznaczania aflatoksyn w surowcach i produktach roślinnych .....	45
Tabela 7. Parametry walidacyjne procedury oznaczania ochratoksyny A w surowcach roślinnych i produktach .....	47
Tabela 8. Parametry walidacyjne metody oznaczania ochratoksyny A w piwie .....	48
Tabela 9. Parametry walidacyjne procedury oznaczania ochratoksyny A w surowicy .....	49
Tabela 10. Parametry walidacyjne metody oznaczania cytryniny w zielonej kawie .....	50
Tabela 11. Parametry walidacyjne metodyki oznaczania fumonizyn w kukurydzy i paszach .....	52
Tabela 12. Parametry walidacyjne metodyki oznaczania trichotecen i zearalenonu w surowcach i paszach .....	54
Tabela 13. Parametry walidacyjne procedury oznaczania trichotecen i zearalenonu w piwie .....	56
Tabela 14. Parametry walidacyjne procedury oznaczania mikotoksyn w surowcach roślinnych (żółędzie) .....	59

## Wykaz rysunków

Rysunek 1. Wzory strukturalne aflatoksyn .....	20
Rysunek 2. Wzór strukturalny trichotecen grupy B .....	22
Rysunek 3. Wzór strukturalny trichotecen grupy A .....	22
Rysunek 4. Wzór strukturalny zearalenonu .....	23
Rysunek 5. Wzory strukturalne $\alpha$ -zearalenolu ( $\alpha$ -ZOL) oraz $\alpha$ -zearalanolu ( $\alpha$ -ZAL) .....	23
Rysunek 6. Wzór strukturalny fumonizyn .....	24
Rysunek 7. Wzór strukturalny ochratoksyny A .....	24
Rysunek 8. Wzór strukturalny deoksyniwalenolu-3-glukozydu .....	25
Rysunek 9. Wzór strukturalny deepoksy-deoksyniwalenolu .....	26
Rysunek 10. Chromatogram mieszaniny wzorców aflatoksyn: AFG <sub>2</sub> (0,5 ng/ml), AFG <sub>1</sub> (2 ng/ml), AFB <sub>2</sub> (0,5 ng/ml) i AFB <sub>1</sub> (2 ng/ml) .....	46
Rysunek 11. Chromatogramy ochratoksyny A: czarny - substancja wzorcowa (15 ng/ml); czerwony – próbka zielonej kawy (7,5 ng/g); zielony – próbka zielonej kawy bez OTA .....	47
Rysunek 12. Chromatogram wykonany metodą HPLC-FLD próbki surowicy zawierającej ochratoksynę A w stężeniu 2,3 ng/ml .....	49
Rysunek 13. Chromatogramy cytryniny: czarny - substancja wzorcowa (25 ng/ml); zielony – próbka zielonej kawy wolna od cytryniny .....	51
Rysunek 14. Chromatogram mieszaniny wzorców fumonizyn: FB <sub>1</sub> (500 ng/ml), FB <sub>2</sub> (502 ng/ml), FB <sub>3</sub> (251 ng/ml) .....	52
Rysunek 15. Chromatogram mieszaniny wzorców trichotecen i zearalenonu: NIW (250 ng/ml), DON (502 ng/ml), 3-Ac-DON (125 ng/ml), MAS (125 ng/ml), DAS (127 ng/ml), HT-2 (251 ng/ml), T-2 (251 ng/ml), ZEN (125 ng/ml) .....	54
Rysunek 16. Chromatogramy mieszaniny wzorców miko toksyn oznaczanych metodą wieloskładnikową (chromatogram A – anality oznaczane w trybie jonizacji ujemnej, chromatogram B – anality oznaczane w trybie jonizacji dodatniej) .....	60

## Streszczenie

Mikotoksyny stanowią liczną grupę związków o zróżnicowanej budowie chemicznej produkowanych przez grzyby pleśniowe. Występują one głównie w produktach roślinnych (zboża, przyprawy, kawa), ale mogą być także obecne w produktach pochodzenia zwierzęcego (mięso, mleko, sery) oraz materiałach budowlanych. W celu zapewnienia ochrony zdrowia ludzi i zwierząt przed najczęściej występującymi mikotoksynami Unia Europejska (UE) wprowadziła regulacje prawne dotyczące ich obecności w żywności i paszach. Pomimo kilkudziesięciu lat badań nad wtórnymi metabolitami pleśni skażenie nimi żywności i pasz ciągle pozostaje globalnym problemem. Według raportów Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa szacuje się, że mikotoksyny występują każdego roku w około 25% światowych upraw i powodują ogromne straty w rolnictwie oraz przemyśle spożywczym i paszowym. Skutki ekonomiczne są odczuwalne w łańcuchu produkcji rolnej, obejmującym producentów roślin i zwierząt, przemysł zbożowy oraz konsumentów. Doniesienia o niedostatecznym poziomie bezpieczeństwa w odniesieniu do produktów spożywczych i pasz są od wielu lat ciągle aktualne. Dlatego podjęta tematyka badawcza oceny poziomów skażenia metabolitami i relacji między nimi służy zagwarantowaniu bezpiecznych i zdrowych produktów spożywczych i paszowych. Surowce i produkty są najczęściej skażone kilkoma mikotoksynami, a ocena występowania wielu analitów (współwystępowanie) w badanym materiale stanowi obecnie duże wyzwanie dla naukowców na całym świecie, ze względu na często większą toksyczność w porównaniu z pojedynczymi związkami.

Opracowane w trakcie przygotowywania pracy procedury badawcze, oparte o techniki chromatograficzne z detekcją fluorescencyjną i spektrometrii mas, spełniają kryteria skuteczności metod analitycznych ustanowione przez UE. Badania wykazały że surowce roślinne jak i pasze są w znacznym stopniu zanieczyszczone mikotoksynami, aczkolwiek udział próbek z przekroczonymi wartościami maksymalnych poziomów, wyznaczonymi przez UE, jest względnie niski. Najczęściej występującymi mikotoksynami były deoksynivalenol (DON) i zearalenon (ZEN) – obecne w ponad 95% próbek, a najbardziej zanieczyszczonymi matrycami były kukurydza i mieszanki paszowe. Wykonanie ponad 8000 oznaczeń w próbkach surowców roślinnych i pasz wykazało powszechne współwystępowanie mikotoksyn – ponad 95% próbek zawierało co najmniej 2 anality, a w 75% wykryto 5 toksyn. Potwierdzono statystycznie istotne korelacje między stężeniami mikotoksyn dla DON i ZEN oraz dla toksyn T-2 i HT-2. Ponadto korelacje o słabej mocy stwierdzono dla mikotoksyn produkowanych przez różne gatunki pleśni (ochratoksyna A (OTA) i DON oraz OTA i ZEN). Badania żółędzi wykazały wysokie stężenia kwasu mikofenolowego (14,6 mg/kg), a także patuliny (50 µg/kg). Szczególne obawy o bezpieczeństwo tego materiału może budzić jego zanieczyszczenie patuliną, która w żywności i paszach podlega ścisłemu monitorowaniu ze względu na jej toksyczne właściwości.

Spośród mikotoksyn oznaczanych w próbkach piwa najczęściej wykrywanymi były OTA, DON oraz toksyna HT-2. Przeprowadzona ocena narażenia konsumentów wykazała, że codzienne spożycie OTA wraz z piwem wynosi od 0,8% do 7,5% tolerowanego codziennego spożycia (TDI). W przypadku DON obliczone narażenie w zależności od scenariusza wahało się od 4,1% do 21% TDI, natomiast dla toksyny HT-2 od 5% do 9,7% TDI. Wyniki badań sugerują, że piwo ze względu na dużą zawartość wody, niewielki udział ekstraktu słodowego oraz relatywnie niską zawartość mikotoksyn nie jest głównym źródłem pobrania mikotoksyn przez człowieka. Stwierdzono występowanie wyższych poziomów mikotoksyn w piwach rzemieślniczych, co sugeruje że powinny one być częściej badane, aby chronić zdrowie „pasjonatów piwa”. Badania zielonej kawy i suplementów diety zawierających jej ekstrakt wykazały częste zanieczyszczenie próbek OTA oraz pleśniami ją wytwarzającymi, nie stwierdzono natomiast obecności cytryniny. OTA występowała w wyższych stężeniach w produktach przetworzonych w porównaniu z surowymi ziarnami kawy, co sugeruje, że zanieczyszczenie mogło wystąpić podczas procesu produkcyjnego. Wyniki badań uzasadniają wdrożenie odpowiednich środków kontroli mikologicznej, zwłaszcza w odniesieniu do produkcji suplementów diety, w których najwyższe stężenie OTA wynosiło 31,4 µg/kg (wartość ponad 6-krotnie wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom dla kawy), a które są powszechnie uważane za zdrowe i bezpieczne. W badaniach ludzkich próbek biologicznych (surowica) nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniach OTA u osób zdrowych i poddawanych dializie, a także przy porównaniu wyników grupy kontrolnej i poszczególnych grup wiekowych. Średnie poziomy OTA u dializowanych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek oraz zdrowych ochotników były porównywalne z obserwowanymi w innych krajach europejskich (za wyjątkiem krajów bałkańskich, gdzie występuje bałkańska endemiczna nefropatia).

## Abstract

Mycotoxins, produced by moulds, are a large group of compounds with diversified chemical structure. They are mainly found in plant products (cereals, spices, coffee), but can also be present in animal products (meat, milk, cheese) and building materials. To protect human and animal health from the most common mycotoxins, the European Union (EU) has issued regulations on their presence in food and feed. Despite decades of research on the secondary metabolites of moulds, they contaminate food and feed, which remains a global problem. According to reports by the Food and Agriculture Organisation of the United Nations, mycotoxins are estimated to be present in around 25% of the world's crops each year, causing huge losses in agriculture and the food and feed industries. The economic impact is felt throughout the agricultural production chain, including plant and livestock producers, the grain industry and consumers. Reports of inadequate safety of food products and fodder have been recurring for many years. Therefore, the research topic undertaken to assess levels of metabolite contamination and the relationship between them serves to ensure safe and healthy food and fodder products. Raw materials and products are usually contaminated with multiple mycotoxins and assessing the occurrence (co-occurrence) of multiple analytes in the material under study is currently a major challenge for scientists worldwide due to the higher toxicity compared to single compounds.

During the work on PhD thesis, analytical procedures were developed using chromatographic techniques with fluorescence and mass spectrometry detection. These procedures meet the performance criteria for analytical methods set by the EU. The study has shown that both plant raw materials and animal feed are significantly contaminated with mycotoxins, although the proportion of samples with exceeded EU maximum levels is relatively low. The most prevalent mycotoxins were deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN), which were present in more than 95% of the samples, and the most contaminated matrices were maize and compound feed. The performance of more than 8,000 determinations in samples of plant raw materials and feeds showed the widespread co-occurrence of mycotoxins, with more than 95% of samples containing at least 2 analytes, and 5 toxins were detected in 75% samples. Statistically significant correlations between mycotoxin concentrations for DON and ZEN and for T-2 and HT-2 toxins were confirmed. In addition, weak correlations were found for mycotoxins produced by different mould species (ochratoxin A (OTA) and DON as well as OTA and ZEN). The analyzes of acorns revealed high concentrations of mycophenolic acid (14.6 mg/kg) as well as patulin (50 µg/kg). Of particular concern for the safety of acorns may be their contamination with patulin, which is closely monitored because of its toxic properties. Of the mycotoxins determined in beer samples, OTA, DON and HT-2 toxin were the most frequently detected. The consumer exposure assessment carried out showed that the daily intake of OTA with

beer ranges from 0.8% to 7.5% of the tolerable daily intake (TDI). For DON, the calculated exposure ranged from 4.1% to 21% TDI depending on the scenario, while for the HT-2 toxin, from 5% to 9.7% TDI. The results suggest that beer, due to its high water content, low proportion of malt extract and relatively low mycotoxin content, is not a major source of mycotoxin intake for humans. Higher levels of mycotoxins were found in craft beers, suggesting that these should be tested more frequently to protect the health of 'beer lovers'. Analyzes of green coffee and dietary supplements containing its extract found frequent contamination of samples with OTA and the moulds that produce it, but no citrinin. OTA concentrations were higher in processed products than in raw coffee beans, suggesting that contamination may have occurred during the production process. The results of the study justify the implementation of appropriate mycological control measures, especially for the production of food supplements, in which the highest concentration of OTA was 31.4 µg/kg (a value more than 6 times higher than the maximum level for coffee), and which are generally considered healthy and safe. Studies on human biological samples (serum) showed no statistically significant differences in OTA concentrations in healthy individuals and dialysis patients, even when comparing the results of the control group and the different age groups. The average OTA concentrations in patients with chronic renal failure and healthy volunteers were comparable to those observed in other European countries (with the exception of Balkan countries where endemic Balkan nephropathy occurs).

## 1.1. Wprowadzenie

Mikotoksyny to grupa kilkuset małowcząsteczkowych, zróżnicowanych chemicznie związków wytwarzanych przez grzyby pleśniowe. Zaklasyfikowanie związku jako mikotoksyny wynika wyłącznie z faktu, że jest on wtórnym metabolitem grzyba pleśniowego i wykazuje działanie toksyczne dla ludzi, zwierząt lub roślin, ponadto może wykazywać także inne właściwości, np. antybiotyczne – wykorzystywane w farmaceutyce (Bennett i Klich, 2003). Występowanie mikotoksyn nie ogranicza się jedynie do produktów rolnych, ponieważ pleśnie mogą bytować na prawie każdym wystarczająco wilgotnym materiale organicznym. W rezultacie wzrost grzybów pleśniowych np. na zawilgoconych materiałach budowlanych może powodować wytwarzanie mikotoksyn podobnych do tych występujących w żywności i paszach, takich jak sterygmatocystyna czy toksyny *Alternaria spp.* (Bloom i in., 2009; Ren i in., 1998). Należy pamiętać jednak, że nie zawsze pojawienie się grzybów pleśniowych wiąże się z wytwarzaniem przez nie mikotoksyn. Przyczyny wytwarzania mikotoksyn są ciągle przedmiotem badań naukowych. Sugerowany jest ich udział w interakcjach między mikroorganizmami (Venkatesh i Keller, 2019). Natomiast biosynteza tych substancji została dokładnie zbadana i zidentyfikowano typowe szlaki metaboliczne. Szlaki te prowadzą do powstawania licznych wtórnych metabolitów, w tym mikotoksyn (González-López i in., 2021; Kolawole i in., 2021; Sweeney i Dobson, 1999). Niekiedy biosynteza mikotoksyn jest przykładem przewagi ewolucyjnej. Przykładowo deoksyniwalenol (DON) jest kluczowym elementem patogeniczności, pozwalającym grzybom osłabiać roślinę i wywoływać m.in. fuzariozę kłosów (FHB) w pszenicy (Walter i in., 2010).

Różnorodne działanie toksyczne poszczególnych mikotoksyn związane jest z ich budową chemiczną. Aflatoksyna B<sub>1</sub> wykazuje działanie rakotwórcze dla ludzi (grupa 1 według klasyfikacji Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem) i hepatotoksyczne (Marchese i in., 2018). Działanie zearalenonu (ZEN) i jego metabolitów u ludzi i zwierząt nie jest ukierunkowane na konkretny narząd, a ogólnoustrojowe, ponieważ substancje te zakłócają gospodarkę hormonalną (Metzler i in., 2010). Trichoteceny (m.in. DON i toksyny T-2 i HT-2) zaburzają syntezę białek i w konsekwencji powodują liczne negatywne efekty od wymiotów (DON nazywany jest womitoksyną) do dysfunkcji układu odpornościowego. Fumonizyny wykazują zróżnicowane działanie rakotwórcze i patogeniczne w zależności od gatunku zwierzęcia (Wangia-Dixon i Nishimwe, 2021). Zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt powodowane przez wtórne metabolity pleśni należy oceniać w oparciu o ich występowanie w żywności i paszy, sposób ich działania, a także szlaki metaboliczne detoksykacji w obrębie danego gatunku.

Zatrucia mikotoksynami znane były w Europie od wieków i pojawiały się w nieregularnych odstępach czasu. Historycznie najistotniejsze epidemie były związane m.in. z buławinką czerwoną (*Claviceps purpurea*) – grzybem powodującym ergotyzm (zwany także ogniem świętego Antoniego)



(Lee, 2009). Zboża zaatakowane przez sporysz *C. purpurea* zawierają toksyczne alkaloidy, m.in. ergotaminę, ergometrynę, ergozynę. W przeszłości opisano również inne poważne ogniska mikotoksykoz, włączając „chorobę beri-beri” w Azji na początku XX wieku, spowodowaną spożyciem ryżu zarażonego grzybem *Penicillium citreonigrum* (da Rocha i in., 2015) oraz „toksyzną aleukią pokarmową” obserwowaną w latach czterdziestych XX wieku na terenie obecnej Rosji, wywołaną przez toksyny *Fusarium* w zbożach, które ze względu na wojnę były pozostawione na polu przez zimę (Mostrom i Raisbeck, 2007).

W 1960 r. ponad 100 000 indyków padło w Wielkiej Brytanii po podaniu mączki z orzeszków ziemnych zanieczyszczonej aflatoksyną (Blount, 1961). To zdarzenie było początkiem świadomości istnienia mikotoksyn na skalę światową i zostało nazwane chorobą „X” indyków. Naukowcy szybko ustalili, że odpowiedzialne za падanie indyków były aflatoksyny B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub> (Wannop, 1963). Początkowo badania koncentrowały się na obecności aflatoksyn w orzeszkach ziemnych, będących składnikiem paszy dla zwierząt (Blount, 1961), podczas gdy obecnie prowadzi się prace nad globalnym zasięgiem wpływu tych substancji (Andrade i Caldas, 2015; Martinez-Miranda i in., 2018; Shephard, 2008; Twarużek i in., 2013). Odkrycie to zapoczątkowało opracowanie wielu metod analitycznych, w tym opartych na chromatografii, służących oznaczaniu aflatoksyn oraz innych wtórnych metabolitów pleśni (Pickova i in., 2021). Jeszcze dzisiaj, kilkadziesiąt lat po wybuchu epidemii choroby „X” indyków, diagnozowane są mikotoksykozy, takie jak aflatoksykoza w regionach afrykańskich (Shephard, 2008) lub choroba beri-beri w Brazylii (Lima i in., 2010). Postęp w dziedzinie technik instrumentalnych oraz analitycznych (np. połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas) pozwolił na uzyskanie w krótkim czasie informacji o występowaniu wielu mikotoksyn w jednej próbce, co ma olbrzymie znaczenie dla naukowców i instytucji oceniających ryzyko związane z wtórnymi metabolitami pleśni.

Rozwój grzybów wytwarzających mikotoksyny na produktach spożywczych w gospodarstwie domowym jest dość powszechnym zjawiskiem. Objawy infekcji obserwowane są w pierwszej kolejności na świeżych owocach (np. truskawki, maliny, jabłka), warzywach, a także pieczywie czy przetworach (np. dżem). Gdy produkty są w widoczny sposób zepsute, klasyfikowane są jako niezdatne do spożycia. Dlatego też są one uważane za zagrożenie zdrowia publicznego i powinny być odpowiednio usuwane. Z drugiej strony wiele grzybów pleśniowych jest używanych do peklowania żywności, takiej jak ser, kiełbasa lub inne wyroby mięsne. W Europie stosuje się przede wszystkim grzyby *Penicillium*, a kilka z nich wykazało zdolność do wytwarzania mikotoksyn (ochratoksyny A i cytryniny) w zależności od warunków wzrostu. Inne pleśnie okazały się również cytotoksyczne w testach komórkowych. Dlatego potencjał toksynotwórczy pleśni używanych w produkcji żywności powinien być zbadany przed ich selekcją do procesów przetwórczych (Copetti, 2019).

## 1.2. Regulacje prawne

Początki prac zmierzających do ustalenia limitów zawartości mikotoksyn w surowcach i żywności miały miejsce pod koniec lat 60 ubiegłego wieku i były związane z odkryciem aflatoksyn (Anukul i in., 2013). Do 2003 r. blisko 100 krajów wdrożyło przepisy dotyczące maksymalnych dozwolonych poziomów mikotoksyn w surowcach i produktach, co obejmuje około 85% światowej populacji (van Egmond i Jonker, 2004). W celu zapewnienia ochrony zdrowia ludzi i zwierząt przed najczęściej występującymi w surowcach i produktach mikotoksynami Komisja Europejska wprowadziła liczne regulacje prawne dotyczące ich obecności w żywności:

- DON (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1126/2007),
- T-2 i HT-2 (Zalecenie Komisji nr 2013/165/UE),
- ZEN (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1126/2007),
- FB (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1126/2007),
- OTA (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 105/2010; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 594/2012; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 2015/1137),
- AF (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 165/2010; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1058/2012),

oraz w paszach:

- DON (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE, Zalecenie Komisji nr 2016/1319),
- T-2 i HT-2 (Zalecenie Komisji nr 2013/165/UE, Zalecenie Komisji nr 2013/637/UE),
- ZEN (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE, Zalecenie Komisji nr 2016/1319),
- FB (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE, Zalecenie Komisji nr 2016/1319),
- OTA (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE, Zalecenie Komisji nr 2016/1319),
- AFB<sub>1</sub> (Dyrektywa nr 2002/32/WE).

W Tabeli 1 przedstawiono najwyższe dopuszczalne w Unii Europejskiej poziomy (NDP) mikotoksyn w surowcach i produktach pochodzenia zbożowego przeznaczonych dla ludzi, natomiast w Tabeli 2 zestawiono dane dotyczące materiałów i mieszanek paszowych. Najwyższe dopuszczalne poziomy w paszach określono dla aflatoksyny B<sub>1</sub>, dla pozostałych mikotoksyn Unia Europejska wydała jedynie zalecenia.

Tabela 1. Najwyższe dopuszczalne poziomy mikotoksyn w surowcach i produktach pochodzenia zbożowego przeznaczonych dla ludzi

Mikotoksyny	Środki spożywcze	Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)	
DON	Nieprzetworzone zboża inne niż pszenica durum, owies i kukurydza	1250	
	Pszenica durum i owies, nieprzetworzone	1750	
	Nieprzetworzona kukurydza	1750	
	Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby oraz zarodki jako produkt końcowy wprowadzany na rynek do bezpośredniego spożycia	750	
	Makaron (suchy)	750	
	Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i płatki śniadaniowe	500	
	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200	
T-2 i HT-2 (suma) <sup>a</sup>	Nieprzetworzony jęczmień (w tym jęczmień browarny) i kukurydza	200	
	Nieprzetworzony owies (z łuską nasioną)	1000	
	Nieprzetworzone pszenica, żyto i pozostałe zboża	100	
	Owies do bezpośredniego spożycia przez ludzi	200	
	Kukurydza do bezpośredniego spożycia przez ludzi	100	
	Pozostałe zboża do bezpośredniego spożycia przez ludzi	50	
	Otręby i płatki owsiane	200	
	Otręby zbożowe z wyjątkiem otrębów owsianych, produkty z mielonego owsa inne niż otręby i płatki owsiane, a także produkty z mielonej kukurydzy	100	
	Pozostałe produkty z mielonego ziarna zbożowego	50	
	Śniadaniowe przetwory zbożowe, w tym formowane płatki zbożowe	75	
	Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciastka, herbatniki, przekąski zbożowe, makaron	25	
	Żywność na bazie zbóż przeznaczona dla niemowląt i małych dzieci	15	
	ZEN	Nieprzetworzone zboża inne niż kukurydza	100
		Nieprzetworzona kukurydza	350
Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby oraz zarodki jako produkt końcowy wprowadzany na rynek do bezpośredniego spożycia		75	
Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i płatki śniadaniowe		50	
Kukurydza przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, Przekąski kukurydziane i płatki śniadaniowe na bazie kukurydzy		100	
Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci		20	
Przetworzona żywność na bazie kukurydzy dla niemowląt i małych dzieci		20	
FB <sub>1</sub> i FB <sub>2</sub> (suma)	Nieprzetworzona kukurydza	4000	
	Kukurydza oraz żywność na bazie kukurydzy przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi	1000	
	Płatki śniadaniowe na bazie kukurydzy i przekąski kukurydziane	800	
	Przetworzona żywność na bazie kukurydzy oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200	
OTA	Nieprzetworzone zboża	5,0	
	Wszystkie produkty pochodzące z nieprzetworzonych zbóż	3,0	
	Palone ziarna kawy i mielona kawa palona	5,0	
	Kawa rozpuszczalna	10,0	
	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	0,50	
AFB <sub>1</sub> /AF	Wszystkie zboża i wszystkie produkty otrzymywane ze zbóż, w tym przetworzone produkty zbożowe, z wyjątkiem kukurydzy	2,0/4,0	
	Kukurydza, która ma być sortowana lub poddana innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyta jako składnik w środkach spożywczych	5,0/10,0	
	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	0,1/-	

<sup>a</sup> poziomy wskaźnikowe dla sumy T-2 i HT-2 (µg/kg)

Tabela 2. Dopuszczalne oraz zalecane poziomy mikotoksyn w materiałach paszowych i paszach

Mikotoksyna	Produkty do żywienia zwierząt	Zawartość $\mu\text{g}/\text{kg}^a$
DON	Zboża i produkty zbożowe z wyjątkiem produktów ubocznych kukurydzy	8000
	Produkty uboczne kukurydzy	1200
	Mieszanki paszowe	5000
	Mieszanek paszowych dla świń	900
	Mieszanek paszowych dla cieląt (< 4 miesięcy), jagniąt, kozłąt i psów	2000
T-2 i HT-2 (suma) <sup>b</sup>	Produkty z mielonego owsa (łuski nasion)	2000
	Pozostałe produkty zbożowe	500
	Mieszanki paszowe z wyjątkiem karmy dla kotów	250
	Mieszanki paszowe dla kotów	50
ZEN	Zboża i produkty zbożowe(**) z wyjątkiem produktów ubocznych kukurydzy	2000
	Produkty uboczne kukurydzy	3000
	Mieszanki paszowe dla prosiąt, loszek (młodych macior), szczeniąt, kociąt, psów i kotów przeznaczonych do reprodukcji	100
	Mieszanki paszowe dla dorosłych psów i kotów innych niż przeznaczone do reprodukcji	200
	Mieszanki paszowe dla macior i tuczników	250
FB <sub>1</sub> i FB <sub>2</sub> (suma)	Mieszanki paszowe dla cieląt, bydła mlecznego, owiec (w tym jagniąt) i kóz (w tym kozłąt)	500
	Kukurydza i produkty na bazie kukurydzy	60000
	Mieszanki paszowe dla świń, koni ( <i>Equidae</i> ), królików i zwierząt domowych	5000
	Mieszanki paszowe dla ryb	10000
	Mieszanki paszowe dla drobiu, cieląt (< 4 miesięcy), jagniąt i kozłąt	20000
OTA	Mieszanki paszowe dla dorosłych przeżuwaczy (> 4 miesięcy) i norek	50000
	Zboża i produkty zbożowe	250
	Mieszanki paszowe dla świń	50
	Mieszanki paszowe dla drobiu	100
AFB <sub>1</sub> <sup>c</sup>	Mieszanki paszowe dla kotów i psów	10
	Materiały paszowe	50
	Mieszanki paszowe pełnoporcjowe dla bydła, owiec i kóz	50
	Mieszanki paszowe pełnoporcjowe dla bydła mlecznego	5
	Mieszanki paszowe pełnoporcjowe dla cieląt i jagniąt	10
	Mieszanki paszowe pełnoporcjowe dla świń i drobiu (z wyjątkiem zwierząt młodych)	20
	Inne mieszanki paszowe pełnoporcjowe	10
	Mieszanki paszowe uzupełniające dla bydła, owiec i kóz (z wyjątkiem mieszanek pasz uzupełniających dla zwierząt mlecznych, jagniąt i cieląt)	50
Mieszanki paszowe uzupełniające dla świń i drobiu (z wyjątkiem młodych zwierząt)	30	
Inne mieszanki paszowe uzupełniające	5	

<sup>a</sup> Poziomy wskaźnikowe dla zbóż i produktów zbożowych przeznaczonych do paszy i mieszanek paszowych dotyczą paszy o wilgotności wynoszącej 12 %, <sup>b</sup> poziomy wskaźnikowe dla sumy T-2 i HT-2 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), <sup>c</sup> maksymalna zawartość w paszy o zawartości wilgoci 12%

### 1.3. Społeczny i ekonomiczny wpływ mikotoksyn

Ustalone najwyższe dozwolone poziomy mikotoksyn w poszczególnych krajach są kompromisem między wzorcem konsumpcji, lokalną dostępnością żywności, jej produkcją i poziomem handlu międzynarodowego, a danymi odnoszącymi się do oceny ryzyka dla zdrowia ludzi i zwierząt. W rezultacie organy odpowiedzialne za legislację w różnych rejonach świata mogą dochodzić do odmiennych wniosków i w konsekwencji decyzji związanych z zarządzaniem ryzykiem w odniesieniu do mikotoksyn. Taka różnica była przedmiotem raportu Banku Światowego z 2001 r. (Otsuki i in., 2001) dotyczącego nowego prawodawstwa UE w związku z obecnością aflatoksyn w żywności wprowadzonego w 1998 roku, które to miało obniżyć eksport żywności z Afryki na rynek europejski

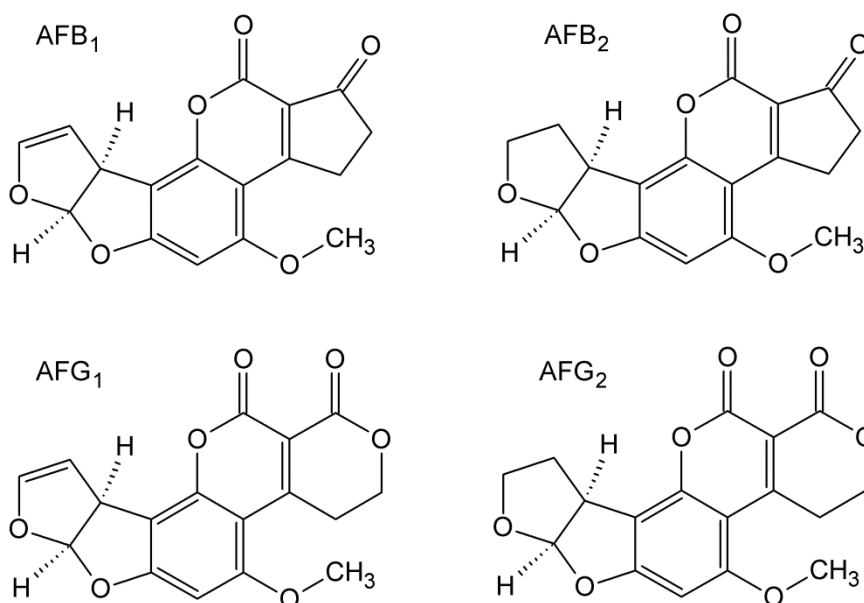
o 64%. Raport ten został zaktualizowany w 2005 r., korygując szacunki dotyczące strat finansowych, które nie zostały potwierdzone, a wiele krajów eksportujących skorzystało wręcz z nowego ustawodawstwa (World Bank, 2005).

Poprawa dokładności badań nad skutkami ekonomicznymi zanieczyszczenia surowców mikotoksynami pozwoliła na opracowanie modeli i ich wykorzystywanie przez wszystkie zainteresowane strony zaangażowane w proces produkcji żywności i paszy do oszacowania wpływu skażenia mikotoksynami (Wu, 2015). W Unii Europejskiej wpływ na handel uwidacznia się m.in. w liczbie powiadomień w Systemie Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności i Paszach Unii Europejskiej (RASFF). W 2021 r. mikotoksyny stanowiły ponad 30% wszystkich odrzuceń żywności i pasz na granicy UE. Liczba odrzuceń przekroczyła wartości przypisane innym zagrożeniom, np. obecności patogenów, metali ciężkich i pozostałości leków weterynaryjnych (RASFF Data, 2022).

## 1.4. Charakterystyka głównych grup mikotoksyn

### 1.4.1. Aflatoksyny

Aflatoksyny (AF) to pierwsza grupa mikotoksyn poddana intensywnym badaniom po wybuchu choroby „X” indyków. W żywności pochodzenia roślinnego aflatoksyny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> (Rys. 1) występują w różnych proporcjach, w zależności od gatunku grzyba (np. *Aspergillus flavus* lub *Aspergillus parasiticus*) oraz warunków jego wzrostu (Bennett i Klich, 2003).



Rysunek 1. Wzory strukturalne aflatoksyn

Słowo „aflatoksyny” pochodzi od (*A*)*sp*er*g*ill*u*s (*fla*)*vu*s, nazwy jednego z pierwszych zidentyfikowanych gatunków wytwarzających te związki. W toku dalszych badań stwierdzono, że

również wiele innych gatunków *Aspergillus* może być odpowiedzialnych za wytwarzanie aflatoksyn (Benkerroum, 2020). Podział AF na grupy (B lub G) jest związany z ich fluorescencją w świetle ultrafioletowym i barwą światła emitowanego: niebieską (blue, B) lub zieloną (green, G) – w zależności od obecności cyklicznego ketonu lub laktonu w strukturze cząsteczkowej. Numer aflatoksyny odnosi się do wiązania podwójnego (indeksowanego jako 1) lub wiązania pojedynczego (indeksowanego jako 2) w pozycji C-8,9 cząsteczki. Ze względu na swoje właściwości fluorescencyjne AF są stosunkowo łatwe do oznaczenia za pomocą chromatografii z detekcją fluorescencyjną, co przyczyniło się do ich szybkiego wykrycia w badaniach choroby „X” indyków.

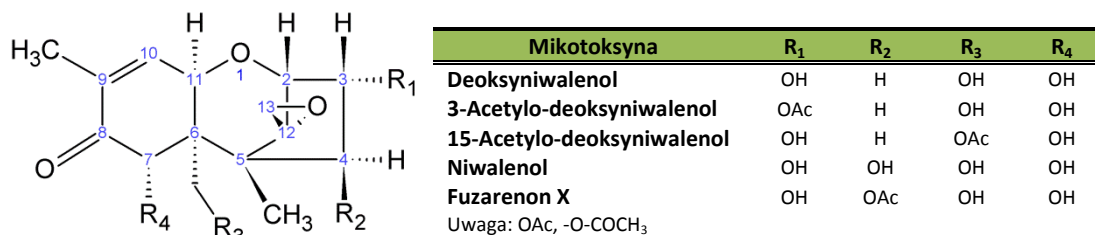
Aflatoksyna B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) jest najważniejszym poznanym związkiem tej grupy, stanowiącym jeden z najsilniejszych naturalnych czynników rakotwórczych znanych człowiekowi. Toksyczność ostra AFB<sub>1</sub> zależy od gatunku zwierząt, a w jego obrębie – od wieku. Niezwykle wrażliwe na tę toksynę są prosięta (LD50 = 0,6 mg/kg m.c.), podczas gdy dla kurcząt wartość ta oscyluje między 6,5 a 18 mg/kg m.c. (Monson i in., 2015). Mechanizm rakotwórczości AFB<sub>1</sub> został dobrze poznany i jest wynikiem tworzenia się wysoce reaktywnego epoksydu w pozycji C-8,9 cząsteczki. Odpowiedzialny za to enzym znajduje się głównie w wątrobie. W kolejnym etapie epoksyd może reagować z DNA, RNA lub białkami, tworząc kowalencyjny addukt (Marchese i in., 2018). Addukt ten może powodować dysfunkcję genu kodującego supresor nowotworowy – białko p53, co w dalszym etapie może skutkować wystąpieniem zaburzeń cyklu komórkowego (Weng i in., 2017). Pomimo wysokiej rakotwórczości, liczba rzeczywistych przypadków pierwotnego raka wątroby jest niska w krajach rozwiniętych, podczas gdy w innych częściach świata, gdzie powszechne jest przewlekłe zapalenie wątroby, zwiększona ekspozycja na aflatoksyny znacznie zwiększa zachorowalność na ten nowotwór (Benkerroum, 2020). Narażenie na aflatoksyny na kontynencie afrykańskim może być stosunkowo wysokie. W Kenii kilkakrotnie dochodziło do groźnych aflatoksykoz i zgonów wśród ludzi (Shephard, 2008).

Aflatoksyny mogą być przekształcane do wielu innych metabolitów, z których najbardziej znana jest aflatoksyna M<sub>1</sub> (hydroksylowana AFB<sub>1</sub>). AFM<sub>1</sub> może występować w mleku, gdy pokarm ssaków zanieczyszczony jest AFB<sub>1</sub>. Stwierdzono „przenoszenie” (ang. *carry-over*) AFB<sub>1</sub> jako AFM<sub>1</sub> w mleku krów mlecznych na poziomie od 0,3% do 6,2% (Marchese i in., 2018), co stanowiło jedną z przyczyn wprowadzenia maksymalnych poziomów AFB<sub>1</sub> w paszy dla zwierząt. AFM<sub>1</sub>, powstała w wyniku transformacji aflatoksyny B<sub>1</sub>, jest uważana za tzw. mikotoksynę zmodyfikowaną (Rychlik i in., 2014).

#### **1.4.2. Trichoteceny**

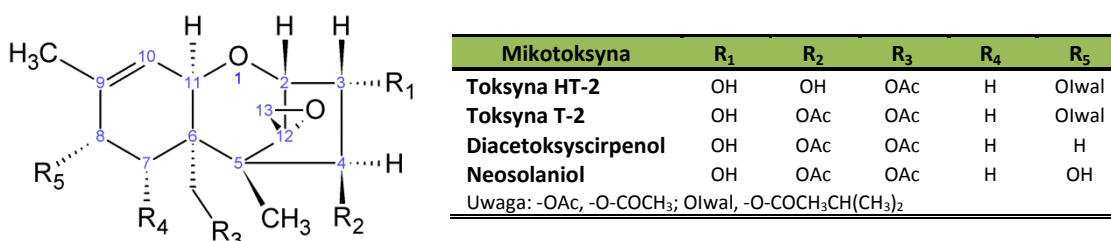
Trichoteceny są produkowane przez wiele różnych gatunków *Fusarium* (Richard, 2007). Są to policykliczne seskwiterpeny, posiadające podwójne wiązanie w pozycji C-9,10, pierścień epoksydowy

w pozycji C-12,13 oraz grupy hydroksylowe i acetylowe (Bennett i Klich, 2003). Najbardziej znaną i przebadaną pod kątem bezpieczeństwa żywności i pasz mikotoksyną z rodziny trichotecen jest deoksyniwalenol (Rys. 2). Związek ten jest wytwarzany głównie w zbożach (kukurydza oraz zboża drobnoziarniste jak pszenica, owies, jęczmień), podczas wegetacji w wyniku infekcji roślin pleśniami z rodzaju *Fusarium*, głównie *F. graminearum* i *F. culmorum*. Oprócz DON niektóre grzyby *Fusarium* wytwarzają również jego acetylowane formy, a mianowicie 3-acetylo-deoksyniwalenol (3-Ac-DON) i 15-acetylo-deoksyniwalenol (15-Ac-DON).



Rysunek 2. Wzór strukturalny trichotecen grupy B

Jako wtórne metabolity różnych gatunków *Fusarium* zostało opisanych około dwustu trichotecen, największą uwagę ze względu na zagrożenie zdrowia publicznego zwracają DON oraz toksyny T-2 i HT-2 (Rys. 3). Trichoteceny zostały podzielone na grupy ze względu na różnice strukturalne. Trichoteceny grupy A (m.in. toksyny T-2 i HT-2, diacetoksyscirpenol) posiadają grupę funkcyjną inną niż ketonowa w pozycji C-8. Występują rzadziej, ale są bardziej toksyczne niż trichoteceny grupy B, które posiadają grupę ketonową w wymienionym miejscu (Richard, 2007). DON wykrywany jest w różnych gatunkach zbóż, natomiast toksyny T-2 i HT-2 występują najczęściej w owsie, choć ich obecność stwierdzono również w innych zbożach i surowcach roślinnych (Kiš i in., 2021; Van der Fels-Klerx i Stratakou, 2010).



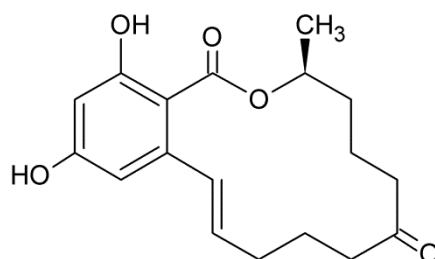
Rysunek 3. Wzór strukturalny trichotecen grupy A

Trichoteceny wykazują działanie drażniące układ pokarmowy, są toksyczne dla skóry i zaburzają funkcjonowanie układu odpornościowego. Występujące efekty toksyczne różnią się w zależności od toksyny i narażonego na nią gatunku. Przykładowo zwierzętami najbardziej wrażliwymi na toksyczne działanie DON są świny, a następnie gryzonie, psy, koty, drób i przeżuwacze (Mostrom i Raisbeck,

2007). Dane o toksyczności związane z różnicami gatunkowymi i wiekiem zostały uwzględnione przez UE przy ustalaniu najwyższych dopuszczalnych poziomów w paszach (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE).

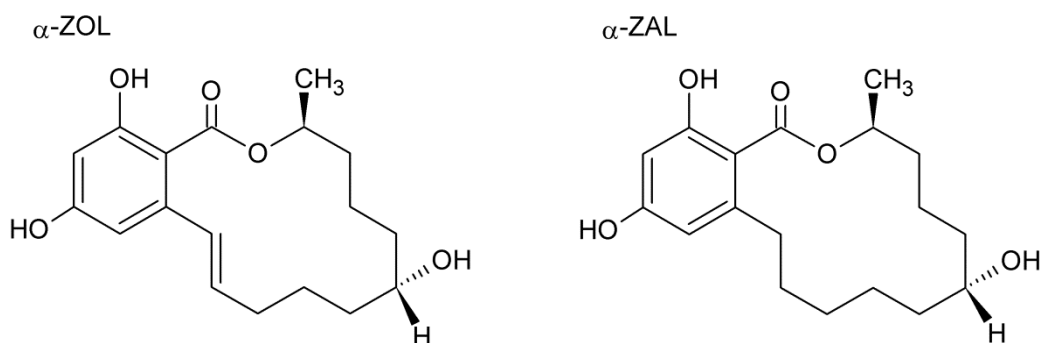
### 1.4.3. Zearalenon

Zearalenon (ZEN) (Rys. 4) jest metabolitem *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, występującym głównie w kukurydzy, pszenicy i jęczmieniu, ale także w innych zbożach. ZEN działa jako czynnik zaburzający gospodarkę hormonalną.



Rysunek 4. Wzór strukturalny zearalenonu

Toksyczność ZEN zależy od gatunku zwierząt, a dokładniej od drogi przemian metabolicznych. W szczególności szlak prowadzący do zmodyfikowanej formy  $\alpha$ -zearalenolu (Rys. 5), z grupą ketonową zredukowaną do grupy hydroksylowej, odgrywa kluczową rolę w toksyczności, ponieważ stwierdzono znacznie większą siłę działania estrogenowego tego metabolitu. Inne pochodne, takie jak  $\alpha$ -zearalanol (znany również jako zearanol) (Rys. 5) są stosowane w różnych częściach świata jako środki anaboliczne i promotory wzrostu u owiec i bydła (Bennett i Klich, 2003).

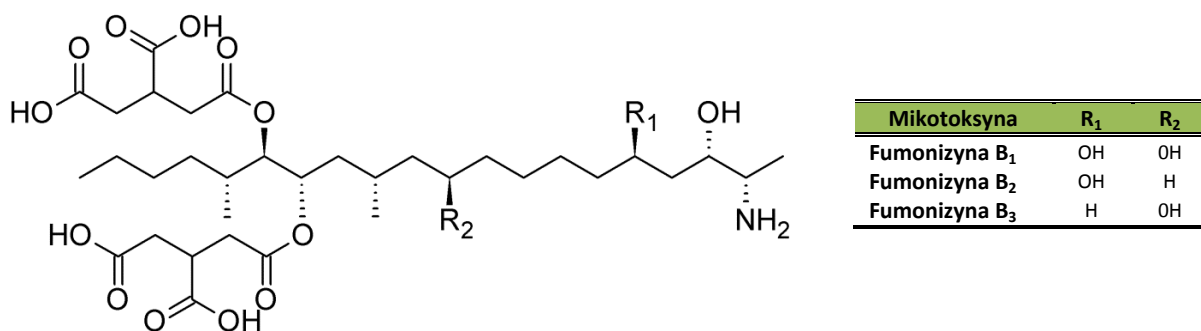


Rysunek 5. Wzory strukturalne  $\alpha$ -zearalenolu ( $\alpha$ -ZOL) oraz  $\alpha$ -zearalanolu ( $\alpha$ -ZAL)

### 1.4.4. Fumonizyny

Fumonizyny (Rys. 6), w szczególności fumonizyna B<sub>1</sub> i fumonizyna B<sub>2</sub>, były ostatnią zidentyfikowaną grupą mikotoksyn, stwarzających poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego.





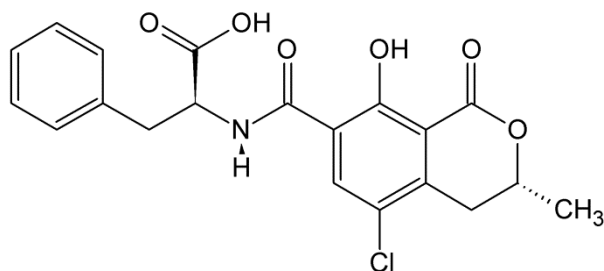
Rysunek 6. Wzór strukturalny fumonizyn

Fumonizyny (FB) są wytwarzane głównie przez *Fusarium verticillioides* (dawniej *Fusarium moniliforme*) oraz *Fusarium proliferatum*, gatunki zasiedlające przede wszystkim kukurydzę. Oprócz kukurydzy skażone mogą być również inne produkty roślinne, takie jak szparagi czy czosnek (Seefelder i in., 2004; Tonti i in., 2017). Początkowo zakładano, że tylko pleśnie *Fusarium* wytwarzają fumonizyny, lecz w dalszych badaniach wykazano, że niektóre gatunki *Aspergillus* są również producentami tej grupy mikotoksyn (Frisvad i in., 2011; Onami i in., 2018).

Fumonizyny działają toksycznie na zwierzęta zakłócając metabolizm sfingozyny. Są one odpowiedzialne za zmiękczenie istoty białej mózgu (leukoencefalopatię) u koni i obrzęk płuc u świń (Colvin i Harrison, 1992; Marasas i in., 1988). Poza specyficznymi skutkami narażenia na te związki znanymi u koni i świń, u szczurów i myszy rozwija się przede wszystkim rak wątroby i nerek, a w przypadku ludzi istnieje silne przypuszczenie, że fumonizyny powodują raka przełyku (Gelderblom i in., 1994; Howard i in., 2001; Wang i in., 2014).

#### 1.4.5. Ochratoksyna A

Ochratoksyna A (OTA) (Rys. 7) jest mikotoksyną stanowiącą potencjalne zanieczyszczenie wielu produktów spożywczych. Monitorowanie jej występowania prowadzono w ostatnich latach ze względu na fakt jej obecności w produktach o wysokiej wartości rynkowej, takich jak przyprawy, kawa, kakao, wino lub lukrecja, a także winogrona i zboża – w szczególności jęczmień.



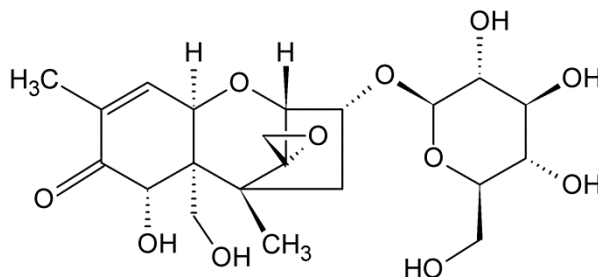
Rysunek 7. Wzór strukturalny ochratoksyny A

OTA jest produkowana przez niektóre gatunki *Penicillium* (*P. verrucosum*) oraz *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. niger*) (Bennett i Klich, 2003). OTA jest mikotoksyną o właściwościach nefrotoksycznych, teratogennych, hepatotoksycznych, embriotoksycznych, neurotoksycznych, immunotoksycznych i genotoksycznych (Richard, 2007) i została zaklasyfikowana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem jako potencjalnie rakotwórcza (grupa 2B) dla ludzi (IARC, 1993). W organizmie OTA silnie wiąże się z albuminą surowicy. Połączenie to charakteryzuje długi okres półtrwania (około 35 dni u ludzi), co sprzyja jej bioakumulacji w narządach (Grajewski i in., 2008; Hagelberg i in., 1989). U świń, szczurów i kurcząt OTA przenoszona jest głównie do nerek, a niższe stężenia oznaczane są w wątrobie, mięśniach i tłuszczu. W organizmach wszystkich badanych gatunków OTA ulega hydrolizie (detoksykacji) do ochratoksyny  $\alpha$ , głównie przez mikroflorę bakteryjną jelit (Walker i Larsen, 2005). Ponadto OTA powoduje endemiczną nefropatię u świń i jest również uważana za jeden z prawdopodobnych czynników patogenezy bałkańskiej endemicznej nefropatii (BEN) u ludzi (Krogh i in., 1977; Walker i Larsen, 2005). Dane dotyczące występowania OTA we krwi można stosować do monitorowania spożycia kawy, ponieważ specyficzny produkt jej degradacji (2'R-OTA), powstaje tylko w wysokiej temperaturze podczas palenia kawy i jest wykrywany wyłącznie we krwi osób ją pijących (Cramer i in., 2015).

#### 1.4.6. Mikotoksyny modyfikowane oraz „nowo” pojawiające się

##### Mikotoksyny modyfikowane

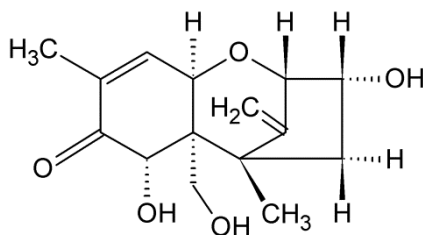
W ciągu ostatnich kilkunastu lat zidentyfikowano związki będące wynikiem biochemicznej modyfikacji mikotoksyn, zachodzącej podczas procesów metabolizmu w organizmach roślinnych. Przemiany te wynikają głównie z mechanizmów obronnych roślin lub procesów termicznych. W piśmiennictwie stosowane są terminy „zamaskowane mikotoksyny” oraz „zmodyfikowane mikotoksyny” w odniesieniu do tych substancji (Rychlik i in., 2014). Modyfikacja biochemiczna ma na celu neutralizację i/lub wydalenie mikotoksyn przez organizm. Trichoteceny, takie jak DON, są patogenami roślinnymi (zbożowymi), a metabolizm do DON-3-głukozydu (Rys. 8) umożliwia komórce roślinnej wydalenie związku z cytozolu do wakuoli zmniejszając toksyczności dla rośliny (Berthiller i in., 2011).



Rysunek 8. Wzór strukturalny deoksyniwalenolu-3-głukozydu

Analogicznie metabolizowane są inne trichoteceny grupy B (Berthiller i in., 2013). W konsekwencji odmiany zbóż, w których wspomniane przemiany zachodzą z najwyższą wydajnością są bardziej odporne na fuzariozę kłosów.

Biotransformację mikotoksyn w organizmach roślinnych i zwierzęcych można podzielić na reakcje pierwszej fazy (m.in. redukcja, utlenianie, hydroliza). Przykładem może być przemiana DON do deepoksy-deoksyniwalenolu (Rys. 9) oraz ZEN do  $\alpha$ -ZOL.



Rysunek 9. Wzór strukturalny deepoksy-deoksyniwalenolu

W reakcjach drugiej fazy zachodzą procesy sprzęgania z np. kwasem glukuronowym, kwasem siarkowym czy glukozą (m.in. transformacje DON do DON-3-G, ZEN do ZEN-4-siarczanu lub ZEN-4-glukozydu) (Berthiller i in., 2013; Metzler i in., 2010; Zhang i in., 2020). W ostatnich latach zidentyfikowano szereg zmodyfikowanych mikotoksyn, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Ze względu na ich potencjał toksykologiczny opisano metabolity DON i ZEN oraz szereg pochodnych fumonizyn (Berthiller i in., 2013) i stwierdzono, że ich obecność w żywności i paszach może przyczynić się do całkowitego narażenia na mikotoksyny pierwotne. Wynika to z możliwości odzyskania potencjału toksycznego, gdy zmodyfikowane formy są ponownie przekształcane do macierzystej mikotoksyny, jak wykazano w przypadku DON u ludzi i świń (Nagl i in., 2014; Vidal i in., 2018).

### Mikotoksyny „nowo pojawiające się”

#### Bowerycyna i enniatyny

Bowerycyna i enniatyny (A, A<sub>1</sub>, B i B<sub>1</sub>) są często wymieniane w kontekście „nowo” pojawiających się mikotoksyn ze względu na zainteresowanie naukowe (ang. *emerging mycotoxins*). Wymienione mikotoksyny należą do cyklicznych związków podobnych do niektórych antybiotyków makrolidowych, takich jak walinomycyna. Mimo że właściwości antybiotyczne bowerycyny zostały opisane w 1969 r., dopiero w ostatniej dekadzie ubiegłego stulecia zainteresowano się nią jako zanieczyszczeniem żywności (Krska i in., 1996; Monti i in., 2000). Bowerycyna jest wytwarzana przez wiele grzybów *Fusarium*, podczas gdy po raz pierwszy wyizolowano ją jako metabolit *Beaveria bassiana*, grzyba atakującego owady (Wang i in., 2021). W 2013 roku badania 83 próbek surowców

spożywczych i paszowych wykazały, że bowerycyna i enniatyny występują częściej niż DON, tj. w około 98% wszystkich analizowanych próbek. Jednak maksymalne obserwowane poziomy stanowiły mniej niż 10% poziomu DON (Streit i in., 2013). Ograniczona dostępność materiałów referencyjnych i wzorców mikotoksyn jest jedną z przyczyn opóźnionego monitorowania tej grupy mikotoksyn, co utrudnia oszacowanie narażenia dla oceniających ryzyko.

### **Toksyny grzybów *Alternaria***

Grzyby z rodzaju *Alternaria* są zdolne do syntetyzowania wielu różnych metabolitów wtórnych, jednak tylko kilka zostało zidentyfikowanych jako toksykologicznie istotne dla bezpieczeństwa żywności. Należą do nich: alternariol, eter monometylowy alternariolu, altenuen, kwas tenuazonowy, i tentoksyna. Toksyny *Alternaria* mogą występować w zbożach, nasionach oleistych, takich jak słonecznik czy rzepak, a także w wielu warzywach (w szczególności pomidorach i marchwi) oraz owocach. Kwas tenuazonowy jest najczęściej występującą toksyną *Alternaria sp.*, a jego zawartość w warzywach i owocach o wystarczająco wysokiej zawartości wody może osiągać poziom kilku mg/kg (Mujahid i in., 2020).

## **1.5. Techniki analityczne**

Bardzo ważnym zagadnieniem, które należy uwzględnić podczas opracowywania metod wykrywania i oznaczania mikotoksyn jest ich możliwe niejednorodne rozmieszczenie w surowcach roślinnych i produktach. Problem ten dotyczy szczególnie aflatoksyn i ochratoksyny A, podczas gdy inne mikotoksyny (np. DON), są rozmieszczone bardziej jednorodnie w badanym materiale (Miraglia i in., 2005; Whitaker, 2010). Powodem większej jednorodności rozmieszczenia jest zazwyczaj zagrzybienie na całej powierzchni zbóż przed zbiorami. Z drugiej strony aflatoksyny czy ochratoksyna A występują często w „gorących punktach” (ang. *hot spots*) i zanieczyszczają produkty rolne podczas przechowywania w nieodpowiednich warunkach (Richard, 2007). Badania różnych sposobów przygotowania do analizy próbki laboratoryjnej z próbki zbiorczej wykazały, że najlepsze rezultaty w celu reprezentatywnego zmniejszenia wielkości próbki daje procedura polegająca na mieszaniu jej w formie wodnistej zawiesiny (Spanjer i in., 2006). Metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli w surowcach i produktach spożywczych regulują przepisy unijne (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006; Rozporządzenie Komisji (UE) nr 519/2014).

### **1.5.1. Ekstrakcja**

Większość metod wykrywania i oznaczania mikotoksyn opiera się na zastosowaniu zoptymalizowanej ekstrakcji, po której zazwyczaj następuje etap oczyszczania ekstraktów (Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011). Odpowiednio dobrane parametry procesów ekstrakcji i oczyszczania są bardzo ważną częścią rzetelnej i dokładnej procedury analitycznej, a także wpływają na możliwość

zastosowania odpowiedniej techniki oznaczania. W izolacji mikotoksyn z badanego materiału istotne znaczenie dla wydajności ekstrakcji ma struktura związku. Związki polarne, takie jak deoksynivalenol czy fumonizyny, wymagają wykorzystania rozpuszczalników polarnych, w tym wody (Vidal i in., 2017). Ekstrakcja aflatoksyn w celu wyodrębnienia ich z różnorodnych matryc żywności i pasz przeprowadzana jest z użyciem polarnych rozpuszczalników organicznych, takich jak: acetonitryl, chloroform czy metanol (Zhang i Banerjee, 2020). Obecnie stosowanie rozpuszczalników chlorowanych do ekstrakcji jest coraz rzadsze ze względu na ich szkodliwy wpływ na środowisko. W związku z tym, że czystość próbki bezpośrednio wpływa na parametry walidacyjne metody, etap oczyszczania należy do najważniejszych w procedurze analitycznej. Ponadto śladowe ilości analitu mogą być maskowane przez inne związki znajdujące się w matrycy czy rozpuszczalnikach użytych podczas przygotowania próbki do analizy. Niezwykle ważnym aspektem tego etapu jest także odpowiednia jakość naczyń szklanych, ponieważ mikotoksyny mogą adsorbować się na ich powierzchni, co może wpływać na wyniki oraz na parametry walidacyjne metody (Langseth i Rundberget, 1998).

Wyodrębnianie mikotoksyn z próbek płynnych (piwo, mleko, soki) prowadzone jest na ogół za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE), natomiast z próbek stałych (zboża, suszone owoce, pasze dla zwierząt) – przy zastosowaniu ekstrakcji ciało stałe-ciecz (Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011). Wykorzystanie podczas ekstrakcji zakwaszonych roztworów rozpuszczalników pomaga rozerwać silne wiązania między analitem a składnikami żywności (białkami i cukrami) i jest często stosowane w celu uzyskania lepszej wydajności procesu. Stwierdzono również, że dodanie wody do rozpuszczalników organicznych zwiększa polarność ekstrahenta i poprawia jego przenikanie do żywności czy paszy (Alshannaq i Yu, 2017).

Ekstrakcja mikotoksyn z próbek stałych przeprowadzana jest przy użyciu polarnych rozpuszczalników organicznych, w tym acetonitrylu, metanolu czy octanu etylu (Breibach, 2017; Desmarchelier i in., 2010; Kalogiouri i in., 2021). Badania Sulyok i in. (2006) wykazały, że dodanie kwasu octowego do mieszaniny ekstrakcyjnej poprawia odzyski i zmniejsza wpływ efektów matrycy większości z 39 analizowanych mikotoksyn (szczególnie FB i AF) w próbkach kukurydzy i pszenicy. W przypadku matryc o wysokiej zawartości związków niepolarnych zawierających m.in. cholesterol lub lipidy, stosowane są niepolarne rozpuszczalniki ekstrakcyjne, takie jak cykloheksan i heksan (Rahmani i in., 2009).

W analityce mikotoksyn znalazły zastosowanie również bardziej wyrafinowane techniki ekstrakcji, takie jak ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym (SFE), przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE) i ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MAE) (Desmarchelier i in., 2010; Kalogiouri i in., 2021; Zougagh i Ríos, 2008). Zaletą tych technik jest obniżone zużycie

rozpuszczalników z jednoczesną poprawą wydajności procesu. Do wad należą wysokie koszty zakupu aparatury i jej stosowania, a także ograniczona dostępność w laboratoriach.

Etap oczyszczania ekstraktów jest niezbędny do wyeliminowania związków zakłócających wykrywanie i oznaczanie analitów. Standardowo stosowane metody oczyszczania polegają na wykorzystaniu m.in. kolumn powinowactwa immunologicznego (IAC), kolumn jonowymiennych i ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W SPE stosowane są kolumnki wypełnione złożem sorbentu. Ekstrakt próbki, przygotowany z zastosowaniem jednego rozpuszczalnika, jest przepuszczany pod zmniejszonym ciśnieniem przez kolumnkę. Po przepłukaniu złoża w celu usunięcia większości zanieczyszczeń, anality są eluowane innym rozpuszczalnikiem (Razzazi-Fazeli i Reiter, 2011). Kolumny mogą być wypełnione różnymi materiałami, m.in. żelem krzemionkowym, fazami chemicznie związanymi z żelem krzemionkowym (np. oktadecylową (C-18), aminopropylową, fenylową), florisilem, materiałami jonowymiennymi, zarówno anionowymi, jak i kationowymi, immunoabsorbentami, a także polimerami z nadrukiem cząsteczkowym (MIP) (Belajová i in., 2007; Gadzała-Kopciuch i in., 2019; Jedziniak i in., 2019; Royer i in., 2004; Santana Oliveira i in., 2019; Zougagh i Ríos, 2008). W oczyszczaniu ekstraktów stosowane są także kolumny wielofunkcyjne (np. Mycosep), wypełnione kilkoma sorbentami, których celem jest retencja zanieczyszczeń.

### **1.5.2. Oznaczanie mikotoksyn**

Analiza próbek surowców roślinnych, żywności i pasz w kierunku mikotoksyn obejmuje zarówno badania ilościowe, jak i jakościowe. Do wykrywania i oznaczania mikotoksyn stosowane są różne techniki instrumentalne. Techniki te podzielone na dwie główne grupy: przesiewowe i chromatograficzne. Techniki przesiewowe obejmują chromatografię cienkowarstwową (TLC) - obecnie rzadko stosowaną, testy immunoenzymatyczne (ELISA), immunochromatograficzne testy paskowe (LFT), testy immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) oraz testy biosensorowe (Lattanzio i in., 2019). ELISA jest najczęściej używanym testem immunologicznym do wykrywania mikotoksyn z zestawami testowymi powszechnie dostępnymi na rynku. Do zalet tej techniki należą: łatwość przygotowania próbki, niskie koszty aparatury, jednoczesna analiza kilku próbek, ograniczone stosowanie rozpuszczalników organicznych i możliwa ocena wizualna (Janik i in., 2021; Pascale, 2009). Wadą są jednak wyniki fałszywie dodatnie ze względu na reakcje krzyżowe z podobnymi strukturalnie toksynami lub związkami matrycy. Stosowanie innych technik przesiewowych jest ograniczone ze względu na ich dużą zależność od rodzaju matrycy i brak odpowiednich materiałów do kalibracji.

Wśród technik chromatograficznych najszersze zastosowanie znajdują HPLC-FLD, HPLC-UV, LC-MS/MS. Rozpatrując aspekt ekonomiczny, a także czułość i dokładność detekcji, zwłaszcza przy

selektywnym przygotowaniu próbki, do oznaczania pojedynczych mikotoksyn lub jednej grupy związków z powodzeniem można zastosować system HPLC wyposażony w detektor fluorescencyjny (FLD) lub UV. Techniki te, choć nadal są składowymi metod oznaczania mikotoksyn w żywności i paszach ustanowionych przez organizacje normalizacyjne, takie jak AOAC International czy Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN) i służą urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn, są czasochłonne i wymagają zastosowania wielu etapów oczyszczania próbki (Pascale, 2009).

### **Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas**

Obecne trendy badawcze, wobec rosnącej liczby analizowanych matryc i analitów, zmierzają ku opracowaniu uniwersalnych metod wieloskładnikowych. Głównymi wyzwaniami podczas opracowywania nowych metod analitycznych są:

- szeroki zakres wartości maksymalnych dopuszczalnych poziomów poszczególnych mikotoksyn,
- różnorodność matryc żywności i pasz (m.in. zwiększenie czaso- i kosztochłonności przygotowania krzywej kalibracyjnej w oparciu o matrycę wzbogaconą w anality),
- duże zróżnicowanie mikotoksyn pod względem ich właściwości fizykochemicznych.

Aby wyeliminować te problemy w opracowywaniu metod wieloskładnikowych często stosuje się proste procedury ekstrakcji próbki z wykorzystaniem mieszaniny acetonitryl-woda jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, a następnie oznaczanie mikotoksyn techniką chromatografii cieczowej (LC) sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (MS/MS). Technika ta dedykowana jest szerokiemu spektrum analitów, włączając związki o dużej polarności, nietrwałe termicznie i nielotne (Sforza i in., 2006; Zöllner i Mayer-Helm, 2006). Wprowadzenie techniki LC-MS/MS umożliwiło ponadto jednoczesne wykrywanie nawet kilkuset mikotoksyn i innych metabolitów grzybów (Malachová i in., 2014). Do głównych zalet cechujących tą technikę analityczną należą wysoka czułość (poziomy  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i selektywność bez konieczności przeprowadzania analitów w pochodne oraz dodatkowe punkty identyfikacyjne (monitorowanie kilku reakcji fragmentacji dla związków). Ponadto możliwość uproszczenia procedury przygotowania próbek oraz zadowalająca wydajność analizy sprawiły, że LC-MS/MS staje się coraz częściej pierwszym wyborem przy oznaczaniu mikotoksyn w próbkach żywności i pasz.

Kluczowymi wyzwaniami przy ilościowym oznaczaniu mikotoksyn metodami opartymi na spektrometrii mas, w związku z uproszczonym przygotowaniem próbek, są efekty matrycy, które w większości przypadków tłumią sygnał w detektorze w porównaniu z sygnałem wzorców w samym rozpuszczalniku i mogą wpływać na jakość uzyskanych wyników oraz na czułość, dokładność i selektywność metody. Istotnym jest zatem aby obniżyć lub zrekomensować wpływ matrycy,

poprzez zastosowanie np. rozcieńczenia próbki, metody dodatku wzorców, metody krzywej kalibracyjnej sporządzonej w oparciu o matrycę wzbogaconą w anality czy metody kalibracji wewnętrznej z użyciem wzorców znakowanych izotopowo (Fabregat-Cabello i in., 2016). Rozcieńczenie próbki jest sposobem najprostszym, jednak prowadzi do obniżenia czułości metody i podwyższenia granic wykrywalności i oznaczalności. Metoda dodatku wzorca jest dość złożona i czasochłonna w przypadku wzbogacania próbek zawierających wiele mikotoksyn występujących na różnych poziomach stężeń, a dodatkowo wymaga analizowania ekstraktów próbek oraz ekstraktów wzbogaconych, co wydłuża czas analizy. Metody krzywej kalibracyjnej sporządzonej w oparciu o matrycę wzbogaconą w anality są często stosowane do wyeliminowania wpływu matrycy (Dagnac i in., 2016; Sulyok i in., 2006; Tarazona i in., 2020), są one jednak czasochłonne, szczególnie gdy wymagana jest analiza kilku różnych matryc. Dodatkowym problemem jest brak dostępności próbek ślepych, niezawierających mikotoksyn. Badania Varga i in. (2012) wykazały, że różnice we wpływie matrycy istnieją nawet w obrębie tej samej matrycy i że nie jest możliwe ich całkowite wyeliminowanie przez użycie metody krzywej kalibracyjnej sporządzonej w oparciu o matrycę wzbogaconą w anality, co prowadzi do uzyskania niższych wartości odzysków dla niektórych mikotoksyn. W przypadku metod kalibracji z dodatkiem wzorców wewnętrznych, najlepsze efekty uzyskiwane są przy zastosowaniu wzorców znakowanych izotopowo, ze względu na te same właściwości chemiczne i fizyczne. Dodatkową zaletą jest ich brak w naturalnie zanieczyszczonych próbkach. Wzrost czułości nowoczesnych systemów LC-MS/MS sprawił, że stosowanie dość drogich znakowanych izotopowo wzorców jest bardziej opłacalne, ponieważ do wzbogacenia próbek żywności czy pasz wystarczająca jest ich niewielka ilość (Habler i in., 2017; Habler i Rychlik, 2016; Yang i in., 2021; Zhang i in., 2017).

Pomimo niewątpliwych zalet spektrometrii mas, wysokie koszty jakie należy ponieść w związku z zakupem aparatury i późniejszym jej utrzymaniem, sprawiają, że często w analityce mikotoksyn (szczególnie aflatoksyn, ochratoksyny A oraz zearalenonu) wykorzystuje się ich naturalną fluorescencję i do oznaczania nadal stosuje się chromatografię cieczową z detekcją fluorescencyjną (Muñoz-Solano i González-Peñas, 2020).

## **1.6. Strategie wyeliminowania zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w materiałach roślinnych**

Główną strategią zwalczania zanieczyszczenia żywności i pasz mikotoksynami jest zapobieganie. Stosowane są liczne podejścia od ulepszonych praktyk rolniczych po tradycyjną hodowlę odpornych odmian roślin i inżynierię genetyczną. Jednoczesne monitorowanie warunków pogodowych sprzyjających rozwojowi grzybów, realizowane za pomocą danych meteorologicznych, pozwala na wykorzystanie modeli przewidujących występowanie mikotoksyn na danym terenie (Liu i Van der



Fels-Klerx, 2021). Inną strategią jest terenowe zastosowanie nie wytwarzających toksyn grzybów konkurencyjnych (Ehrlich, 2014).

Mikotoksyny są dość stabilne w łańcuchu produkcji żywności. Istnieją jednak techniki przetwarzania, które mogą prowadzić do ich przemian (degradacji) skutkujących niższym potencjałem toksycznym. Należy pamiętać jednak, że produkty degradacji mogą być również toksyczne. Fumonizyny i aflatoksyny ulegają degradacji podczas nixtamalizacji – tradycyjnej obróbki termicznej kukurydzy popiołem lub wapnem. Proces ten wywodzi się z Ameryki Łacińskiej i początkowo był stosowany do poprawy właściwości przetwórczych i sensorycznych mąki kukurydzianej (Schaarschmidt i Fauhl-Hassek, 2019).

Zawartość AF w surowcach roślinnych i paszach można w dużej mierze zredukować za pomocą amoniaku, chociaż proces ten obniża również wartość odżywczą produktów (Nyandieka i in., 2009; Sipos i in., 2021). W ostatnich latach przetestowano szereg potencjalnych dodatków paszowych pod kątem ich zdolności do obniżania toksycznego oddziaływania mikotoksyn. Ich działanie oparte jest na różnych mechanizmach. Przykładami są wiązanie AF i uniemożliwienie ich trawienia (Jard i in., 2011) oraz detoksykacja FB podczas trawienia przez degradację enzymatyczną (Masching i in., 2016). Prawodawstwo UE wymaga zezwolenia na wprowadzenie takich produktów do obrotu. Obecnie jedynie kilka preparatów posiada stosowne certyfikaty i zostało dopuszczonych do sprzedaży w Unii Europejskiej (Eskola i in., 2018).

## 2. Cele pracy

Pomimo kilkudziesięciu lat badań nad mikotoksynami skażenie nimi żywności i pasz ciągle pozostaje globalnym problemem. Według raportów Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) szacuje się, że mikotoksyny obecne są każdego roku w prawie 25% światowych upraw i powodują ogromne straty w rolnictwie oraz przemyśle spożywczym i paszowym, liczone w miliardach dolarów (Alshannaq i Yu, 2017). Skutki ekonomiczne są odczuwalne w łańcuchu produkcji rolnej, obejmującym producentów roślin i zwierząt, przemysł zbożowy oraz konsumentów. Doniesienia o niedostatecznym poziomie bezpieczeństwa w odniesieniu do produktów spożywczych i pasz są od wielu lat ciągle aktualne. Informacje te dotyczą przede wszystkim surowców i gotowych produktów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Dlatego podjęta tematyka badawcza oceny poziomów skażenia metabolitami i relacji między nimi służy zagwarantowaniu bezpiecznych i zdrowych produktów spożywczych i paszowych. Niestety wielu konsumentów stawia sobie dziś z tychże powodów ze strachem pytanie, co jeszcze mogą oni obecnie ze spokojnym sumieniem nabyć i spożyć. Profilaktyka i troska o przydatne do spożycia i nienasuwające podejrzeń produkty spożywcze i paszowe muszą mieć miejsce już o wiele wcześniej – swym zasięgiem obejmować cały łańcuch produkcyjny „od pola, czy obory do stołu”. Dlatego też cykl podjętych badań jest powiązany z zadaniami służby zdrowia, przez potencjalną poprawę bezpieczeństwa produktów spożywczych, a tym samym ochronę zdrowia konsumentów.

Surowce i produkty są najczęściej skażone kilkoma mikotoksynami, co określane jest terminem polikontaminacja. Ocena występowania wielu mikotoksyn (współwystępowanie) w badanym materiale stanowi obecnie duże wyzwanie dla naukowców na całym świecie, ze względu na często większą toksyczność (efekt synergistyczny) w porównaniu z pojedynczymi związkami. Mikotoksyny mają szeroki zakres mechanizmów działania i efektów toksycznych – od skażenia chronicznego do zatrucia ostrego. Rozwój technik instrumentalnych (głównie LC-MS/MS) umożliwia w krótkim czasie oznaczeniu wielu mikotoksyn w próbce na niskich poziomach stężeń.

W związku z powyższym wyznaczono następujące cele pracy:

1. Opracowanie metod badawczych oznaczania mikotoksyn w materiale roślinnym, paszach, żywności (piwo, zielona kawa), a także w płynie ustrojowym (surowica);
2. Ocena zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w paszach:
  - przeprowadzenie za pomocą opracowanych metod badawczych oceny występowania mikotoksyn w materiale roślinnym i paszach,
  - ewaluacja współwystępowania mikotoksyn,
  - określenie korelacji między badanymi mikotoksynami;

3. Ocena zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w żywności:
  - przeprowadzenie za pomocą opracowanych metod badawczych oceny występowania mikotoksyn w piwie i zielonej kawie,
  - ewaluacja współwystępowania mikotoksyn,
  - określenie narażenia konsumentów, związanego ze spożywaniem piwa zawierającego mikotoksyny;
4. Porównanie występowania i poziomów ochratoksyny A w próbkach surowicy osób dializowanych i zdrowych.

### 3. Materiały i metody

W rozprawie zostały zaprezentowane wybrane zagadnienia prac badawczych z obszaru wielu projektów wykonanych w Katedrze Fizjologii i Toksykologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, służących szacowaniu ryzyka i ocenie bezpieczeństwa surowców roślinnych i produktów.

#### 3.1. Materiały, odczynniki i substancje wzorcowe

##### Materiały:

- Celite® 545 (Merck, Niemcy);
- Kolumnienki Bond Elut Mycotoxin (Agilent, USA);
- Kolumnienki MultiSep® 211 Fum (Romer Labs, Austria);
- Kolumnienki powinowactwa immunologicznego AflaTest™ (Vicam, USA);
- Kolumnienki powinowactwa immunologicznego CitriTest™ (Vicam, USA);
- Kolumnienki powinowactwa immunologicznego OCHRAPREP® (R-Biopharm, Niemcy).

##### Odczynniki:

- Acetonitryl, czystość gradientowa (Merck, Niemcy);
- Bromek potasu, czystość ACS (Merck, Niemcy);
- Chlorek magnezu sześciowodny, czystość ACS (Merck, Niemcy);
- Chlorek sodu, czystość ACS (Merck, Niemcy);
- Chloroform, czysty do analizy (Merck, Niemcy);
- Kwas fosforowy, czystość ACS (Merck, Niemcy);
- Kwas octowy, czystość LC-MS (Merck, Niemcy);
- Metanol, czystość gradientowa (Merck, Niemcy);
- Metanol, czystość LC-MS (Merck, Niemcy);
- Octan amonu, czystość LC-MS (Merck, Niemcy);
- Stabilizowana buforem fosforanowym sól fizjologiczna (PBS, ang. *phosphate-buffered saline*) (R-Biopharm, Niemcy);
- Woda o stopniu czystości I otrzymana przy użyciu zestawu Elix3 oraz Simplicity UV (Millipore, USA).
- Wodorotlenek sodu, czystość ACS (Merck, Niemcy).

##### Substancje wzorcowe:

- <sup>13</sup>C<sub>15</sub>–Deoksyniwalenol (Romer Labs, Austria);
- <sup>13</sup>C<sub>18</sub>–Zearalenon (Romer Labs, Austria);
- <sup>13</sup>C<sub>22</sub>–Toksyna HT-2 (Romer Labs, Austria);

- $^{13}\text{C}_{24}$ -Toksyna T-2 (Romer Labs, Austria);
- 15-Acetylo-deoksyniwalenol (Romer Labs, Austria);
- 3-Acetylo-deoksyniwalenol (Romer Labs, Austria);
- Aflatoksyna B<sub>1</sub> (Romer Labs, Austria);
- Aflatoksyna B<sub>2</sub> (Romer Labs, Austria);
- Aflatoksyna G<sub>1</sub> (Romer Labs, Austria);
- Aflatoksyna G<sub>2</sub> (Romer Labs, Austria);
- Aflatoksyna M<sub>1</sub> (Romer Labs, Austria);
- Cytrynina (Romer Labs, Austria);
- Deepoksy-deoksyniwalenol (Romer Labs, Austria);
- Deoksyniwalenol-3-glukozyd (Romer Labs, Austria);
- Deoksyniwalenol (Romer Labs, Austria);
- Diacetoksyscirpenol (Romer Labs, Austria);
- Fumonizyna B<sub>1</sub> (Romer Labs, Austria);
- Fumonizyna B<sub>2</sub> (Romer Labs, Austria);
- Fumonizyna B<sub>3</sub> (Romer Labs, Austria);
- Fuzarenon X (Romer Labs, Austria);
- Gryzeofulwina (Merck, Niemcy);
- Kwas mikofenolowy (Romer Labs, Austria);
- Mewinolina (Merck, Niemcy);
- Monoacetoksyscirpenol (Romer Labs, Austria);
- Neosolaniol (Romer Labs, Austria);
- Niwalenol (Romer Labs, Austria);
- Ochratoksyna A (Romer Labs, Austria);
- Ochratoksyna B (Romer Labs, Austria);
- Patulina (Romer Labs, Austria);
- Rokefortyna C (Merck, Niemcy);
- Sterigmatocystyna (Romer Labs, Austria);
- T-2 tetraol (Romer Labs, Austria);
- T-2 triol (Romer Labs, Austria);
- Toksyna HT-2 (Romer Labs, Austria);
- Toksyna T-2 (Romer Labs, Austria);
- Zearalanon (Romer Labs, Austria);
- Zearalenon (Romer Labs, Austria);

- $\alpha$ -Zearalanol (Romer Labs, Austria);
- $\alpha$ -Zearalenol (Romer Labs, Austria);
- $\beta$ -Zearalanol (Romer Labs, Austria);
- $\beta$ -Zearalenol (Romer Labs, Austria).

### 3.2. Aparatura i wyposażenie

W trakcie wykonywania badań korzystano z niżej wymienionej aparatury pomiarowej i sprzętu laboratoryjnego:

- Chromatograf cieczowy Merck-Hitachi (Niemcy), wyposażony w:
  - ♦ pompę pracującą w układzie gradientowym L-7100;
  - ♦ automatyczny dozownik próbek L-7250;
  - ♦ termostat kolumny chromatograficznej L-7300;
  - ♦ detektor fluorescencyjny L-7480;
  - ♦ KOBRA® CELL - ogniwo elektrochemiczne do derywatywacji aflatoksyn B<sub>1</sub> i G<sub>1</sub>;
  - ♦ komputer z oprogramowaniem do zbierania i obróbki danych z użyciem oprogramowania D-7000 HSM 4.1;
- Chromatograf cieczowy Merck-Hitachi LaChrome Elite (Niemcy), wyposażony w:
  - ♦ pompę pracującą w układzie gradientowym L-2130;
  - ♦ automatyczny dozownik próbek L-2200;
  - ♦ termostat kolumny chromatograficznej L-2300;
  - ♦ detektor fluorescencyjny L-2480;
  - ♦ komputer z oprogramowaniem do zbierania i obróbki danych z użyciem oprogramowania EZChrome Elite 3.1.1;
- Chromatograf cieczowy Nexera (Shimadzu, Japonia) sprzężony z tandemowym spektrometrem mas API 4000 (Sciex, USA) z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI), wyposażony w:
  - ♦ pompę pracującą w układzie gradientowym LC-30AD;
  - ♦ automatyczny dozownik próbek SIL-30AC;
  - ♦ termostat kolumny chromatograficznej CTO-20AC;
  - ♦ komputer z oprogramowaniem do zbierania i obróbki danych z użyciem oprogramowania Analyst 1.6.2;
- Homogenizator nożowy DIAX 900 (Heidolph, Niemcy);
- Kolumna chromatograficzna z wypełnieniem oktadecylowym (Gemini-NX-C18; 150x4 mm; 3 $\mu$ m; Phenomenex, USA) z prekolumną;

- Kolumna chromatograficzna z wypełnieniem oktadecylowym (LiChrospher 100 RP-18; 250x4,6mm; 5µm; Merck, Niemcy) z prekolumną;
- Lodówki (4°C) i zamrażarki (-20°C)
- Łaźnia ultradźwiękowa (Ultron, Polska);
- Mieszadło Reax Control (Heidolph, Niemcy);
- Miniwirówka laboratoryjna Minispin plus (Eppendorf, Niemcy);
- Młyn ultraodśrodkowy ZM200 (Retsch, Niemcy);
- Pipety tłokowe, o zakresach 20-200 µl; 100-1000 µl i 0,5-5 ml (Brand, Niemcy);
- Probówki typu Falcon 15 ml i 50 ml oraz typu Eppendorf 2ml (Eppendorf, Niemcy);
- Waga analityczna Adventurer Pro o dokładności odczytu 0,01g (Ohaus, Szwajcaria);
- Waga analityczna Voyager o dokładności odczytu 0,0001g (Ohaus, Szwajcaria);
- Wirówka laboratoryjna z chłodzeniem 5430R (Eppendorf, Niemcy);
- Wytrząsarka laboratoryjna Promax 1020 (Heidolph, Niemcy);
- Wytrząsarka Multi Reax (Heidolph, Niemcy);
- Zestaw do ekstrakcji do fazy stałej (Merck, Niemcy);
- Zestaw do odparowywania w strumieniu azotu z kontrolowaną temperaturą (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 3.3. Metody

W trakcie badań opracowano i wykorzystano metody analityczne oparte na technikach ekstrakcji ciała stałe-ciecz lub ciecz-ciecz. Do oczyszczania ekstraktów zastosowano technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE, z ang. *solid-phase extraction*) z wykorzystaniem m.in. kolumnienek powinowactwa immunologicznego oraz kolumnienek wypełnionych materiałem jonowymiennym na bazie krzemionki. Do oznaczenia mikotoksyn w oczyszczonych ekstraktach zastosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS) lub z detektorem fluorescencyjnym (HPLC-FLD).

#### 3.3.1. Metodyka oznaczania aflatoksyn w surowcach i paszach

Do 25 g próbki dodano 2,5 g chlorku sodu oraz 50 ml roztworu metanol/woda (80:20, v/v), a następnie całość homogenizowano przez 1 min. Ekstrakt przesączono na sączku karbowanym i 10 ml przefiltrowanego ekstraktu dodano do 40 ml wody destylowanej i wymieszano. Rozcieńczony ekstrakt przefiltrowano przez sączek drobnowłóknisty, a następnie 10 ml (1,0 g próbki) rozcieńczonego ekstraktu przepuszczono przez kolumnę AflaTest® (Vicom, USA) z szybkością 1-2 kropeł na sekundę. Po przejściu ekstraktu przez kolumnę przetłoczono powietrze oraz 2x10 ml wody

destylowanej. Toksyny eluowano 1 ml metanolu. Eluat zebrano do szklanej fiołki. Następnie do eluatu dodano 1 ml wody destylowanej i całość wymieszano.

Aflatoksyny oznaczano za pomocą techniki HPLC z detekcją fluorescencyjną. HPLC: pompa L-7100, automatyczny dozownik próbek L-7250, termostat kolumny L-7300, detektor fluorescencyjny L-7480 (Merck-Hitachi, Niemcy); kolumna chromatograficzna: LiChrospher 100 RP-18 (250x4mm, 5 $\mu$ m); faza ruchoma: acetonitryl/metanol/woda (20:20:60, v/v/v) + 119 mg bromku potasu + 100  $\mu$ l 65% kwasu azotowego (V); derywatywacja aflatoksyn została przeprowadzona przy wykorzystaniu KOBRA<sup>®</sup> CELL; długość fali wzbudzenia: 362 nm; długość fali emisji: 425 nm; szybkość przepływu: 1 ml/min; objętość nstrzyku: 50 $\mu$ l.

### **3.3.2. Metodyka oznaczania ochratoksyny A w zielonej kawie, surowcach i paszach**

Do 12,5 g próbki dodano 50 ml roztworu acetonitryl/woda (60:40, v/v). Próbkę homogenizowano przez 2 min. Ekstrakt przesączono na sączku karbowanym i 5 ml przefiltrowanego ekstraktu rozcieńczono przez dodanie 55 ml buforu PBS. Następnie wymieszany, rozcieńczony ekstrakt filtrowano przez sączek drobnowłóknisty. 48 ml rozcieńzonego ekstraktu przepuszczono przez kolumnę Ochraprep<sup>®</sup> (R-Biopharm, Niemcy) z szybkością 1-2 kropeł na sekundę. Po przejściu ekstraktu przez kolumnę przetłoczono powietrze, a następnie 20 ml wody destylowanej. Toksynę eluowano 1,5 ml mieszaniny metanol/kwas octowy (98:2, v/v). Eluat zebrano do szklanej fiołki. Następnie przez kolumnę przepuszczono 1,5 ml wody destylowanej i połączono z eluatem. Całość została wymieszana.

Oznaczanie ochratoksyny A wykonano metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną. HPLC LaChrom Elite: pompa L-2130, automatyczny dozownik próbek L-2200, termostat kolumny L-2300, detektor fluorescencyjny L-2480 (Merck-Hitachi, Niemcy); kolumna chromatograficzna: LiChrospher 100 RP-18 (250x4mm, 5 $\mu$ m); faza ruchoma: acetonitryl/2% kwas octowy (70:30, v/v), długość fali wzbudzenia: 330 nm; długość fali emisji: 460 nm; szybkość przepływu: 1 ml/min; objętość nstrzyku: 50 $\mu$ l.

### **3.3.3. Metodyka oznaczania ochratoksyny A w piwie**

Przed oczyszczeniem próbka została odgazowana, a jej pH zostało doprowadzone do wartości 7,2 za pomocą 1M wodorotlenku sodu. Następnie 30 ml zubożonej próbki przepuszczono przez kolumnę Ochraprep<sup>®</sup> (R-Biopharm, Niemcy) z szybkością 2-3 ml/min. Po przejściu ekstraktu przez kolumnę przetłoczono powietrze, a następnie przemyto ją 20 ml wody destylowanej. OTA została wymyta przy użyciu 2 ml mieszaniny metanol/kwas octowy (98:2, v/v). Eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu w 40°C, a następnie rozpuszczono w 1 ml roztworu woda/metanol/kwas octowy (50:49:1, v/v/v).

Oznaczanie ochratoksyny A wykonano metodą HPLC opisaną w podrozdziale 3.3.2.



### **3.3.4. Metodyka oznaczania ochratoksyny A w płynie ustrojowym**

Do 1 ml surowicy dodano 5 ml mieszaniny 0,2 M chlorku magnezu i 0,1 M kwasu solnego (1:1, v/v) i całość mieszano przez 1 min. Następnie dodano 3 ml chloroformu, całość wytrząsano przez 30 min i wirowano przy 5000 obr/min przez 20 min w 4°C. Fazę organiczną odparowano do sucha w strumieniu azotu w 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 0,25 ml metanolu oraz dodano 2 ml buforu fosforanowego. Całość przepuszczono przez kolumnę Ochraprep® (R-Biopharm, Niemcy) z szybkością 1-2 kropeł na sekundę. Po przejściu ekstraktu przez kolumnę przetłoczono powietrze, a następnie 20 ml wody destylowanej. Toksynę powoli eluowano z kolumny za pomocą 1 ml mieszaniny metanol/kwas octowy (98:2, v/v) i 1 ml wody destylowanej. Eluat zebrano do szklanej fiolki. Całość została wymieszana.

Oznaczanie ochratoksyny A wykonano metodą HPLC opisaną w podrozdziale 3.3.2.

### **3.3.5. Metodyka oznaczania cytryniny w zielonej kawie**

Do 10 g próbki dodano 50 ml roztworu metanol/woda (70:30, v/v). Próbkę homogenizowano przez 1 min i przesączono na sączku karbowanym. Następnie 1 ml przefiltrowanego ekstraktu rozcieńczono przez dodanie 49 ml 0,01 M roztworu kwasu fosforowego o pH=7,5. Wymieszany i rozcieńczony ekstrakt filtrowano przez sączek drobnowłóknisty. Następnie 10 ml rozcieńczonego ekstraktu przepuszczono przez kolumnę CitriTest™ (Vicam, USA) z szybkością 1-2 kropeł na sekundę. Po przejściu ekstraktu przez kolumnę przetłoczono powietrze, a następnie przepłukano ją 5 ml 0,01M roztworu kwasu fosforowego o pH=7,5. Cytryninę eluowano 1 ml roztworu metanol/0,01M kwas fosforowy (pH=2,5) (70:30, v/v). Eluat zebrano do szklanej fiolki. Następnie przez kolumnę przepuszczono 1,5 ml wody destylowanej i połączono z eluatem. Całość została wymieszana.

Oznaczanie cytryniny wykonano metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną. HPLC LaChrom Elite: pompa L-2130, automatyczny dozownik próbek L-2200, termostat kolumny L-2300, detektor fluorescencyjny L-2480 (Merck-Hitachi, Niemcy); kolumna chromatograficzna: LiChrospher 100 RP-18 (250x4mm, 5µm); faza ruchoma: metanol/octan etylu/0,6M kwas fosforowy (55:10:35, v/v/v); długość fali wzbudzenia: 340 nm; długość fali emisji: 495 nm; szybkość przepływu: 1 ml/min; objętość nasyty: 50µl.

### **3.3.6. Metodyka oznaczania trichotecen i zearalenonu w zielonej kawie, surowcach i paszach**

Do 12,5 g próbki dodano 50 ml acetonitryl/woda (80:20, v/v). Próbkę homogenizowano 3 minuty, następnie przesączono na sączku karbowanym. Do 4 ml przesączu dodano 40 µl roztworu <sup>13</sup>C<sub>18</sub>-ZEN (c=1000 ng/ml) i całość naniesiono na kolumnienkę BondElut Mycotoxin (Agilent, USA). Pobrano 2 ml oczyszczonego ekstraktu, a następnie dodano do niego 50 µl mieszaniny <sup>13</sup>C<sub>15</sub>-DON (c=2500 ng/ml),

$^{13}\text{C}_{24}$ -T-2 (c=250 ng/ml) oraz  $^{13}\text{C}_{22}$ -HT-2 (c=250 ng/ml). Próbkę osuszono w strumieniu azotu w 40°C, a następnie rozpuszczono w 495 µl roztworu metanol/woda (1:4, v/v).

Oznaczanie trichotecen i zearalenonu wykonano metodą HPLC-MS/MS. HPLC: Nexera (Shimadzu, Japonia); spektrometr mas: API 4000 (Sciex, USA); kolumna chromatograficzna: Gemini-NX-C18 (150x4.6mm, 3 µm) (Phenomenex, USA); fazy ruchome: A - 1% kwas octowy w wodzie + 5mM octan amonu, B - 1% kwas octowy w metanolu + 5mM octan amonu; program gradientowy: 0-0,5 min 30% fazy B, 0,5-6 min 90% fazy B, 6-10 min 90% fazy B, 10-15 min 30 % fazy B (równoważenie kolumny); szybkość przepływu: 0,7 ml/min; objętość nastrzyku: 7µl. W metodzie HPLC-MS/MS zastosowano elektrorozpylanie (ESI, ang. *electrospray ionization*) jako sposób jonizacji analitów oraz tryb obserwowania wielu reakcji fragmentacji (MRM, ang. *Multiple Reaction Monitoring*) zarówno w polaryzacji ujemnej, jak i dodatniej, z następującymi parametrami pracy spektrometru: gaz kolizyjny 6 psi, gaz osłonowy (CUR) 25 psi, gaz wspomagający rozpylanie (GS1) 50 psi, gaz pomocniczy (GS2) 50 psi, napięcie jonizacji 5000V (tryb dodatni) i -4000V (tryb ujemny), temperatura źródła jonów 500°C. Dla każdego analitu w trybie MRM monitorowano po dwie reakcje fragmentacji. Zoptymalizowane parametry MS/MS zależne od analitu przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Parametry detekcji trichotecen i zearalenonu w tandemowym spektrometrze mas

Analit	Jon macierzysty (m/z)	Potencjał rozgrupowania klastrów (V)	Jony potomne <sup>a</sup> (m/z)	Energia kolizji (V)	Potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń (V)
3-Acetylo-deoksyniwalenol	397,1	-50	307,0/59,0	-18/-42	-7/-1
Deoksyniwalenol	355,1	-35	264,8/58,9	-20/-38	-17/-1
$^{13}\text{C}_{15}$ -Deoksyniwalenol	370,2	-50	310,0	-14	-7
Diacetoksyscirpenol	384,1	51	307,0/247,0	17/19	20/16
Monoacetoksyscirpenol	342,1	46	265,0/107,1	13/19	18/6
Niwalenol	371,1	-40	281,0/59,0	-22/-40	-14/-5
Toksyna HT-2	442,2	51	215,0 /263,0	19/17	14/18
$^{13}\text{C}_{22}$ - Toksyna HT-2	464,1	51	278,1	17	18
Toksyna T-2	484,1	61	215,0/185,0	25/29	14/12
$^{13}\text{C}_{24}$ - Toksyna T-2	508,3	61	322,1	19	9
Zearalenone	317,1	-85	130,8/174,9	-40/-32	-7/-9
$^{13}\text{C}_{18}$ - Zearalenone	335,1	-100	139,9	-42	-7

<sup>a</sup> kolejność jon ilościowy/jon jakościowy

### 3.3.7. Metodyka oznaczania trichotecen i zearalenonu w piwie

Przed oczyszczeniem próbka została odgazowana, a jej pH zostało doprowadzone do wartości 7,2 za pomocą 1M wodorotlenku sodu. Następnie 4 ml próbki było wytrząsane z 16 ml acetonitrylu, 0,5 g

Celite® 545 oraz z 20 µl wzorca wewnętrznego <sup>13</sup>C<sub>18</sub>-ZEN (c=1000 ng/ml) przez 20 min. Po odwirowaniu (7000 obr/min, 10 min) do 5 ml supernatantu zostało dodane 50 µl mieszaniny wzorców wewnętrznych <sup>13</sup>C<sub>15</sub>-DON (c=2500 ng/ml), <sup>13</sup>C<sub>24</sub>-T-2 (c=250 ng/ml) oraz <sup>13</sup>C<sub>22</sub>-HT-2 (c=250 ng/ml). Próbkę osuszono w strumieniu azotu w 40°C, a następnie rozpuszczono w 0,5 ml roztworu metanol/woda (1:4, v/v).

Oznaczanie trichotecen i zearalenonu wykonano metodą HPLC opisaną w podrozdziale 3.3.6.

### **3.3.8. Metodyka oznaczania fumonizyn surowcach i paszach**

Do 10 g próbki dodano 40 ml mieszaniny metanol/acetonytryl/woda (25:25:50, v/v/v) i homogenizowano całość przez 3 min. Ekstrakt przesączono, a przesącz doprowadzono do wartości pH =7,0 za pomocą 1M wodorotlenku sodu. Do 6 ml ekstraktu dodano 24 ml roztworu metanol/woda (75:25, v/v) i całość przefiltrowano na sączku drobnowiątkowym. Następnie 20ml przefiltrowanego ekstraktu przepuszczono przez kondycjonowaną kolumnę MultiSep® 211 Fum (Romer Labs, Austria). Kolumnę przemyto 8 ml metanol/woda (75:25, v/v) i 3 ml metanolu. Fumonizyny eluowano 10 ml mieszaniny etanol/kwas octowy (99:1, v/v). Eluat zebrano do fiołki, a następnie całość odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed analizą próbkę rozpuszczono w 1 ml roztworu acetonytryl/woda (1:1, v/v).

Oznaczanie fumonizyn wykonano metodą HPLC-MS/MS. HPLC: Nexera (Shimadzu, Japonia); spektrometr mas: API 4000 (Sciex, USA); kolumna chromatograficzna: Gemini-NX-C18 (150x4.6mm, 3 µm) (Phenomenex, USA); fazy ruchome: A - 1% kwas octowy w wodzie + 5mM octan amonu, B - 1% kwas octowy w metanolu + 5mM octan amonu; program gradientowy: 0-0,5 min 40% fazy B, 0,5-5 min 90% fazy B, 5-8 min 90% fazy B, 8-12 min 40 % fazy B (równoważenie kolumny); szybkość przepływu: 0,5 ml/min; objętość nastrzyku: 7µl. W metodzie HPLC-MS/MS zastosowano elektrorozpylanie jako sposób jonizacji analitów oraz tryb MRM w polaryzacji dodatniej, z następującymi parametrami pracy spektrometru: gaz kolizyjny 6 psi, gaz osłonowy (CUR) 25 psi, gaz wspomagający rozpylanie (GS1) 30 psi, gaz pomocniczy (GS2) 50 psi, napięcie jonizacji 4500V, temperatura źródła jonów 500°C. Dla każdego analitu monitorowano po dwie reakcje fragmentacji. Zoptymalizowane parametry MS/MS zależne od analitu przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Parametry detekcji fumonizyn w tandemowym spektrometrze mas

Analit	Jon macierzysty (m/z)	Potencjał rozgrupowania klastrów (V)	Jony potomne <sup>a</sup> (m/z)	Energia kolizji (V)	Potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń (V)
Fumonizyna B <sub>1</sub>	722,4	111	352,3/334,4	51/57	24/20
Fumonizyna B <sub>2</sub> /B <sub>3</sub>	706,3	81	336,3/318,3	53/55	22/20

<sup>a</sup> kolejność jon ilościowy/jon jakościowy

### 3.3.9. Wielokładnikowa metoda oznaczania mikotoksyn w materiale roślinnym

Do 5 g próbki dodano 20 ml mieszaniny acetonitryl/woda/kwas octowy (79:20:1, v/v/v) i homogenizowano całość przez 3 min. Ekstrakt przesączono na sączku karbowanym i rozcieńczono w stosunku 1:1 z wodą. Następnie całość wymieszano, odwirowano (14000 obr/min, 30min), przeniesiono do fiolki autosamplera i poddano oznaczeniu z wykorzystaniem HPLC-MS/MS.

Oznaczanie mikotoksyn wykonano metodą HPLC-MS/MS. HPLC: Nexera (Shimadzu, Japonia); spektrometr mas: API 4000 (Sciex, USA); kolumna chromatograficzna: Gemini-NX-C18 (150x4.6mm, 3 µm) (Phenomenex, USA); fazy ruchome: A - 1% kwas octowy w wodzie + 5mM octan amonu, B - 1% kwas octowy w metanolu + 5mM octan amonu; program gradientowy: 0-2 min 10% fazy B, 2-14 min 97% fazy B, 14-16 min 97% fazy B, 16-20 min 10 % fazy B (równoważenie kolumny); szybkość przepływu: 0,75 ml/min; objętość nastrzyku: 7µl. W metodzie HPLC-MS/MS zastosowano elektrorozpylanie jako sposób jonizacji analitów oraz tryb zaplanowanego obserwowania wielu reakcji fragmentacji (sMRM, ang. *scheduled Multiple Reaction Monitoring*) dla polaryzacji ujemnej oraz dodatkowo w dwóch oddzielnych przebiegach chromatograficznych, z następującymi parametrami pracy spektrometru: gaz kolizyjny 6 psi, gaz osłonowy (CUR) 20 psi, gaz wspomagający rozpylanie (GS1) 50 psi, gaz pomocniczy (GS2) 50 psi, napięcie jonizacji 4500V (tryb dodatni) i -4000V (tryb ujemny), temperatura źródła jonów 500°C. Dla każdego analitu w trybie sMRM (okno wykrywania analitu 60 s, czas skanowania 1 s) monitorowano po dwie reakcje fragmentacji. Zoptymalizowane parametry MS/MS zależne od analitu przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Parametry pracy układu MS/MS dla analitów w metodzie wielokładnikowej

Analit	Czas retencji (min)	Jon macierzysty (m/z)	Potencjał rozgru-powania klastrów (V)	Jony potomne <sup>a</sup> (m/z)	Energia kolizji (V)	Potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń (V)
15-Acetylo-deoksyniwalenol	10,1	356.1	41	321.0/137.1	19/21	22/8
3-Acetylo-deoksyniwalenol	10,2	339.2	71	231.1/230.1	17/21	16/14
Aflatoksyna B <sub>1</sub>	11,8	313.1	106	285.1/128.1	33/93	20/8
Aflatoksyna B <sub>2</sub>	11,5	315.1	106	287.1/259.0	37/41	20/18
Aflatoksyna G <sub>1</sub>	11,1	329.1	96	242.9/200.1	37/57	16/14
Aflatoksyna G <sub>2</sub>	10,7	331.0	76	189.0/245.1	45/59	12/13
Aflatoksyna M <sub>1</sub>	10,7	329.0	71	273.1/259.0	33/33	18/18
Deepoksy-deoksyniwalenol	8,9	339.1	-50	249.2/59.0	-16/-34	-15/-10
Deoksyniwalenol	7,5	355.1	-55	265.0/59.0	-22/-38	-11/-10
Deoksyniwalenol-3-glukozyd	7,3	517.2	-70	427.1/457.2	-28/-20	-9/-11
Diacetoksycirpenol	11,8	384.2	51	307.0/247.0	17/21	20/16
Fumonizyna B <sub>1</sub>	12,5	722.4	116	334.9/352.3	57/51	10/10
Fumonizyna B <sub>2</sub>	13,8	706.4	121	336.4/318.3	51/55	10/10
Fumonizyna B <sub>3</sub>	13,2	706.4	121	336.4/318.3	51/55	10/10
Fuzarenon X	8,7	413.1	-35	263.1/186.9	-22/-36	-10/-11
Gryzeofulwina	12,9	353.1	71	165.0/215.1	29/29	10/14
Kwas mikofenolowy	13,4	321.1	66/36	207.0/303.0	29/15	14/20
Mewinolina	15,7	405.2	81	285.1/199.1	17/17	20/12
Monoacetoksycirpenol	10,8	342.2	41	265.1/107.1	13/21	18/6
Neosolaniol	9,0	400.2	51	185.1/245.1	29/17	12/16
Niwalenol	5,7	371.1	-60	281.0/59.0	-22/-38	-5/-1
Ochratoksyna A	14,3	404.1	61	239.0/358.1	33/21	16/10
Ochratoksyna B	13,5	370.1	61	205.0/187.1	29/49	14/12
Patulina	5,8	152.9	-55	108.9/81.0	-12/-16	-5/-3
Rokefortyna C	12,2	390.2	81	193.0/322.0	39/29	12/22
Sterigmatocystyna	14,6	325.0	86	309.8/280.9	35/49	22/18
T-2 Tetraol	5,8	316.2	56	215.0/281.1	13/13	14/20
T-2 Triol	12,1	400.2	36	215.2/233.1	17/13	14/16
Toksyna HT-2	12,9	442.2	61	215.1/263.0	19/19	14/18
Toksyna T-2	13,6	484.2	56	215.0/305.1	29/21	14/8
Zearalanon	14,2	319.0	-115	204.8/161.0	-32/-38	-13/-9
Zearalenon	14,4	317.1	-110	131.0/174.9	-40/-34	-7/-11
α-Zearalanol	14,0	321.1	-110	277.0/303.1	-30/-30	-5/-7
α-Zearalenol	14,2	319.0	-110	159.8/173.9	-42/-36	-11/-11
β-Zearalanol	13,3	321.1	-110	277.0/303.1	-30/-30	-5/-7
β-Zearalenol	13,6	319.0	-110	159.8/173.9	-42/-36	-11/-11

<sup>a</sup> kolejność jon ilościowy/jon jakościowy

## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1. Opracowanie metod badawczych oznaczania mikotoksyn

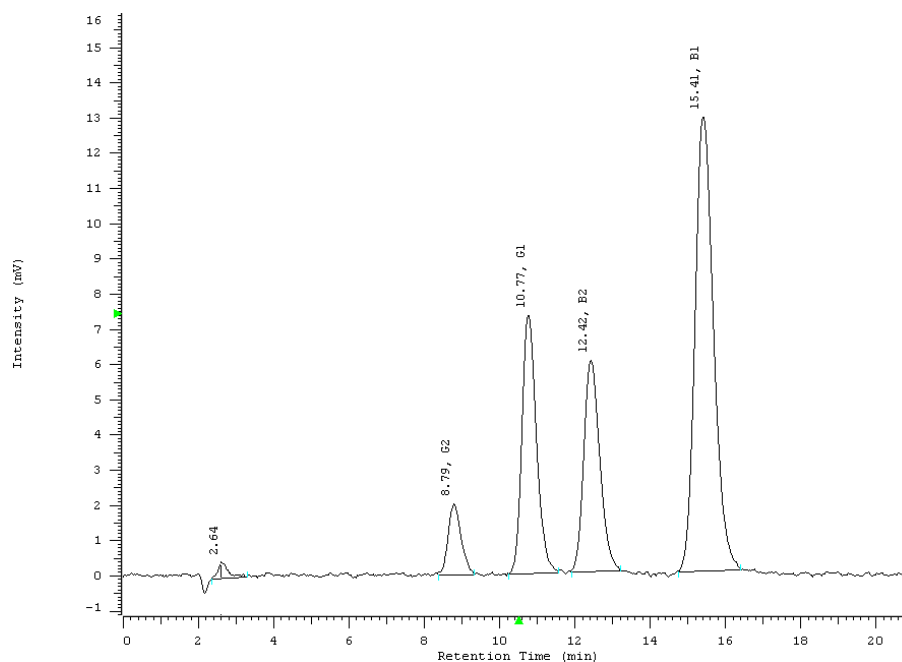
W trakcie badań zastosowano kilka metod badawczych opartych na ekstrakcji ciało stałe-ciecz lub ciecz-ciecz, a następnie na oczyszczeniu ekstraktów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE - ang. *solid-phase extraction*) z wykorzystaniem m.in. kolumnienek powinowactwa immunologicznego i kolumnienek wypełnionych materiałem jonowymiennym na bazie krzemionki. Do oznaczania mikotoksyn zastosowano technikę chromatografii cieczowej z detekcją spektrometrii mas lub fluorescencyjną. W celu wyznaczenia dokładności oraz precyzji metod, wykonano badania odzysków, stosując próbki ślepe odpowiadające badanym matrycom.

Do ekstrakcji aflatoksyn z próbek surowców paszowych i pasz (publikacja D1) zastosowano mieszaninę metanol/woda (80:20, v/v), a ekstrakt został oczyszczony na kolumnienkach powinowactwa immunologicznego AflaTest. Uzyskane wartości odzysków (Tabela 6) mieściły się w przedziale 73-89% i spełniały kryteria skuteczności metod dla aflatoksyn (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 519/2014).

Tabela 6. Parametry walidacyjne metodyki oznaczania aflatoksyn w surowcach i produktach roślinnych

	Granica wykrywalności (µg/kg)	Granica oznaczalności (µg/kg)	Dodatek wzorca (µg/kg)	Kukurydza i pasze		Zboża	
				Odzysk (%)	Precyzja (%)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
AFB <sub>1</sub>	0,05	0,15	5,0	80	8	77	5
AFB <sub>2</sub>	0,02	0,06	1,25	85	8	89	7
AFG <sub>1</sub>	0,25	0,75	5,0	81	7	78	3
AFG <sub>2</sub>	0,08	0,24	1,25	83	3	73	7

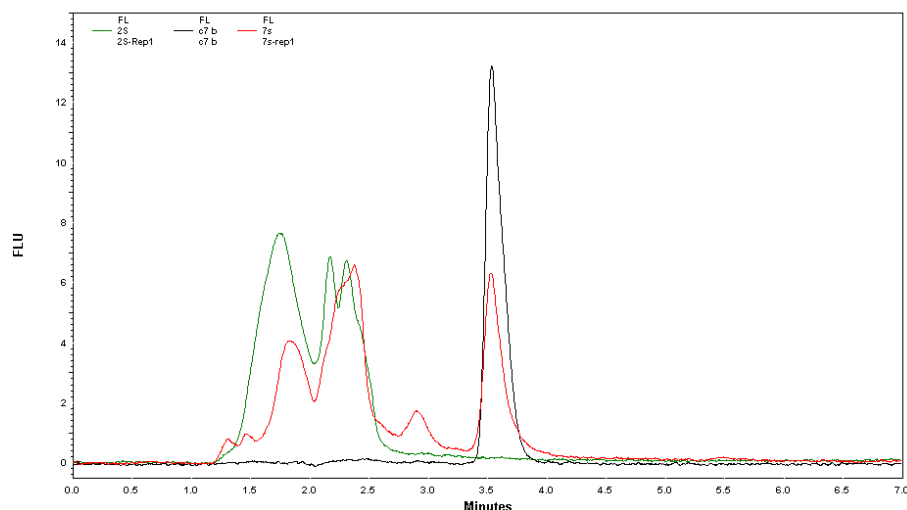
Zastosowanie kolumny chromatograficznej z wypełnieniem oktadecylowym - LiChrospher 100 RP-18, a także elucji izokratycznej z trójskładnikową fazą ruchomą pozwoliło na optymalne rozdzielanie analitów do linii bazowej. Szybkość przepływu fazy ruchomej (1ml/min) została wybrana jako optymalna dla dobrego rozdzielania pików, z jednoczesnym najkrótszym czasem analizy. Otrzymane piki były ostre i symetryczne, a w oknie czasowym retencji wszystkich analitów nie zaobserwowano dodatkowych pików pochodzących od innych związków, co potwierdza dobrą selektywność zastosowanej metody. Kolejność elucji aflatoksyn z kolumny chromatograficznej była uwarunkowana polarnością ich cząsteczek. Czasy retencji analitów wynosiły: 8,8min; 10,8 min; 12,4 min; 15,4 min, odpowiednio dla AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>; AFB<sub>1</sub> (Rys. 10).



Rysunek 10. Chromatogram mieszaniny wzorców aflatoksyn: AFG<sub>2</sub> (0,5 ng/ml), AFG<sub>1</sub> (2 ng/ml), AFB<sub>2</sub> (0,5 ng/ml) i AFB<sub>1</sub> (2 ng/ml)

Arroyo-Manzanares i in. (2019) do ekstrakcji AF z próbek paszy dla świń wykorzystali acetonitryl. Ekstrakty, z pominięciem etapu oczyszczenia, zostały poddane analizie z wykorzystaniem techniki HPLC-FLD. Metoda charakteryzowała się dobrą liniowością ( $R^2 > 0,99$ ), wysokimi wartościami odzysków (81 – 105%), z względnymi odchyleniami standardowymi powtarzalności i precyzji pośredniej poniżej 10%. W badaniach AF w kiszonkach dla krów, Rodríguez-Blanco i in. (2021) do ekstrakcji zastosowali mieszaninę acetonitryl/woda (9:1, v/v), a następnie rozcieńczone ekstrakty zostały oczyszczone przy użyciu kolumnienek powinowactwa immunologicznego i poddane analizie HPLC-FLD. Zastosowana procedura badawcza pozwoliła na uzyskanie dla wszystkich analitów wartości granic wykrywalności (LOD) na poziomie 0,05 - 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , wielkości odzysków wahały się od 70% dla AFG<sub>1</sub> do 97% dla AFB<sub>2</sub>, przy wartościach powtarzalności poniżej 22%. Kabak (2012) zastosował technikę HPLC-FLD do oznaczania AF w próbkach żywności na bazie zbóż. Zastosowana na etapie ekstrakcji mieszanina metanol/woda (8:2, v/v) w połączeniu z oczyszczeniem ekstraktu na kolumnienkach powinowactwa immunologicznego pozwoliło na uzyskanie wartości odzysków w przedziale 84 – 92%, powtarzalności poniżej 9% oraz odtwarzalności poniżej 12%.

Ochratoksyna A w żywności i paszach była oznaczana przy pomocy procedury opartej na ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem kolumnienek powinowactwa immunologicznego Ochraprep i chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (publikacje D1-D2 i D5) (Rys. 11).



Rysunek 11. Chromatogramy ochratoksyny A: czarny - substancja wzorcowa (15 ng/ml); czerwony – próbka zielonej kawy (7,5 ng/g); zielony – próbka zielonej kawy bez OTA

Zastosowanie mieszaniny acetonitryl/woda (60:40, v/v), a następnie selektywnych kolumniek powinowactwa immunologicznego pozwoliło uzyskanie zadawalających wartości odzysków dla badanych matryc (Tabela 7).

Tabela 7. Parametry walidacyjne procedury oznaczania ochratoksyny A w surowcach roślinnych i produktach

	Granica wykrywalności (µg/kg)	Granica oznaczalności (µg/kg)	Dodatek wzorca (µg/kg)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
<b>Kukurydza i pasze</b>				96	2
<b>Zboża</b>	0,1	0,4	1,0	90	6
<b>Zielona kawa</b>				84	5

Pleadin i in. (2017) zastosowali test ELISA do oznaczenia OTA w surowcach i produktach na bazie zbóż. Ekstrakcja została wykonana z użyciem 0,13M buforu wodorowęglanowego o pH=8,1. Procedura charakteryzowała się wartością granicy oznaczalności (LOQ) wynoszącą 1,8 µg/kg, co w zestawieniu z obowiązującymi normami UE jest poziomem wysokim, przekraczającym wartości NDP, np. w przypadku żywności dla niemowląt i małych dzieci (NDP = 0,5 µg/kg). Wartości odzysków mieściły się w granicach 88 – 93%, podczas gdy powtarzalności między 6% a 7%. Należy również zwrócić uwagę na możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, z wartościami 44% dla ochratoksyny C i 14% dla ochratoksyny B. W innych badaniach OTA była ekstrahowana z próbek żywności pochodzenia roślinnego (m.in. zboża, przyprawy, kawa) mieszaniną acetonitryl/woda (60:40, v/v), a z próbek pochodzenia zwierzęcego (m.in. nerki, mięso, kielbasa) w pierwszym etapie za pomocą zakwaszonego chloroformu, a w drugim przy pomocy ekstrakcji ciec-ciecz z fazy chloroformowej za pomocą wodorowęglanu sodu (Skarkova i in., 2013). W kolejnym kroku ekstrakty były oczyszczone na



kolumnkach powinowactwa immunologicznego i poddane analizie techniką HPLC-FLD. Metoda charakteryzowała się wartościami LOQ wynoszącymi 0,2 µg/kg dla próbek pochodzenia roślinnego i 0,3 µg/kg dla próbek pochodzenia zwierzęcego, natomiast wartości odzysków w zależności od matrycy wahały się od 82 do 85% (próbki roślinne) oraz 80 – 88% (próbki zwierzęce), przy powtarzalności 1 – 3% (próbki roślinne) oraz 4 – 6% (próbki zwierzęce). Ali i in. (2010) do oczyszczenia ekstraktów z pszenicy zastosowali polimery z nadrukiem cząsteczkowym. Uzyskane wartości odzysków były w zakresie 83% do 103%, przy powtarzalności poniżej 5%.

Próbki piwa po odgazowaniu, a następnie zobojętnieniu roztworem wodorotlenku sodu zostały bezpośrednio naniesione na kolumnki powinowactwa immunologicznego Ochrarep (publikacja D4). Zastosowanie tej dość szybkiej procedury przygotowania próbek do oznaczania pozwoliło na uzyskanie dobrych wartości odzysków, między 80% a 86% w zależności od wartości dodatku wzorca (Tabela 8).

Tabela 8. Parametry walidacyjne metody oznaczania ochratoksyny A w piwie

	Granica wykrywalności (µg/L)	Granica oznaczalności (µg/L)	Dodatek wzorca (µg/L)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
<b>Ochratoksyna A</b>	0,003	0,011	0,05	82	3
			0,25	80	6
			1,00	86	4

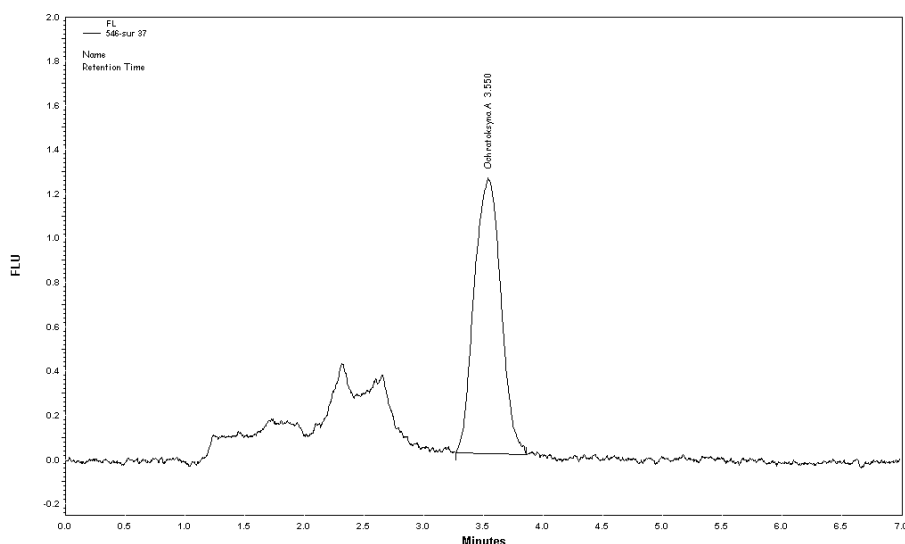
W badaniach Tangni i in. (2002) próbki piwa były rozcieńczane roztworem wodorowęglanu sodu i buforem PBS, a następnie oczyszczane na kolumnkach powinowactwa immunologicznego i oznaczane techniką HPLC-FLD. Zastosowana procedura badawcza pozwoliła na uzyskanie LOD i LOQ na poziomie, odpowiednio: 3 ng/L i 10 ng/L. Wartości odzysków na trzech poziomach stężeń mieściły się od 96% do 99%, przy powtarzalności metody poniżej 4%. Medina i in. (2005) do ekstrakcji OTA z piwa zastosowali roztwór hydroksyoctanu ołowiu, a następnie chloroform, który finalnie po odparowaniu został zastąpiony mieszaniną acetonitryl/woda (4:6, v/v). Metoda charakteryzowała się dobrą liniowością ( $R^2 > 0,999$ ), odzyskami na poziomie 91-100% z względnymi odchyleniami standardowymi (powtarzalność) poniżej 7%. W kolejnych badaniach, Medina i in. (2006) do ekstrakcji wykorzystali wodny roztwór amoniaku (celem zalkalizowania próbki i przez to wytrącenia m.in. białek), octan cynku (usunięcie barwników z próbki bez wpływu na poziom analitu) oraz octan etylu (jako mniej szkodliwy dla środowiska niż chloroform). Przygotowane ekstrakty były oczyszczane na kolumnkach z wypełnieniem krzemionkowym i analizowane techniką HPLC-FLD. Autorzy w badaniu uzyskali wartości odzysków 81-88%, przy powtarzalności poniżej 8%.

Dla płynów ustrojowych (surowica) w pierwszym etapie wykonano ekstrakcję ciecz-ciecz z wykorzystaniem zakwaszonego 0,1M chlorku magnezu oraz chloroformu. Zastosowanie w drugim etapie kolumnienek powinowactwa immunologicznego Ochraprep do oczyszczenia ekstraktów pozwoliło na uzyskanie chromatogramów, na których nie były widoczne w pobliżu OTA piki zakłócające (publikacja D6). Wyznaczenie stężenia OTA przeprowadzono z wykorzystaniem sześciopunktowej krzywej wzorcowej, której stężenia mieściły się w zakresie roboczym (0,1-5,0 ng/ml). Odzyski i precyzję metody, wyrażoną jako powtarzalność, określono analizując próbki ślepe surowicy (wolne od OTA), wzbogacone analitem na trzech poziomach stężeń. Granice wykrywalności i oznaczalności obliczono jako stosunek sygnału do szumu wynoszący odpowiednio 3 i 10 (Tabela 9).

Tabela 9. Parametry walidacyjne procedury oznaczania ochratoksyny A w surowicy

	Granica wykrywalności (ng/ml)	Granica oznaczalności (ng/ml)	Dodatek wzorca (ng/ml)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
<b>Ochratoksyna A</b>	0,03	0,10	0,20	93	3
			0,50	95	1
			2,00	97	1

Zastosowanie kolumny chromatograficznej z wypełnieniem oktadecylowym - LiChrospher 100 RP-18, a także elucji izokratycznej z dwuskładnikową fazą ruchomą pozwoliło uzyskanie czasu retencji ochratoksyny A wynoszącego 3,5 min. Uzyskany pik był ostry i symetryczny, a w oknie czasowym retencji nie zaobserwowano dodatkowych pików pochodzących od innych związków (Rys. 12).



Rysunek 12. Chromatogram wykonany metodą HPLC-FLD próbki surowicy zawierającej ochratoksynę A w stężeniu 2,3 ng/ml

Ghali i in. (2008) zastosowali technikę HPLC-FLD do oznaczenia OTA w surowicy. Zakwaszona kwasem octowym próbka była oczyszczana na kolumnienkach wypełnionych złożem C18. Metoda

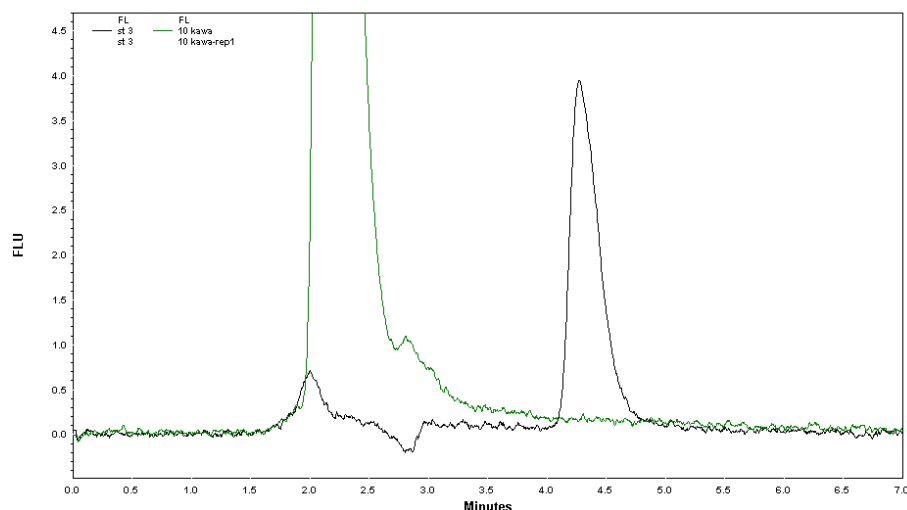
analityczna charakteryzowała się dobrą liniowością ( $r = 0,998$ ) w zakresie 0,25-8 ng/ml z granicą oznaczalności na poziomie 0,2 ng/ml. Dla próbek surowicy wzbogaconej OTA na poziomie 0,5 ng/ml i 2 ng/ml odzyski wynosiły odpowiednio około 72% (powtarzalność 3%) i 70% (powtarzalność 1%). W innych badaniach, Malir i in. (2019) zastosowali do oczyszczenia zakwaszonych próbek surowicy kolumnienki powinowactwa immunologicznego, a analiza OTA została przeprowadzona techniką HPLC-FLD. Zastosowana procedura badawcza pozwoliła na uzyskanie wartości LOQ na poziomie 0,1 ng/ml, zakres liniowości metody wynosił 0,125-4000 ng/ml, a wielkości odzysków wahały się od 82% do 86%, przy wartościach powtarzalności poniżej 5%. Osteresch i in. (2016) wykrywali OTA oraz produkt jej termicznej degradacji 2'R-OTA w wysuszonych kroplach krwi (DBS, ang. *dreid blood spots*) za pomocą techniki HPLC-MS/MS. Zastosowanie procedury DBS w porównaniu z tradycyjnym pobieraniem krwi pozwala na: mniej inwazyjne uzyskanie próbek (wystarczy nakłucie palca), uproszczone ich przygotowanie do analizy oraz łatwiejsze przechowywanie i transport. Wartości granic oznaczalności dla obu analitów były takie same i wynosiły 0,013 ng/ml dla roztworów wzorcowych w czystym rozpuszczalniku i 0,021 ng/ml dla wzorców w matrycy. Współczynniki odzysku dla stężeń od 0,05 ng/ml do 1 ng/ml mieściły się w zakresie od 101% do 105% dla OTA i 99% do 105% dla 2'R-OTA.

Analiza żywności (zielona kawa i suplementy zawierające jej wyciąg) w kierunku cytryniny była realizowana przy pomocy procedury opartej na ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem kolumnienek powinowactwa immunologicznego CitriTest, a następnie oznaczeniu CIT za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (publikacja D5). Zastosowanie mieszaniny metanol/woda (70:30, v/v), a następnie selektywnych kolumnienek powinowactwa immunologicznego pozwoliło uzyskanie wartości odzysków na poziomie między 74% a 77% (Tabela 10).

Tabela 10. Parametry walidacyjne metody oznaczania cytryniny w zielonej kawie

	Granica wykrywalności (µg/kg)	Granica oznaczalności (µg/kg)	Dodatek wzorca (µg/kg)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
<b>Cytrynina</b>	0,60	2,00	5,0	74	5
			15,0	77	4

Zastosowanie kolumny chromatograficznej z wypełnieniem oktadecylowym - LiChrospher 100 RP-18, izokratycznej trójskładnikowej fazy ruchomej, złożonej z metanolu, octanu etylu i kwasu fosforowego, a także szybkości przepływu fazy ruchomej wynoszącego 1ml/min pozwoliło na uzyskanie czasu retencji analitu wynoszącego 4,3 min oraz skutkowało brakiem występowania w podobnym czasie pików innych związków obecnych w matrycy (Rys. 13).



Rysunek 13. Chromatogramy cytryniny: czarny - substancja wzorcowa (25 ng/ml); zielony – próbka zielonej kawy wolna od cytryniny

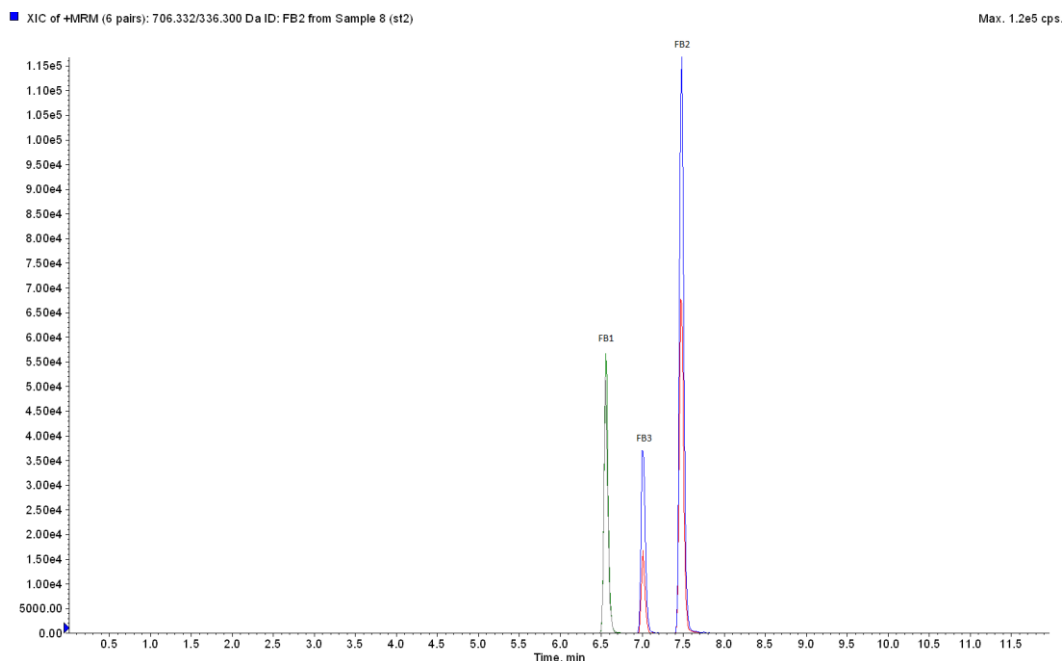
Fang i in. (2016) do ekstrakcji cytryniny z ryżu, pszenicy i octu ryżowego zastosowali mieszaninę acetonitryl/izopropanol/woda (35:10:55, v/v/v, pH = 1,5). Ekstrakty oczyszczono na kolumnkach wypełnionych złożem C18 i poddano analizie techniką HPLC-FLD. Najwyższe wartości odzysków uzyskano dla octu ryżowego (89-90%, powtarzalność poniżej 8%), natomiast najniższe dla próbek pszenicy (84-90%, powtarzalność poniżej 8%). W innym badaniu, Appell i in. (2015) do ekstrakcji cytryniny z kukurydzy wykorzystali mieszaninę metanol/woda (70:30, v/v), następnie ekstrakty były oczyszczone z zastosowaniem kolumnek wypełnionych polimerem z nadrukiem cząsteczkowym. Uzyskane wartości odzysków mieściły w zakresie 82-92%, przy powtarzalności 4-15%. Zastosowanie techniki HPLC-FLD do oznaczania cytryniny pozwoliło na uzyskanie wartości LOQ wynoszącej 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Mieszaninę metanol/woda (70:30, v/v) podczas ekstrakcji cytryniny z próbek czerwonego ryżu drożdżowego oraz roślin o właściwościach leczniczych zastosowali również Li i in. (2012). Zastosowanie oczyszczenia ekstraktów na kolumnkach powinowactwa immunologicznego w połączeniu z analizą HPLC-FLD pozwoliło na uzyskanie wartości odzysków na poziomie 85-89% (powtarzalność 3-6%) dla czerwonego ryżu drożdżowego, 73-89% (powtarzalność 2-8%) dla produktów z czerwonego ryżu drożdżowego oraz 79-89% (powtarzalność 1-5%) dla próbek żeń-szenia amerykańskiego. Granice wykrywalności i oznaczalności metody wynosiły odpowiednio: 0,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Fumonizyny w surowcach roślinnych i paszach były izolowane przy pomocy procedury wykorzystującej ekstrakcję do fazy stałej z zastosowaniem kolumnek MultiSep 221, a następnie oznaczane za pomocą techniki HPLC-MS/MS (publikacja D1). Zastosowanie spektrometrii mas jako metody detekcji pozwoliło na wyeliminowanie etapu derywatywacji przedkolumnowej analitów za pomocą aldehydu o-ftalowego, niezbędnej w oznaczaniu techniką HPLC-FLD (Sforza i in., 2006).

Zastosowanie podczas etapu ekstrakcji mieszaniny acetonitryl/metanol/woda (1:1:2, v/v/v) wraz z oczyszczeniem ekstraktów na kolumnkach wypełnionych odpowiednią kombinacją sorbentów pozwoliło na uzyskanie wartości odzysków (Tabela 11) mieszczących się w przedziale 94-100% (precyzja  $\leq 5\%$ ) i spełnienie kryteriów skuteczności metody dla fumonizyn (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 519/2014). Wykorzystanie w badaniach kolumny chromatograficznej z wypełnieniem oktadecylowym – Gemini-NX-C18 wraz z elucją gradientową pozwoliło na optymalne rozdzielanie analitów do linii bazowej. W przypadku oznaczania fumonizyn, ze względu na obecność w ich cząsteczkach grup karboksylowych, dobór odpowiedniego pH fazy ruchomej ma kluczowe znaczenie. Zastosowanie dodatku kwasu octowego w stężeniu 1% pozwoliło na uzyskanie ostrych i symetrycznych pików, a w oknie czasowym retencji wszystkich analitów nie zaobserwowano dodatkowych pików pochodzących od innych związków. Czasy retencji analitów wynosiły: 6,6min; 7,5 min; i 7,0 min, odpowiednio dla FB<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub> i FB<sub>3</sub> (Rys. 14).

Tabela 11. Parametry walidacyjne metodyki oznaczania fumonizyn w kukurydzy i paszach

	Granica wykrywalności (µg/kg)	Granica oznaczalności (µg/kg)	Dodatek wzorca (µg/kg)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
Fumonizyna B <sub>1</sub>	1,5	5,0	1000	100	4
Fumonizyna B <sub>2</sub>	1,5	5,0	1000	95	3
Fumonizyna B <sub>3</sub>	1,5	5,0	500	94	5



Rysunek 14. Chromatogram mieszaniny wzorców fumonizyn: FB<sub>1</sub> (500 ng/ml), FB<sub>2</sub> (502 ng/ml), FB<sub>3</sub> (251 ng/ml)

Munawar i in. (2019) do oznaczania FB<sub>1</sub> w próbkach kukurydzy zastosowali test płytkowy oparty na polimerze z nadrukiem cząsteczkowym. Przed oznaczeniem próbki były ekstrahowane mieszaniną

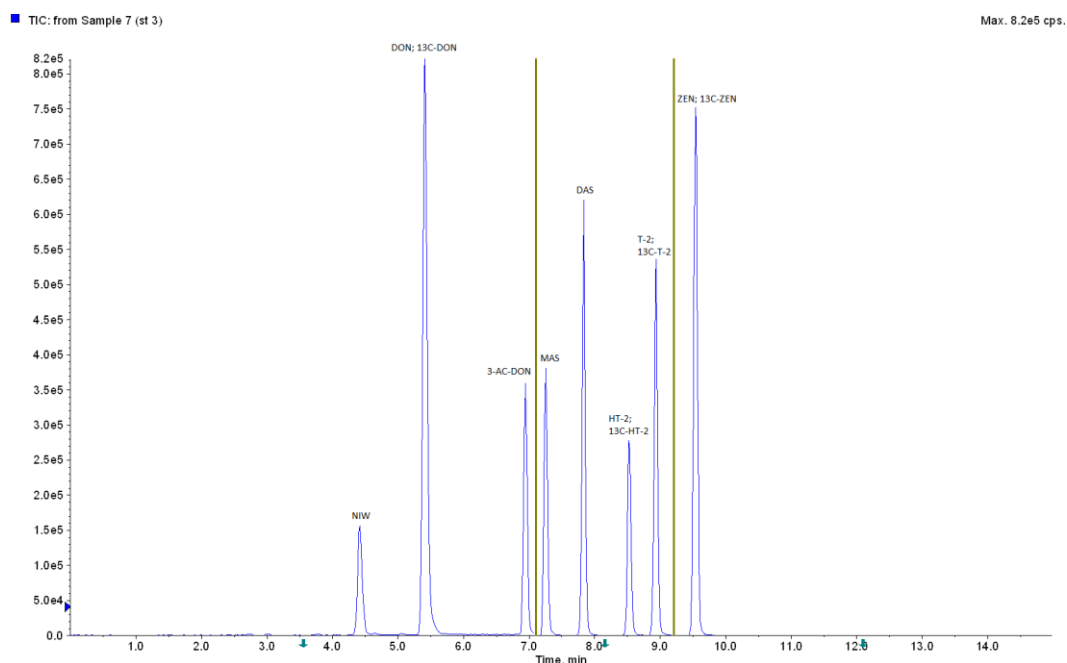
metanol/woda (70:30, v/v) i rozcieńczane roztworem PBS. W przeciwieństwie do testów płytkowych ELISA (opartych na przeciwciałach) autorzy nie stwierdzili występowania reakcji krzyżowych między polimerem a innymi mikotoksynami, m.in. FB<sub>2</sub>, AFB<sub>1</sub> i ZEN. Zaproponowana procedura charakteryzowała się niską granicą wykrywalności (1 µg/kg), wartościami odzysków 108-113% oraz wysoką precyzją (poniżej 0,5%). W innych badaniach Kaltner i in. (2017) zastosowali technikę HPLC-FLD do oznaczania fumonizyn w próbkach kukurydzy i produktów kukurydzianych. Anality były ekstrahowane z próbki mieszaniną acetonitryl/metanol/woda (1:1:2, v/v/v), a po rozcieńczeniu ekstrakty zostały oczyszczone na kolumnkach wypełnionych silnym wymiennikiem anionowym. Granice wykrywalności dla FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub> wyniosły odpowiednio 29,2 i 17,5 µg/kg i były znacznie wyższe od wartości uzyskanych w badaniach własnych. Uzyskane odzyski dla procedury analitycznej wahały się od 79,4% do 94,5% dla FB<sub>1</sub> (powtarzalność 4-5%; odtwarzalność 16-17%) i od 79,9% do 98,0% dla FB<sub>2</sub> (powtarzalność 6%, odtwarzalność 15-17%). De Matos i in (2021) zastosowali technikę LC-MS/MS do oznaczenia fumonizyn w kukurydzy i produktach kukurydzianych. Próbki były ekstrahowane mieszaniną acetonitryl/woda/kwas mrówkowy (75:24:1, v/v/v). Po rozcieńczeniu ekstrakty zostały poddane analizie chromatograficznej. Autorzy w opracowanej procedurze uzyskali zadawalające wartości odzysków dla oznaczanych analitów (97-110% dla FB<sub>1</sub>; 94-109% dla FB<sub>2</sub>) przy powtarzalności poniżej 7% dla FB<sub>1</sub> i poniżej 5% dla FB<sub>2</sub>. Procedura charakteryzowała się granicami wykrywalności od 0,4 µg/kg do 2 µg/kg dla FB<sub>1</sub> i od 0,2 µg/kg do 1,4 µg/kg dla FB<sub>2</sub>. Zanotowano natomiast znaczny wpływ matrycy na sygnał pomiarowy skutkujący jego wzmocnieniem w zakresach od +11% do +45% dla FB<sub>1</sub> i od +17 do +74% dla FB<sub>2</sub>.

Trichoteceny i zearalenon w surowcach roślinnych i paszach były oznaczane przy pomocy procedury opartej na ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem kolumnek wypełnionych materiałem jonowymiennym na bazie krzemionki i chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas jako metodą detekcji (publikacje D1-D2). Granice oznaczalności mieściły się w przedziale od 0,2 µg/kg dla ZEN do 3,0 µg/kg dla DON, niwalenolu (NIW) i 3-Ac-DON (Tabela 12). Zastosowane na etapie oczyszczania ekstraktów kolumnki BondElut Mycotoxin (Agilent) pozwoliły na uzyskanie wartości odzysków od 75% dla NIW do 113% dla ZEN dla kukurydzy i pasz, a dla zbóż drobnoziarnistych natomiast mieściły się w przedziale od 75% (NIW) do 110% (ZEN). Należy zauważyć, że niższe wartości odzysków uzyskiwane były dla analitów o większej polarności. Użycie kolumnek wymagało również zastosowania wzorców wewnętrznych, ponieważ w wyniku adsorpcji na złożu sorbenta wiązało się około 50% zearalenonu. Wartości współczynnika zmienności (powtarzalności) metody były małe i wahały się między 2% dla DON w zbożach do 8% dla ZEN w kukurydzy i paszach. Zastosowana w badaniach metoda chromatograficzna pozwoliła na oznaczenie głównych trichotecen grupy A, grupy B, a także ZEN w jednym przebiegu (Rysunek 15).

Wykorzystanie kolumny chromatograficznej Gemini-NX-C18 wraz z elucją gradientową opartą o mieszaninę metanol/woda (z dodatkiem kwasu octowego i octanu amonu) wykazało, że w pierwszej kolejności kolumnę opuszczają trichoteceny grupy B, później trichoteceny grupy A, a na końcu zearalenon. Dzięki temu możliwa była zmiana polaryzacji pracy spektrometru, z ujemnej dla trichotecen grupy B, na dodatnią dla trichotecen grupy A i z powrotem na ujemną dla ZEN i uzyskanie maksymalnych intensywności sygnałów poszczególnych analitów.

Tabela 12. Parametry walidacyjne metodyki oznaczania trichotecen i zearalenonu w surowcach i paszach

	Granica wykrywalności	Granica oznaczalności	Dodatek wzorca	Kukurydza i pasze		Zboża	
	(µg/kg)	(µg/kg)		Odzysk (%)	Precyzja (%)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
<b>DON</b>	1,0	3,0	1000	93	5	90	2
<b>NIW</b>	1,0	3,0	500	75	6	75	4
<b>3-Ac-DON</b>	1,0	3,0	500	90	4	90	7
<b>MAS</b>	0,5	1,5	50	85	7	85	5
<b>DAS</b>	0,3	1,0	50	90	5	90	3
<b>T-2</b>	0,2	0,6	100	88	6	88	3
<b>HT-2</b>	0,7	2,0	100	90	7	82	4
<b>ZEN</b>	0,07	0,2	200	113	8	110	5



Rysunek 15. Chromatogram mieszaniny wzorców trichotecen i zearalenonu: NIW (250 ng/ml), DON (502 ng/ml), 3-Ac-DON (125 ng/ml), MAS (125 ng/ml), DAS (127 ng/ml), HT-2 (251 ng/ml), T-2 (251 ng/ml), ZEN (125 ng/ml)

Stanciu i in. (2019) oznaczali trichoteceny i zearalenon w próbkach pszenicy z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Zastosowanie tej techniki analitycznej wymagało przeprowadzenia analitów w lotne pochodne przy użyciu mieszaniny derywatywującej (N,O-bis(trimetylosililo)acetamid/trimetylochlorosilan/N-trimetylosililoimidazol, 3:2:3). Próbki po ekstrakcji mieszaniną acetonitryl/woda (84:16, v/v), zostały odparowane do sucha w strumieniu azotu, rozpuszczone w mieszaninie metanol/woda (70:30, v/v) i poddane reakcji przeprowadzenia w pochodne. Efekty matrycowe procedury badawczej wahały się od -36% dla ZEN do +37% dla fuzarenonu-X. Zaobserwowano dobrą liniowość metody, z współczynnikami korelacji ( $r^2$ ) powyżej 0,989. Granice oznaczalności analizowanych mikotoksyn charakteryzowały się dużą zmiennością i mieściły się w zakresie od 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (DON) do 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (NIW). Wartości odzysków mieściły się w zakresie od 69% (ZEN) do 127% (DON), z powtarzalnością i odtwarzalnością, odpowiednio poniżej 12% i poniżej 19%. Brak etapu oczyszczania ekstraktów charakteryzował również badania przeprowadzone przez Nathanail i in. (2015), którzy techniką HPLC-MS/MS oznaczali trichoteceny i zearalenon w próbkach zbóż (pszenica, jęczmień i owies). Próbki były ekstrahowane mieszaniną acetonitryl/woda/kwas octowy (79:20:1, v/v/v) i po rozcieńczeniu, poddane analizie chromatograficznej. Uzyskane wartości granicy oznaczalności wahały się od 3,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (DON) do 15,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (3-Ac-DON). Wartości odzysków dla wszystkich analitów wahały się między 90% a 116% w jęczmieniu, 84% i 115% w owsie oraz 93% i 112% w pszenicy. Efekty matrycy wahały się od -41% do +21% dla jęczmienia, -47% do +22% dla owsa i -33% do +23% dla pszenicy. Wartości odtwarzalności metody były stosunkowo wysokie, ale nie przekraczały dla żadnego analitu i matrycy 35% i były poniżej limitu kryteriów skuteczności metod analitycznych ustalonych przez UE (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006). W innych badaniach, Romagnoli i in. (2010) do oczyszczenia ekstraktów próbek płatków śniadaniowych i żywności dla dzieci zastawali kolumnienki powinowactwa immunologicznego (DZT MS-PREP, R-Biopharm) pozwalające na izolację kilku mikotoksyn. Ekstrakcja analitów (DON, T-2, HT-2, ZEN) została przeprowadzona przy użyciu mieszaniny metanol/woda (4:1, v/v), a po oczyszczeniu i odparowaniu, finalnie próbki zostały poddane analizie HPLC-MS/MS. Zastosowana procedura analityczna pozwoliła na uzyskane wartości LOD na poziomie od 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (T-2, HT-2, ZEN) do 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (DON), wielkości odzysków wahały się od 60% dla DON do 100% dla toksyny HT-2, przy wartościach powtarzalności od 2% do 32%. Połączenie powinowactwa przeciwciał do określonych analitów w kolumnienkach oraz selektywności techniki LC-MS/MS pozwoliło na całkowite wyeliminowanie zjawiska efektu matrycy.

Trichoteceny i zearalenon w piwie oznaczane były przy wykorzystaniu prostego przygotowania próbek, obejmującego odgazowanie, wytrącenie związków przeszkadzających obecnych w matrycy oraz rekonstrukcję wysuszonej próbki w rozpuszczalniku (publikacja D4). Procedura analityczna



charakteryzowała się wartościami odzysków między 95% dla DON, a 119% dla toksyny HT-2, z powtarzalnością poniżej 5% (Tabela 13). Badania dla próbek bez i z dodatkiem wzorców wewnętrznych wykazały, znaczne różnice w wartościach odzysku. Aby spełnić kryteria skuteczności metody analitycznej ustanowione przez UE dla urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w żywności, koniecznym było zastosowanie w procedurze znakowanych izotopowo wzorców wewnętrznych mikotoksyn. Znaczące różnice w wartościach odzysku, bez (35-72%) i z (95-116%) wzorcem wewnętrznym, potwierdziły złożoność piwa jako matrycy mającej znaczny wpływ na obniżanie sygnału analitów, zwłaszcza gdy zastosowana procedura oczyszczania próbki nie jest wysoce selektywna. Ekstrakcja z wykorzystaniem acetonitrylu prowadziła do wytrącenia polarnych składników matrycy i mogła również spowodować wytrącenie polarnych analitów, a tym samym zmniejszyć ich odzysk. Niskie wartości odzysku obserwowane w przypadku ZEN można przypisać silnemu osłabieniu sygnału pomiarowego spowodowanego koeluującą niepolarną matrycą.

Tabela 13. Parametry walidacyjne procedury oznaczania trichotecen i zearalenonu w piwie

	Granica wykrywalności (µg/l)	Granica oznaczalności (µg/l)	Dodatek wzorca (µg/l)	Odzysk (%)	Precyzja (%)
<b>Deoksyniwalenol</b>	3,5	11,6	40	95	3
			200	95	1
			400	95	4
<b>Niwalenol</b>	4,3	14,3	40	102	5
			200	101	2
			400	102	1
<b>Diacetoksyscirpenol</b>	0,28	0,92	8	109	4
			40	110	3
			80	106	4
<b>Toksyna T-2</b>	0,31	1,03	8	117	4
			40	112	3
			80	116	1
<b>Toksyna HT-2</b>	0,36	1,21	8	114	5
			40	119	3
			80	116	1
<b>Zearalanon</b>	0,07	0,23	4	104	3
			20	104	3
			40	106	3

Yoshinari i in. (2014) oznaczali trichoteceny (DON, T-2, HT-2) oraz zearalenon w próbkach piwa stosując technikę HPLC-MS/MS. W celu oczyszczenia, próbki bezpośrednio po odgazowaniu były przepuszczane przez kolumnienki powinowactwa immunologicznego DZT MS-PREP (R-Biopharm).

Wartości granic oznaczalności zastosowanej procedury analitycznej wahały się od 0,03 µg/kg (T-2) do 0,5 µg/kg (DON), natomiast wartości odzysków DON, T-2, HT-2 i ZEN mieściły się w przedziałach, odpowiednio 88-89%; 91-102%; 88-95% i 87-88% (przy powtarzalności poniżej 3%). W innym badaniu Rodríguez-Carrasco i in. (2015) przygotowali próbki piwa do oznaczenia trichotecen i ZEN techniką GC-MS/MS, stosując procedurę QuEChERS (szybka, prosta, tania, efektywna, elastyczna, bezpieczna, ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*). Po odgazowaniu próbki były ekstrahowane acetonitrylem, następnie przeprowadzono wysalanie fazy wodnej za pomocą bezwodnego siarczanu (VI) magnezu i chlorku sodu. Oczyszczanie ekstraktów wykonano wykorzystując dyspersyjną ekstrakcję do fazy stałej (d-SPE) z użyciem sypkiego żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami oktadecylowym. Zastosowanie techniki GC-MS/MS wymagało przeprowadzenia analitów w lotne pochodne z wykorzystaniem mieszaniny derywatyzującej (N,O-bis(trimetylosililo)acetamid/ trimetylochlorosilan/ N-trimetylosililoimidazol, 3:2:3). Procedura badawcza charakteryzowała się dobrą liniowością, z współczynnikami korelacji ( $r^2$ ) powyżej 0,995. Najniższą granicę oznaczalności wyznaczono dla DON (0,1 µg/L), podczas gdy dla pozostałych analitów były one o rząd wielkości wyższe i wynosiły od 1 µg/L dla NIW do 16 µg/L dla ZEN. Wartości odzysków mieściły się w zakresie od 69% (ZEN) do 109% (T-2), z powtarzalnością i odtwarzalnością, odpowiednio poniżej 12% i poniżej 15%. Efekty matrycowe wahały się od -48% dla HT-2 do -21% dla NIW. Bryła i in. (2018) oznaczali DON, DON-3-G i NIW w próbkach piwa stosując technikę HPLC-UV. Odgazowane próbki w celu oczyszczenia były przepuszczane przez kolumnę powinowactwa immunologicznego DON-NIV WB (Vicam). Metoda analityczna charakteryzowała się dobrą liniowością, z współczynnikiem korelacji ( $r^2$ ) powyżej 0,993. Uzyskane przez autorów wartości granic oznaczalności mieściły się w przedziale od 2,1 µg/L dla NIW do 6,2 µg/L dla DON-3-G. W badaniach uzyskano zadowalające wartości odzysków, wynoszące w zależności od poziomu wzbogacenia próbki oraz analitu od 81,3% do 109,7%, a także powtarzalności – wahające się od 1,9% do 8,9%.

Wykorzystana w badaniach żółędzi wieloskładnikowa metoda LC-MS/MS oznaczania 36 mikotoksyn (publikacja D3), oparta jest na podejściu „rozcieńcz i dozuj” (ang. *dilute-and-shoot*), zaproponowanym wcześniej przez Sulyok i in. (2006). Próbki po ekstrakcji mieszaniną acetonitryl/woda/kwas octowy (79:20:1, v/v/v), zostały rozcieńczone i bezpośrednio poddane analizie chromatograficznej. Granice wykrywalności procedury analitycznej (Tabela 14) wynosiły od 0,2 µg/kg (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, gryzeofulwina, mewinolina, neosolaniol, OTA, OTB) do 10,8 µg/kg (DON-3-G, T-2 Tetraol), stanowiąc wartości znacznie niższe od poziomów zawartych w przepisach i propozycjach UE dotyczących NDP mikotoksyn w paszach, odnoszących się do aflatoksyn, ochratoksyny A, trichotecen, fumonizyn i zearalenonu (Tabela 2). Zastosowana procedura charakteryzowała się wysokimi wartościami odzysków wynoszącymi od 67% (FB<sub>2</sub>) do 98%

(ochratoksyna B), przy wartościach powtarzalności poniżej 14%. Uzyskane wartości odzysków oraz powtarzalności w odniesieniu do aflatoksyn, ochratoksyny A, patuliny, deoksyniwalenolu, zearalenonu, fumonizyn, toksyn T-2 i HT-2, spełniają kryteria metod analitycznych zawartych w Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 519/2014. Ekstrakcja mikotoksyn z próbek o złożonej matrycy, jakimi są materiały roślinne, za pomocą rozpuszczalników organicznych często prowadzi do wystąpienia problemów analitycznych (efekty matrycy) związanych z współekstrakcją niepożądanych składników matrycy. Efekty matrycy mogą wpływać na wydajność jonizacji mikotoksyn, prowadząc do tłumienia lub wzmacniania sygnału w LC-MS/MS. W zastosowanej metodzie oznaczania mikotoksyn w żołądździach zaobserwowano zarówno osłabienie sygnału (-24% dla ZAN, -23% dla  $\alpha$ -zearalanolu i  $\beta$ -zearalenolu), jak i jego wzmocnienie (+14% dla ochratoksyny B, +13% dla sterigmatocystyny). Ze względu na dużą liczbę analitów, w celu uzyskania ich optymalnych parametrów jonizacji, oznaczenie wykonano techniką LC-MS/MS zarówno w trybie jonizacji dodatniej jak i ujemnej w dwóch oddzielnych przebiegach chromatograficznych (Rysunek 16). Dla każdego analitu wybrano polaryzację, w której otrzymano najbardziej intensywny sygnał, drugi produkt jonowy był monitorowany w celu potwierdzenia tożsamości. Dodanie do fazy ruchomej octanu amonu było konieczne by zahamować tworzenie stabilnych adduktów z jonami sodu (obecny w rozpuszczalnikach i naczyniach szklanych), które nie dają dość intensywnych jonów potomnych dla aflatoksyn i trichotecen z grupy A. Zastosowanie spektrometrii mas pozwoliło na uzyskanie co najmniej czterech punktów identyfikacyjnych (czas retencji, masa cząsteczkowa oraz charakterystyczne jony potomne), które są wymogiem potwierdzenia analitów zawartym w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808. Zastosowana kolumna chromatograficzna Gemini-NX-C18 pozwoliła na uzyskanie zadawalających kształtów pików, które były symetryczne i ostre, dla wszystkich analitów, mimo ich chemicznej różnorodności. Rozcieńczenie próbki po ekstrakcji wodą znacznie obniżyło zawartość acetonitrylu w próbce, co wpłynęło pozytywnie na kształt pików analitów o najkrótszych czasach retencji (NIW, T-2 Tetraol).

Tabela 14. Parametry walidacyjne procedury oznaczania mikotoksyn w surowcach roślinnych (żółędzie)

	Granica wykrywalności (µg/kg)	Dodatek wzorca (µg/kg)	Odzysk (%)	Precyzja (%)	Efekty matrycy (%)
15-Acetylo-deoksyniwalenol	2,0	111	88	10	87
3-Acetylo-deoksyniwalenol	2,0	107	91	4	89
Aflatoksyna B <sub>1</sub>	0,2	10,7	84	5	80
Aflatoksyna B <sub>2</sub>	0,2	2,67	87	12	89
Aflatoksyna G <sub>1</sub>	0,3	10,8	85	6	82
Aflatoksyna G <sub>2</sub>	0,3	2,68	76	6	82
Aflatoksyna M <sub>1</sub>	0,2	2,69	76	7	83
Deepoksy-deoksyniwalenol	8,4	55,8	77	14	81
Deoksyniwalenol	5,4	106	91	8	85
Deoksyniwalenol-3-glukozyd	10,8	54,8	81	11	87
Diacetoksyscirpenol	0,8	107	91	6	97
Fumonizyna B <sub>1</sub>	1,3	270	68	14	105
Fumonizyna B <sub>2</sub>	0,9	270	67	12	106
Fumonizyna B <sub>3</sub>	1,1	78,2	68	10	103
Fuzarenon X	9,6	106	82	9	80
Gryzeofulwina	0,2	79,7	88	8	91
Kwas mikofenolowy	0,5	81,5	95	6	110
Mewinolina	0,2	79,7	91	7	107
Monoacetoksyscirpenol	0,3	63,4	91	8	92
Neosolaniol	0,2	74,0	89	4	97
Niwalenol	9,0	107	80	9	84
Ochratoksyna A	0,2	66,5	92	5	99
Ochratoksyna B	0,2	54,8	98	5	114
Patulina	2,1	135	87	12	88
Rokefortyna C	0,5	117	83	4	82
Sterigmatocystyna	0,5	33,7	95	3	113
T-2 Tetraol	10,8	74,1	85	6	100
T-2 Triol	0,8	74,0	93	3	95
Toksyna HT-2	0,7	107	84	6	96
Toksyna T-2	0,3	106	91	4	93
Zearalanon	0,9	15,1	79	4	76
Zearalenon	0,4	107	86	5	79
α-Zearalanol	4,0	15,8	86	10	77
α-Zearalenol	2,0	16,2	92	2	78
β-Zearalanol	1,9	15,7	82	7	78
β-Zearalenol	2,9	15,7	80	3	77



wysalania fazy wodnej przy pomocy siarczanu (VI) magnezu i chlorku sodu, ekstrakty zostały oczyszczone z użyciem modyfikowanego grupami oktadecylowym żelu krzemionkowego. Oznaczanie techniką GC-MS/MS wymagało przeprowadzenia analitów w lotne pochodne przy zastosowaniu mieszaniny N,O-bis(trimetylosililo)acetamid/trimetylochlorosilan/N-trimetylosililoimidazol (3:2:3). Uzyskane przez autorów granice oznaczalności wahały się od 0,1 µg/kg (enniatyna A<sub>1</sub>) do 225,5 µg/kg (3-Ac-DON). Wartości odzysków mieściły się w zakresie od 58% (enniatyna A) do 138% (bowerycyna), z powtarzalnością i odtwarzalnością, odpowiednio poniżej 16% i poniżej 20%. Średnie efekty matrycowe wahały się od -39% dla NIW i alternariolu do +33% dla ZEN. Metoda QuEChERS została również zastosowana w badaniach Zachariasova i in. (2014), którzy oznaczali 56 mikotoksyn (produkowanych przez grzyby *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Claviceps*) w surowcach roślinnych i paszach. Anality, po dodaniu do próbek 2-procentowego kwasu mrówkowego były ekstrahowane acetonitrylem. Po wysoleniu fazy wodnej przy użyciu chlorku sodu i siarczanu (VI) magnezu ekstrakty zostały oczyszczone z wykorzystaniem techniki dSPE, z użyciem sypkiego żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami oktadecylowymi jako sorbentu. Finalnie anality zostały oznaczone techniką LC-MS/MS. Wartości odzysków analitów obliczone przy zastosowaniu krzywej kalibracyjnej sporządzonej w oparciu o matrycę wzbogaconą w anality wahały się od 62% (enniatyna B) do 115% (fuzarenon-X) dla pszenicy, od 58% (DON-3-G) do 112% (penitrem A) dla paszy dla cieląt oraz od 56% (DON-3-G) do 120% (penitrem A) dla kiszonki z kukurydzy. Niższe wartości odzysków DON-3-G, związane były z jego wyższą polarnością, a tym samym słabym przechodzeniem do warstwy acetonitrylowej podczas ekstrakcji, a w przypadku enniatyn – ich częściową adsorpcją na sorbencie C18 podczas oczyszczania ekstraktów. Powtarzalność pomiarów dla około 70% analitów mieściła się poniżej 6%. Dla większości analitów autorzy odnotowali wzmocnienie intensywności sygnału w wyniku wpływu matrycy. Efekty matrycy dla trichotecen grupy B wahały się od -73% do +164%, dla trichotecen grupy A – od 0 do +97%, dla ZEN i jego pochodnych – od -24% do +76%, dla fumonizyn – od +50% do +224%, dla aflatoksyn – od -38% do +44%, dla OTA od +15% do +36%. Sulyok i in. (2006) do przygotowania próbek surowców roślinnych zaproponowali podejście „rozcieńcz i dozuj”. Autorzy oznaczali 39 mikotoksyn (trichoteceny, ZEN i jego pochodne, fumonizyny, OTA, aflatoksyny, enniatyny, ergotalkaloidy) w próbkach pszenicy i kukurydzy przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS. Próbki były ekstrahowane mieszaniną acetonitryl/woda/kwas octowy (79:20:1, v/v/v), a po rozcieńczeniu były bezpośrednio poddawane analizie chromatograficznej. Uzyskane wartości granicy wykrywalności wahały się od 0,03 µg/kg (enniatyna B) do 220 µg/kg (werrukarol). Wartości odzysków dla wszystkich analitów wahały się między 53% (FB<sub>2</sub>) a 102% (ZEN) w pszenicy oraz 57% (FB<sub>1</sub>) i 110% (AFG<sub>2</sub>) w kukurydzy. Efekty matrycy wahały się od -27% do +40% dla pszenicy i -82% do +57% dla kukurydzy.

## **4.2. Ocena zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w paszach**

### **4.2.1. Przeprowadzenie za pomocą opracowanych metod badawczych oceny występowania mikotoksyn w materiale roślinnym i paszach**

Zarówno człowiek, jak i zwierzęta narażeni są na działanie ksenobiotyków - substancji szkodliwych dla zdrowia. Należą do nich związki naturalnie produkowane m.in. przez rośliny, zanieczyszczenia emitowane do środowiska, pozostałości środków ochrony roślin i leków weterynaryjnych. Jedno ze źródeł ekspozycji stanowią grzyby pleśniowe i produkowane przez nie metabolity wtórne - mikotoksyny. Problem zanieczyszczenia żywności i pasz mikotoksynami ma nie tylko konotacje zdrowotne. Metabolity wtórne pleśni mają znaczący wpływ na gospodarkę, ponieważ powodują straty w pogłowie zwierząt i trudności w prowadzeniu hodowli. Ponadto zgodnie z obowiązującymi uregulowaniami prawnymi, przekroczenie wartości NDP mikotoksyn powoduje, że zawierające je produkty nie mogą być przedmiotem krajowego i międzynarodowego obrotu handlowego (Binder, 2007). W okresie 2011-2014 przeanalizowano łącznie 1384 surowców roślinnych i pasz (295 próbek kukurydzy, 143 próbki kiszzonek z kukurydzy, 466 próbek zbóż drobnoziarnistych oraz 480 próbek pasz pełnoporcjowych dla trzody chlewnej, drobiu i bydła) pod kątem obecności DON, NIW, toksyny T-2, toksyny HT-2, ZEN, FB, OTA i AF (publikacja D1). W 24 badanych próbkach zawartość mikotoksyn przekroczyła poziomy wskazane przez UE (DON w 4 próbkach kiszzonek z kukurydzy, 1 próbce pszenicy oraz 1 próbce paszy pełnoporcjowej; suma toksyn T-2+HT-2 w 3 próbkach kukurydzy, 2 próbkach zbóż oraz 6 próbkach pasz; ZEN w 5 próbkach pasz pełnoporcjowych; OTA w 2 próbkach pasz).

Kukurydza jest jednym z najważniejszych surowców w żywieniu zwierząt. DON oraz ZEN były najczęściej występującymi mikotoksynami w próbkach kukurydzy. Wykryto je odpowiednio w 89% i 92% z 295 próbek (mediana odpowiednio 328  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i 21,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; maksymalna zawartość odpowiednio 6688  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i 521  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). NIW, T-2 i HT-2 były obecne odpowiednio w 77%, 67% i 68% próbek. Fumonizyny, mikotoksyny, które często zanieczyszczają kukurydzę, wykryto w 58% z 83 analizowanych próbek (mediana 15,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; maksymalna zawartość 1885  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Ochratoksynę A wykryto w 12 próbkach (11%), a aflatoksyny tylko w 1 z 45 próbek, w stężeniu zbliżonym do granicy oznaczalności. Łącznie 456 próbek ziarna zbóż (98%) zawierało DON (mediana 129  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; maksymalna zawartość 8187  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Obecność innych trichotecen (NIW, T-2 i HT-2), stwierdzono w około 80% próbek (odpowiednio 84%, 78% i 86%). Zearalenon wykryto w 97% próbek, a jego maksymalna zawartość wynosiła 608  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Fumonizyn nie wykryto w żadnej próbce, natomiast aflatoksyny i ochratoksyna A były obecne odpowiednio w 5% i 28% (OTA: maksymalna zawartość 155  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). DON i ZEN były również najczęściej występującymi mikotoksynami w kiszzonek z kukurydzy (odpowiednio 86% i 88% próbek) z wartościami mediany: 223  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i 15,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i maksymalnymi:

7860 µg/kg i 1133 µg/kg. NIW wykryto w 81% próbek, z medianą 31,6 µg/kg i maksymalną zawartością 549 µg/kg. Trichoteceny A - toksyny T-2 i HT-2 oznaczono odpowiednio w 47% i 73% próbek kiszonek z kukurydzy (maksymalna zawartość odpowiednio 31,2 µg/kg i 204 µg/kg). Ponad połowa próbek (53%) była zanieczyszczona FB, a ich maksymalna zawartość wynosiła 108 µg/kg. OTA wykryto w 36% badanych próbek. Jedna próbka kisonki z kukurydzy była skażona AF. W przypadku pasz pełnoporcjowych, mikotoksyny *Fusarium* były obecne w ponad 90% próbek (za wyjątkiem fumonizyn: 86%). DON i ZEN wykryto w 475 z 480 próbek (99%). Wartość środkowa dla tych mikotoksyn wynosiła odpowiednio 341 µg/kg i 21,7 µg/kg, a stężenia maksymalne odpowiednio 5478 µg/kg i 349 µg/kg. Obecność T-2 i HT-2 stwierdzono w 97% próbek (mediana: 3,83 µg/kg i 9,31 µg/kg; wartość maksymalna: 185 µg/kg i 276 µg/kg). NIW był obecny w 92% próbek pasz (mediana 16,8 µg/kg; maksymalna zawartość 253 µg/kg). OTA i AF wykryto odpowiednio w 69% i 5% próbek pasz pełnoporcjowych (maksymalna zawartość odpowiednio 88 µg/kg i 1,31 µg/kg).

W prezentowanej pracy DON wykryto w 1315 próbkach (95%), a jego maksymalne stężenie wyniosło 8187 µg/kg w próbce pszenicy. Komisja Europejska ustaliła wartość orientacyjną 8000 µg/kg dla DON w materiałach paszowych zbożowych, 12000 µg/kg dla materiałów paszowych z kukurydzy, 5000 µg/kg dla mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych oraz 900 µg/kg dla mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych dla trzody chlewnej (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). W prezentowanych badaniach 6 próbek (1 pszenicy, 1 paszy pełnoporcjowej i 4 próbki kisonki z kukurydzy) wykazały wyższe stężenie DON niż wartości graniczne wskazane przez UE. Nowak i Mueller (2020) przeanalizowali 31 próbek kukurydzy. Stwierdzili, że wszystkie z nich były skażone DON z maksymalnym stężeniem 4068 µg/kg. Kos i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy w latach 2012-2015 w Serbii i wykryli, że 133 z nich były skażone DON o maksymalnym stężeniu 16350 µg/kg. W Niemczech, Schollenberger i in. (2012) przebadali 13 próbek kukurydzy, a DON został wykryty w 54% próbek, przy średnim i maksymalnym stężeniu odpowiednio 809 µg/kg i 3118 µg/kg. W 20% z 74 próbek kukurydzy z Portugalii DON występował w zakresie 100-500 µg/kg (Martins i in., 2008). Zachariasowa i in. (2014) przeanalizowali osiem próbek kukurydzy z Czech i Wielkiej Brytanii i uzyskali średnie i maksymalne stężenia DON na poziomie odpowiednio 624 µg/kg i 1523 µg/kg. W 2016 i 2017 Drakopoulos i in. (2021) przebadali 253 próbki jęczmienia ze Szwajcarii i stwierdzili, że 78% z nich było skażonych DON z maksymalnym stężeniem 5940 µg/kg. Nowak i Mueller (2020) przeanalizowali 33 próbki pszenicy i 29 próbek jęczmienia z Polski. Wykryli, że 91% próbek pszenicy i 66% próbek jęczmienia było zanieczyszczonych DON w stężeniu maksymalnym odpowiednio 10761 µg/kg i 2622 µg/kg. W innych badaniach w Polsce, Bryła i in. (2016) przeanalizowali 99 próbek pszenicy i w 46 wykryli DON w maksymalnym stężeniu 2975 µg/kg. W wyniku analizy 11 próbek kisonki z kukurydzy Zachariasova i in. (2014) ustalili średnie i maksymalne zawartości DON



odpowiednio na poziomie 967 µg/kg i 2950 µg/kg. W Danii Storm i in. (2010) wykazali, że 100% próbek kiszonki z kukurydzy było zanieczyszczone DON, przy średnim i maksymalnym stężeniu odpowiednio 1056 µg/kg i 5094 µg/kg. W innych badaniach Rodríguez-Blanco i in. (2021) przeanalizowali 44 próbki kiszonki kukurydzianej z Hiszpanii w 2018 roku. DON był obecny w sześciu (14%) z nich w średnim stężeniu wynoszącym 338 µg/kg. Den Hollander i in. (2021) przeanalizowali 40 próbek paszy z Belgii i wykryli w 75% z nich DON w maksymalnym stężeniu 751 µg/kg. Arroyo-Manzanares i in. (2019) zbadali 228 próbek paszy z Hiszpanii, DON był obecny w 10 z nich na maksymalnym poziomie 555 µg/kg. We wcześniejszych badaniach pasz w Polsce, Cegielska-Radziejewska i in. (2013) zbadali próbki pasz dla drobiu i wykryli DON wszystkich z nich w zakresie 3,1-99,4 µg/kg (średnia 33,6 µg/kg). W innym badaniu w Polsce, Nowak i Mueller (2020) przeanalizowali 40 próbek pasz i stwierdzili, że wszystkie z nich były skażone DON, a jego maksymalne stężenie wyniosło 3543 µg/kg.

W badaniach własnych NIW był obecny w 1175 próbkach (85%), a maksymalne stężenie (900 µg/kg) stwierdzono w próbce owsa. Najwyższe dopuszczalne poziomy dla tej toksyny nie zostały ustalone przez Komisję Europejską. Janić Hajnal i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy w latach 2012-2015 w Serbii i stwierdzili, że 47 z nich było skażonych NIW w maksymalnym stężeniu 85 µg/kg. W badaniach przeprowadzonych w Niemczech 23% próbek kukurydzy było zanieczyszczonych NIW, ze średnim i maksymalnym stężeniem odpowiednio 3569 µg/kg i 43064 µg/kg (Schollenberger i in., 2012). Zachariasowa i in. (2014) przeanalizowali 8 próbek kukurydzy, w których średnie stężenie NIW wynosiło 153 µg/kg, a maksymalna zawartość 580 µg/kg. W 2016 i 2017 Drakopoulos i in. (2021) zbadali 253 próbki jęczmienia ze Szwajcarii i stwierdzili, że 33% z nich było skażonych NIW z maksymalną zawartością 1670 µg/kg. Zachariasowa i in. (2014) podali, że żadna z 37 próbek zbóż drobnoziarnistych nie zawierała NIW. Eckard i in. (2011) przeanalizowali 19 próbek kiszonek z kukurydzy, a NIW był obecny w 42% z nich, przy średnim stężeniu 219 µg/kg (maksymalna zawartość 760 µg/kg). W 11 próbkach kiszonek z kukurydzy Zachariasova i in. (2014) uzyskali średnie i maksymalne stężenia NIW na poziomie odpowiednio 185 µg/kg i 823 µg/kg. Den Hollander i in. (2021) przeanalizowali 40 próbek pasz z Belgii i stwierdzili w 5% z nich NIW w maksymalnym stężeniu 38 µg/kg. We wcześniejszych badaniach pasz w Polsce Cegielska-Radziejewska i in. (2013) poddali analizie próbki pasz dla drobiu i wykryli zanieczyszczenie NIW w 27% z nich, przy średnim stężeniu 0,9 µg/kg.

W prezentowanej pracy T-2 wykryto w 79% z 1384 próbek, a jej maksymalna zawartość wynosiła 550 µg/kg dla próbki kukurydzy. Komisja Europejska ustaliła orientacyjną wartość sumy toksyn T-2 i HT-2 na 2000 µg/kg dla produktów przemiału owsianego (łuski), 500 µg/kg dla innych produktów zbożowych i 250 µg/kg dla mieszanek paszowych (Zalecenie Komisji nr 2013/165/UE). W badaniach

własnych 11 (0,8%) próbek (3 próbki kukurydzy, 1 jęczmienia, 1 owsa i 6 mieszanek paszy pełnoporcjowej) wykazało wyższe stężenie sumy toksyn T-2 i HT-2 niż wartości wskazane UE. Nowak i Mueller (2020) oznaczyli toksynę T-2 w 76% z 29 próbek kukurydzy z Polski w maksymalnym stężeniu 51 µg/kg. Janić Hajnal i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy w latach 2012-2015 w Serbii i stwierdzili, że 96 z nich było zanieczyszczonych toksyną T-2 w maksymalnym stężeniu 99 µg/kg. W badaniach w Niemczech Schollenberger i in. (2012) wykryli, że 23% z 13 próbek kukurydzy było zanieczyszczonych T-2 o średniej zawartości 36 µg/kg (maksymalnie 429 µg/kg). W 2016 i 2017 Drakopoulos i in. (2021) przeanalizowali 253 próbki jęczmienia ze Szwajcarii i stwierdzili, że 8% z nich było skażonych toksyną T-2 z maksymalnym stężeniem 39 µg/kg. Nowak i Mueller (2020) przeanalizowali 17 próbek pszenicy i 15 próbek jęczmienia z Polski. Stwierdzili, że 71% próbek pszenicy i wszystkie próbki jęczmienia były skażone toksyną T-2 w maksymalnym stężeniu odpowiednio 20 µg/kg i 58 µg/kg. W innym badaniu w Polsce Bryła i in. (2016) przebadali 99 próbek pszenicy i wykryli w 41 z nich toksynę T-2 w maksymalnym stężeniu 22 µg/kg. W Danii Storm i in. (2010) przeanalizowali 20 próbek kiszzonek z kukurydzy, a w 1 (5%) próbce była obecna toksyna T-2 w stężeniu 2 µg/kg. W innych badaniach Zachariasova i in. (2014) nie wykryli toksyny T-2 w żadnej z 11 próbek kiszzonek z kukurydzy. W 37% z 19 próbek kiszzonek z kukurydzy ze Szwajcarii stwierdzono obecność T-2 w średnim stężeniu 13,3 µg/kg (Eckard i in., 2011). Den Hollander i in. (2021) przeanalizowali 40 próbek paszy z Belgii i oznaczyli w 5% z nich toksynę T-2 w maksymalnym stężeniu 13 µg/kg. Arroyo-Manzanares i in. (2019) zbadali 228 próbek paszy z Hiszpanii i stwierdzili w dwóch z nich toksynę T-2 w maksymalnym stężeniu 35,9 µg/kg. W 1 na 70 próbek pasz dla drobiu i trzody chlewnej T-2 wykryto w stężeniu 15 µg/kg (Zachariasova i in., 2014). W Polsce Cegielska-Radziejewska i in. (2013) przeanalizowali 45 próbek paszy dla drobiu i nie stwierdzili w żadnej z nich T-2. W innych badaniach w Polsce Nowak i Mueller (2020) przeanalizowali 40 próbek pasz i wykryli, że 88% z nich było zanieczyszczonych toksyną T-2 w maksymalnym stężeniu 31 µg/kg.

W prezentowanych badaniach HT-2 wykryto w 1174 próbkach (85%), a jej maksymalne stężenie dla próbki kukurydzy wynosiło 1583 µg/kg. Janić Hajnal i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy w latach 2012-2015 w Serbii i stwierdzili, że 40 z nich było skażonych toksyną HT-2 w maksymalnym stężeniu 178 µg/kg. W badaniach w Niemczech, Schollenberger i in. (2012) wykazali, że 31% z 13 próbek kukurydzy było zanieczyszczonych HT-2 w średnim stężeniu 38 µg/kg. W Czechach Zachariasova i in. (2014) nie oznaczyli toksyny HT-2 w żadnej z 8 analizowanych próbek kukurydzy. W 2016 i 2017 Drakopoulos i in. (2021) przeanalizowali 253 próbki jęczmienia ze Szwajcarii i stwierdzili, że 4% z nich było skażone toksyną HT-2 w maksymalnym stężeniu 73 µg/kg. Zachariasova i in. (2014) przebadali 37 próbek ziaren zbóż (pszenicy i jęczmienia) i nie stwierdzili obecności HT-2 w żadnej z nich. W innych badaniach Bryła i in. (2016) poddali analizie 99 próbek

pszenicy z Polski i oznaczyli w 18 z nich toksynę HT-2 w maksymalnym stężeniu 55 µg/kg. We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w Danii Storm i in. (2010) podali, że 60% z 20 kiszzonek z kukurydzy zawierało HT-2 w średnim stężeniu 104 µg/kg. W innych badaniach próbki kiszzonek z kukurydzy pobrano w Szwajcarii i 26% z 19 było zanieczyszczonych HT-2 przy średnim zanieczyszczeniu 24,9 µg/kg (Eckard i in., 2011). W 11 próbkach kiszzonek z kukurydzy pobranych w Czechach i Wielkiej Brytanii Zachariasova i in. (2014) uzyskali średnią i maksymalną wartość stężenia HT-2 na poziomie 32 µg/kg i 111 µg/kg. W Polsce Cegielska-Radziejewska i in. (2013) stwierdzili, że średnie stężenia toksyny HT-2 w paszach dla drobiu wynosiło 0,4 µg/kg, a zanieczyszczonych było 21 z 45 próbek. Zachariasowa i in. (2014) przeanalizowali 70 próbek paszy dla drobiu i trzody chlewnej, a maksymalne stężenie HT-2 wyniosło 39 µg/kg. Arroyo-Manzanares i in. (2019) zbadali 228 próbek paszy z Hiszpanii i wykryli toksynę HT-2 w dwóch z nich w maksymalnym stężeniu 123 µg/kg.

W badaniach własnych ZEN wykryto w 1323 próbkach (96%), a jego maksymalne stężenie wyniosło 1133 µg/kg. Komisja Europejska ustaliła wartość orientacyjną 2000 µg/kg dla ZEN w materiałach paszowych zbożowych, 3000 µg/kg dla materiałów paszowych z kukurydzy, 100 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych dla prosiąt i loszek, 250 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych dla macior i tuczników oraz 500 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych dla cieląt, bydła mlecznego i owiec (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). W prezentowanych badaniach 5 próbek (pasje pełnoporcjowe dla trzody chlewnej i drobiu) wykazało wyższe stężenie ZEN niż zalecenie UE. Nowak i Mueller (2020) przeanalizowali 31 próbek kukurydzy i ZEN wykryto we wszystkich, z maksymalną zawartością 589 µg/kg. Kos i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy w Serbii i stwierdzili, że 103 z nich było skażonych ZEN z maksymalnym poziomem 2596 µg/kg. Zachariasowa i in. (2014) przeanalizowali 8 próbek kukurydzy i oznaczyli ZEN w maksymalnym stężeniu 159 µg/kg (średnia wartość 30 µg/kg). Dodatkowo autorzy ci zbadali 21 próbek pszenicy paszowej i uzyskali średnią i maksymalną wartość stężenia ZEN: 20 µg/kg i 131 µg/kg. W 2016 i 2017 Drakopoulos i in. (2021) przeanalizowali 253 próbki jęczmienia i stwierdzili, że 38% z nich było zanieczyszczonych ZEN w maksymalnym stężeniu 341 µg/kg. Nowak i Mueller (2020) zbadali 33 próbki pszenicy oraz 29 próbek jęczmienia i wykryli, że 73% próbek pszenicy i 38% próbek jęczmienia było zanieczyszczonych ZEN z maksymalnym stężeniem odpowiednio 307 µg/kg i 46 µg/kg. W innych badaniach Bryła i in. (2016) analizowali 99 próbek pszenicy z Polski oznaczając ZEN w 47 z nich z maksymalnym stężeniem 100 µg/kg. Zachariasowa i in. (2014) przebadali 11 próbek kiszzonek z kukurydzy, w których średnia i maksymalna zawartość ZEN wynosiła 29 µg/kg i 120 µg/kg. W Czechach Krížová i in. (2014) wykryli ZEN we wszystkich badanych próbkach kiszzonek z kukurydzy (15), a jego średnia zawartość wynosiła 215 µg/kg. W innych badaniach Rodríguez-Blanco i in. (2021)

przeanalizowali 44 próbki hiszpańskich kiszzonek z kukurydzy pobranych w 2018 roku. ZEN był obecny w siedmiu (16%) z nich w średnim stężeniu 69,8 µg/kg. W Szwajcarii 79% (15) próbek kiszzonek z kukurydzy było zanieczyszczonych ZEN w średnim i maksymalnym stężeniu 100 µg/kg i 430 µg/kg (Eckard i in., 2011). Driehuis i in. (2008) zbadali 72 próbki paszy, a ZEN wykryto w 28% z nich w maksymalnym stężeniu 363 µg/kg (średnia 80 µg/kg). W Portugalii Martins i in. (2008) wykazali, że 13% próbek pasz było zanieczyszczonych ZEN w zakresie 104-356 µg/kg. Zachariasowa i in. (2014) przeanalizowali 70 próbek paszy dla drobiu i trzody chlewnej i stwierdzili maksymalne stężenie ZEN na poziomie 104 µg/kg. Nowak i Mueller (2020) poddali analizie 40 próbek pasz z Polski. Wykryli, że 85% z nich było zanieczyszczonych ZEN w maksymalnym stężeniu 186 µg/kg.

Kukurydza jest głównym surowcem, w którym wykrywane są fumonizyny, chociaż ich obecność stwierdzono również w sorgo i ryżu (Richard, 2007). W prezentowanych badaniach FB (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>+FB<sub>3</sub>) oznaczono w 71 próbkach (59%) z maksymalnym stężeniem 1885 µg/kg. Komisja Europejska ustaliła wartość orientacyjną 60000 µg/kg dla sumy FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub> w kukurydzianych materiałach paszowych, 5000 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych dla świń, koni, królików i zwierząt domowych, 10000 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych pasze dla ryb, 20000 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych dla drobiu, cieląt (< 4 miesięcy), jagniąt i kozłąt oraz 50000 µg/kg dla pasz uzupełniających i pełnoporcjowych dla dorosłych przeżuwaczy (> 4 miesiące) i norek (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). W prezentowanej pracy FB nie zostały wykryte w stężeniach wyższych niż wartości ustalone przez Komisję Europejską. Kos i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy w Serbii i stwierdzili, że wszystkie z nich były skażone FB<sub>1</sub> w maksymalnym stężeniu 27103 µg/kg. W 21% z 58 próbek kukurydzy z Portugalii FB<sub>1</sub> wykryto w zakresie 10-300 µg/kg (Martins i in., 2008). Zachariasowa i in. (2014) stwierdzili FB<sub>1</sub> w 8 próbkach kukurydzy z najwyższą zawartością 189 µg/kg. W Chorwacji Klarić i in. (2009) przeanalizowali 12 próbek kukurydzy i wykryli FB (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>+FB<sub>3</sub>) w 25% próbek przy średnim stężeniu 7630 µg/kg (wartość maksymalna 20700 µg/kg). Bryła i in. (2016) przebadali 99 próbek pszenicy i stwierdzili w 5 z nich FB<sub>1</sub> z maksymalnym stężeniem 150 µg/kg. W Portugalii Martins i in. (2008) przeanalizowali 79 próbek ziarna zbóż (pszenicy i jęczmienia), w 8% których stwierdzono obecność FB<sub>1</sub> w zakresie stężenia 10-40 µg/kg. Klarić i in. (2009) oraz Zachariasowa i in. (2014) nie wykryli FB w odpowiednio 12 i 37 próbkach badanych ziaren zbóż. W Czechach Zachariasowa i in. (2014) przeanalizowali 11 próbek kiszzonek z kukurydzy, w których oznaczono FB (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>) w średnim stężeniu 51 µg/kg. Rodríguez-Blanco i in. (2021) zbadali 44 próbki kiszzonek z kukurydzy z Hiszpanii, a FB były obecne w 18 (41%) z nich w średnim stężeniu 761 µg/kg. Den Hollander i in. (2021) przeanalizowali 40 próbek pasz z Belgii i wykryli w 40% FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> w 20% i FB<sub>3</sub> w 10% z nich, w maksymalnym stężeniu, odpowiednio: 550 µg/kg, 133 µg/kg i 70 µg/kg. Arroyo-Manzanares i in. (2019) zbadali 228 próbek pasz z Hiszpanii, FB<sub>1</sub> wykryto w 114 z nich, a FB<sub>2</sub> w 68.

Maksymalne stężenia wynosiły odpowiednio: 3959 µg/kg i 961 µg/kg. W Portugalii Martins i in. (2008) stwierdzili, że 1% z 337 próbek pasz dla świń i drobiu było zanieczyszczonych FB<sub>1</sub> w zakresie 24-34 µg/kg.

W badaniach własnych OTA wykryto w 388 próbkach (47%), z najwyższą wartością 155 µg/kg. Komisja Europejska ustaliła wartość orientacyjną 250 µg/kg dla OTA w materiałach paszowych, 50 µg/kg dla mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych dla trzody chlewnej oraz 100 µg/kg dla mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych dla drobiu (Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). W prezentowanych badaniach 2 próbki mieszanek paszowych dla trzody chlewnej i bydła wykazały wyższe stężenie OTA niż wskazania UE. Klarić i in. (2009) przeanalizowali 12 próbek kukurydzy w Chorwacji, a OTA wykryto w 25% z nich, w zakresie 2,5-31,7 µg/kg (wartość średnia 12,7 µg/kg). Kos i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy i stwierdzili, że 23 z nich były skażone OTA w maksymalnym stężeniu 318 µg/kg. Zachariasowa i in. (2014) oznaczyli maksymalne stężenie OTA na poziomie 56 µg/kg w analizowanych 37 próbkach ziaren zbóż. Bryła i in. (2016) przebadali 99 próbek pszenicy i wykryli OTA w 2 z nich, w maksymalnym stężeniu 7 µg/kg. W innych badaniach Klarić i in. (2009) stwierdzili, że 1 na 12 próbek ziarna zbóż była zanieczyszczona OTA (2,6 µg/kg). W Czechach Zachariasova i in. (2014) nie wykryli OTA w żadnej z 11 próbek kiszonek z kukurydzy. Martins i in. (2008) przeanalizowali 100 próbek pasz dla świń i drobiu, a OTA wykryto w 1 próbce w stężeniu 4 µg/kg. W Chorwacji Klarić i in. (2009) stwierdzili obecność OTA w 15% z 13 próbek pasz, w zakresie stężeń 5,4-12,9 µg/kg. We wcześniejszych badaniach w Polsce Kotowski i in. (2000) stwierdzili obecność OTA w 15 z 40 próbek pasz, w większości w stężeniu poniżej 1,5 µg/kg.

W prezentowanych badaniach AF (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>) oznaczono w 5% przebadanych próbek, przy maksymalnej zawartości 1,3 µg/kg. Komisja Europejska ustaliła maksymalną dozwoloną wartość dla aflatoksyny B<sub>1</sub> na 20 µg/kg dla materiałów paszowych, 10 µg/kg dla mieszanek paszowych uzupełniających i pełnoporcjowych oraz 5 µg/kg dla mieszanek paszowych dla bydła mlecznego i cieląt, owiec mlecznych i jagniąt, kóz mlecznych oraz koźląt, prosiąt i młodych drobiu (Dyrektywa nr 2002/32/WE). Toksyny te nie były uważane za problem w europejskich produktach rolnych aż do początku 2013 roku, kiedy AF wykryte w bałkańskiej kukurydzy przeznaczonej na paszę, spowodowały poważne problemy zdrowotne zwierząt w Europie (De Rijk i in., 2015). W badaniach własnych poziomy AF nie przekraczały wartości NDP ustalonych przez Komisję Europejską. Kos i in. (2020) przebadali 204 próbki kukurydzy i stwierdzili, że 111 z nich było skażonych aflatoksyną B<sub>1</sub> w maksymalnym stężeniu 205 µg/kg. W Portugalii Martins i in. (2008) ocenili występowanie AFB<sub>1</sub> w 248 próbkach kukurydzy. Dwanaście procent z nich było skażonych aflatoksyną w zakresie 1-45 µg/kg. Klarić i in. (2009) przeanalizowali 12 próbek kukurydzy i stwierdzili zanieczyszczenie AF w zakresie 2,7-4,5 µg/kg (średnio 3,4 µg/kg) w 33% próbek. W Portugalii Martins i in. (2008) wykazali,

że 11% z 80 próbek pszenicy i 7% z 74 próbek jęczmienia było zanieczyszczonych AFB<sub>1</sub> w stężeniu 1-10 µg/kg. Klarić i in. (2009) poddali analizie 12 próbek pszenicy, jęczmienia i owsa na obecność AF, które wykryto w 1 próbce pszenicy (stężenie 2,6 µg/kg). W badaniach Rodríguez-Blanco i in. (2021) przebadano 44 próbki kiszzonek z kukurydzy, i AFB<sub>1</sub> wykryto w trzech z nich (6,8%) (średnie stężenie 0,31 µg/kg). Martins i in. (2008) przeanalizowali występowanie AFB<sub>1</sub> w 13 próbkach kiszzonek. Toksynę wykryto w 15% próbek w zakresie stężeń 6-10 µg/kg. Natomiast Zachariasova i in. (2014) nie stwierdzili AFB<sub>1</sub> w 11 próbkach kiszzonek z kukurydzy. Arroyo-Manzanares i in. (2019) zbadali 228 próbek pasz i wykryli AFB<sub>1</sub> w siedmiu z nich, AFB<sub>2</sub> w trzech, a AFG<sub>1</sub> w dwóch z maksymalnym poziomem stężeń odpowiednio 2,91 µg/kg, 0,28 µg/kg i 0,22 µg/kg. Martins i in. (2008) badali paszę dla świń i drobiu i stwierdzili, że odpowiednio 10% i 22% próbek zanieczyszczonych było AFB<sub>1</sub> w stężeniu 1-21 µg/kg. W Chorwacji Klarić i in. (2009) oznaczyli AF w paszach w zakresie 4,2-10,3 µg/kg (średnia 6,9 µg/kg) w 4 (31%) z 13 próbek.

Żyto jest rośliną paszową - ponad 50 % zbiorów ziarna jest skarmiana. Podaje się je zwierzętom jako ziarno, jak również w postaci zielonki i otrąb żytnich. Ziarno żyta jest też wykorzystywane w przemyśle zbożowo-młynarskim jako surowiec do produkcji mąki (jasnej lub ciemnej), z której wytwarza się pieczywo. Chociaż areał upraw żyta zmniejszył się w ostatnich latach, chłodne strefy umiarkowane w Europie nadal pozostają głównymi obszarami jego uprawy. Głównymi producentami tego zboża są: Niemcy (2737 tys. ton), Polska (2673 tys. ton), Rosja (2547 tys. ton), Dania (723 tys. ton) i Białoruś (670 tys. ton). W Polsce uprawia się żyto na ok. 873 tys. ha, co stanowi ponad 8 % zasiewów wszystkich zbóż. Średnio w ciągu roku uzyskuje się w Polsce około 2673 tys. ton ziarna żyta, co stanowi prawie 20 % zbiorów światowych (Rocznik Statystyczny Rolnictwa, 2018). Ziarno żyta zawiera stosunkowo duże ilości błonnika pokarmowego, w którego skład wchodzi mające prozdrowotne działanie pentozany, fruktany i β-glukany, a także łatwo przyswajalne białka, witaminy, kwasy fenolowe oraz fitoestrogeny (Jasińska i in., 2006). Spożywanie żyta staje się niebezpieczne, gdy jest ono zanieczyszczone m.in. mikotoksynami. Głównymi czynnikami wpływającymi na infekcje grzybicze i produkcję mikotoksyn są warunki pogodowe - temperatura i poziom opadów w okresie wegetacji. Warunki pogodowe w maju (kwitnienie) i lipcu (zbiory) są kluczowe dla biosyntezy wtórnych metabolitów pleśni (Habschied i in., 2019). Narażenie na niższe temperatury często wiąże się z wyższą wilgotnością (większą aktywnością wody) oraz późniejszym zbiorem i może prowadzić do występowania wyższych stężeń deoksyniwalenolu (Bernhoft i in., 2012; Parikka i in., 2012). Zbadano naturalne występowanie mikotoksyn *Fusarium* i ochratoksyny A w odmianach żyta ozimego uprawianych w pięciu lokalizacjach na terenie Polski w okresie trzech lat (publikacja D2). Z pól doświadczalnych zebrano cztery odmiany żyta ozimego KWS Binntto (hybrydowe), KWS Serafino (hybrydowe), Dańkowskie Granat (populacyjne) oraz nasiona niecertyfikowane (FSS) rozmnożone

kilkukrotnie w gospodarstwie (populacyjne) w pięciu regionach Polski (Boguszyn, Marianowo, Prusim, Walewice, Wyczechy). Doświadczenia polowe prowadzono w trzech kolejnych sezonach (2017-2019).

DON był najczęściej występującą mikotoksyną w badanym materiale - został wykryty w 54 próbkach (90%). W żadnej z nich nie stwierdzono przekroczenia maksymalnych poziomów ustalonych przez UE (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). Wszystkie próbki pobrane w sezonie wegetacyjnym 2016/2017 zawierały DON (średni poziom 70,6 µg/kg; maksymalny - 354 µg/kg), natomiast w sezonach 2017/2018 i 2018/2019 odsetek próbek w których wykryto DON wyniósł odpowiednio 90% i 80% (średnie stężenie odpowiednio 9,62 µg/kg i 6,21 µg/kg). Stwierdzono statystycznie istotne różnice ( $\alpha = 0,05$ ) dla DON pomiędzy wszystkimi trzema sezonami wegetacyjnymi. Najwyższe średnie stężenie stwierdzono w próbkach pobranych w Wyczechach (54,1 µg/kg, 100% próbek z DON), a najniższe w próbkach pochodzących z Boguszyna (13,3 µg/kg, 75% próbek z DON). Tylko dla próbek z Boguszyna i Marianowa nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla średnich wartości stężeń. Najwyższe średnie stężenie (43,5 µg/kg) DON stwierdzono w życie populacyjnym z reprodukcji własnej (FSS), a najniższe w przypadku odmiany żyta Dańkowskie Granat (19,3 µg/kg). Stwierdzono statystycznie istotne różnice ( $\alpha = 0,05$ ) średnich poziomów DON między wszystkimi czterema odmianami żyta. W badaniach Błajet-Kosicka i in. (2014) przeanalizowano 76 próbek ziarna żyta (pobranych w latach 2009–2012). DON wykryto w 38 z nich (50%), a jego średnie i maksymalne stężenie wynosiło odpowiednio 22,0 µg/kg i 254 µg/kg. Na Litwie, Mankevičienė i in. (2011a) stwierdzili, że 50% próbek żyta było zanieczyszczone DON, przy maksymalnym stężeniu 159 µg/kg. W 6-letnich badaniach przeprowadzonych na terenie Rosji DON wykryto w zaledwie w jednej z 63 próbek żyta (60 µg/kg) (Tutelyan i in., 2013). Remža i in. (2016) przeanalizowali 39 próbek słowackiego żyta, a oznaczone średnie i maksymalne stężenia DON były na poziomie, odpowiednio 67,9 µg/kg i 289 µg/kg. We wcześniejszych badaniach w Niemczech Gottschalk i in. (2009) wykryli DON we wszystkich z 61 analizowanych próbek żyta, przy średnich i maksymalnych stężeniach odpowiednio 28,0 µg/kg i 288 µg/kg. Pleadin i in. (2017) przeanalizowali 16 próbek żyta w Chorwacji. DON obecny był w sześciu z nich (38%), w średnim stężeniu 50,0 µg/kg.

Niwalenol (NIW) został wykryty w sześciu z 60 próbek żyta (10%), ze średnim stężeniem poniżej granicy wykrywalności. Najwyższe stężenie NIW (26,4 µg/kg) oznaczono w próbkach z Walewic w sezonie wegetacyjnym 2017/2018 dla odmiany żyta hybrydowego KWS Binntto. Błajet-Kosicka i in. (2014) stwierdzili, że w dwóch z 76 próbek żyta (3%), wykryto NIW w maksymalnym stężeniu poniżej granicy oznaczalności (20 µg/kg). W Niemczech NIW wykryto w 3% próbek żyta, a jego średnie stężenie wynosiło 0,06 µg/kg (Gottschalk i in., 2009). Toksynę T-2 wykryto w 63% próbek żyta, a jej najwyższe stężenie wyniosło 6,63 µg/kg. Najwyższe średnie stężenie tej toksyny odnotowano w sezonie wegetacyjnym 2016/2017 (1,64 µg/kg; 80% zanieczyszczonych próbek), natomiast

najniższe w sezonie wegetacyjnym 2018/2019 (średnia poniżej granicy oznaczalności; 35% zanieczyszczonych próbek). Najwyższe średnie stężenie stwierdzono w próbkach pobranych w Marianowie (2,03 µg/kg, 92% próbek pozytywnych), natomiast średnie stężenia w próbkach z miejscowości Boguszyn i Prusim były poniżej granicy oznaczalności. W prezentowanych badaniach najwyższą średnią zawartość toksyny T-2 (1,21 µg/kg) odnotowano w życie populacyjnym z reprodukcji własnej (FSS), a najmniejszą w życie hybrydowym KWS Serafino (0,80 µg/kg). Zauważono statystycznie istotne różnice ( $\alpha=0,05$ ) średnich poziomów T-2 między wszystkimi sezonami wegetacyjnymi, a także między wszystkimi odmianami żyta. We wcześniejszych badaniach w Polsce, Błajet-Kosicka i in. (2014) stwierdzili, że 30% z 76 próbek żyta było zanieczyszczone toksyną T-2 o średniej zawartości <2 µg/kg (maksymalnie 24,8 µg/kg). Analiza 8 próbek litewskiego żyta wskazała na występowanie toksyny T-2 w 88% z nich, przy maksymalnej wartości 20,2 µg/kg (Mankevičienė i in., 2011a). W Rosji Tutelyan i in. (2013) zbadali 33 próbki żyta, a toksynę T-2 wykryli w 12% próbek w maksymalnym stężeniu 12,0 µg/kg (średnia <2 µg/kg). W badaniach Gottschalk i in. (2009) toksyna T-2 została wykryta w 53 (87%) z 61 próbek żyta, przy średnim i maksymalnym stężeniu odpowiednio 0,13 µg/kg i 0,77 µg/kg.

Toksynę HT-2 wykryto w 34 próbkach (57%), a jej średnie i maksymalne stężenia wynosiły odpowiednio 2,98 µg/kg i 29,8 µg/kg. Najwyższy średni poziom uzyskano w sezonie wegetacyjnym 2016/2017 (6,59 µg/kg; 85% próbek z toksyną). Statystycznie istotne różnice ( $\alpha=0,05$ ) dla średnich stężeń tej toksyny stwierdzono w okresie wegetacyjnym 2016/2017. Podobnie jak w przypadku toksyny T-2 najwyższą średnią zawartość toksyny HT-2 stwierdzono w próbkach z Marianowa (7,43 µg/kg, 92% próbek pozytywnych). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic dla średnich wartości stężenia HT-2 między próbkami pochodzącymi z miejscowości Boguszyn, Prusim i Wyczechy. Najbardziej zanieczyszczonymi odmianami żyta były KWS Binntto i żyto z reprodukcji własnej (FSS), ze średnimi stężeniami odpowiednio 4,01 µg/kg i 4,04 µg/kg. Średnia zawartość HT-2 była najniższa w odmianie Dańkowskie Granat (poniżej granicy oznaczalności). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic poziomów stężeń pomiędzy odmianami żyta KWS Binntto i z reprodukcji własnej. We wcześniejszych badaniach żyta w Polsce Błajet-Kosicka i in. (2014) wykryli toksynę HT-2 w 29% próbek, przy maksymalnym stężeniu 44,1 µg/kg. W Rosji, HT-2 oznaczono w pięciu z 33 próbek żyta, ze średnią i maksymalną wartością stężenia, odpowiednio <5 µg/kg i 38 µg/kg (Tutelyan i in., 2013). W Niemczech Gottschalk i in. (2009) przeanalizowali 61 próbek żyta, a toksynę HT-2 wykryto w 57 (93%) próbkach ze średnią i maksymalną zawartością, odpowiednio 0,56 µg/kg i 2,6 µg/kg.

Monoacetoksycirpenol (MAS) i diacetoksycirpenol (DAS) to dwie kolejne mikotoksyny należące do trichotecen grupy A. MAS wykryto w 7% próbek (średnia wartość stężenia poniżej LOD; maksymalna - 3,07 µg/kg), natomiast DAS nie wykryto w żadnej próbce żyta. Najwyższe stężenia MAS



odnotowano w okresie wegetacyjnym 2017/2018 (średnia z wyników pozytywnych 2,29 µg/kg). Podobne wyniki przedstawili Błajet-Kosicka i in. (2014). MAS wykryto w pięciu (7%) z siedemdziesięciu sześciu próbek ze średnim i maksymalnym stężeniem odpowiednio poniżej granicy wykrywalności (1 µg/kg) i granicy oznaczalności (3 µg/kg). W żadnej z analizowanych próbek autorzy nie wykryli DAS. Gottschalk i in. (2009) podali, że w 53 (87%) z 61 próbek żyta średnia i maksymalna zawartość MAS wynosiła odpowiednio 0,05 µg/kg i 0,31 µg/kg, natomiast DAS nie został wykryty w żadnej próbce.

W badaniach własnych ZEN wykryto w 27 próbkach (45%). We wszystkich próbkach wartości stężenia tej toksyny były poniżej maksymalnych poziomów ustalonych przez UE (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). Osiemdziesiąt procent próbek w okresie wegetacyjnym 2016/2017 zawierało ZEN (średnie skażenie 1,82 µg/kg; maksymalne - 10,2 µg/kg), natomiast w sezonie wegetacyjnym 2018/2019 odsetek próbek pozytywnych wyniósł tylko 5% (średnia wartość <LOD, maksymalna wartość <LOQ). Najwyższe średnie stężenie stwierdzono w próbkach z miejscowości Wyczechy (1,80 µg/kg, 42% próbek pozytywnych), natomiast najniższe w próbkach pobranych w Marianowie (<LOQ, 33% próbek pozytywnych). W prezentowanych badaniach najwyższe średnie stężenie (1,13 µg/kg) ZEN stwierdzono w próbce żyta KWS Binntto, natomiast najniższe dla odmiany KWS Serafino (0,35 µg/kg). Istotne statystycznie różnice ( $\alpha=0,05$ ) dla średniego stężenia ZEN odnotowano między wszystkimi sezonami wegetacyjnymi, miejscami pobierania próbek oraz wszystkimi odmianami żyta. W badaniach Błajet-Kosicka i in. (2014) przeanalizowano 76 próbek żyta, a ZEN wykryto w 54% próbek ze średnim i maksymalnym stężeniem odpowiednio 4,5 µg/kg i 148 µg/kg. Na Litwie Mankevičienė i in. (2011a) przeanalizowali osiem próbek żyta ozimego, a ZEN wykryto w 50% próbek, z maksymalną zawartością 21,2 µg/kg. W innych badaniach Pleadin i in. (2017) wykryli ZEN w 25% próbek chorwackiego ziarna żyta ze średnim i maksymalnym stężeniem, odpowiednio 1,44 µg/kg i 7,81 µg/kg.

Ochratoksyna A jest produkowana głównie przez pleśnie *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium verrucosum* podczas przechowywania w warunkach sprzyjających wzrostowi grzybów i produkcji toksyn. Niewiele jest informacji na temat warunków potrzebnych do biosyntezy OTA podczas wegetacji roślin na polu (Richard, 2007). W żadnej próbce nie stwierdzono zawartości OTA przekraczających maksymalne dopuszczalne poziomy ustalone przez UE (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006; Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE). Ochratoksynę A wykryto w dwóch (3%) z 60 próbek ziaren żyta. Najwyższe stężenie oznaczono w życie KWS Serafino, pobranych w miejscowości Prusim w sezonie wegetacyjnym 2016/2017. We wcześniejszych badaniach Krysińska-Traczyk i in. (2007) przeanalizowali pięć próbek żyta w Polsce, a OTA wykryto w 40% badanego materiału, jego średnie i maksymalne stężenie wyniosło odpowiednio 0,19 µg/kg i 0,55 µg/kg. W innych badaniach

w Polsce, Hajok i in. (2019) przeanalizowali 12 próbek mąki żytniej, a OTA oznaczono w 67% z nich uzyskując średnie i maksymalne stężenie odpowiednio 4,3 µg/kg i 19,5 µg/kg. W Chorwacji Pleadin i in. (2017) przeanalizowali 16 próbek żyta, a średnie i maksymalne stężenie kształtowało się na poziomie, odpowiednio 0,89 µg/kg i 4,12 µg/kg. W 75% z ośmiu próbek żyta z Serbii stężenie wyniosło 3,93 µg/kg (wartość średnia) oraz 23,04 µg/kg (wartość maksymalna) (Torović, 2018).

Żołędzie u zwierząt dziko żyjących stanowią bogatą rezerwę paszową w okresie jesienno-zimowym. Od dłuższego czasu surowcem tym karmione są również zwierzęta domowe, zwłaszcza trzoda chlewna, co jest szczególnie popularne w krajach południowej Europy. Jest to jednak materiał, który nie nadaje się dla szybkorosnących, typowo mięsnych ras, z powodu niższego udziału białka ogólnego z niedoborem aminokwasów siarkowych (Kamphues i in., 2004). Natomiast wyższa zawartość tłuszczu, skrobi i cukru w żołędziach oraz ich jesienno-zimowa podaż jest wykorzystywana w produkcji najwyższej klasy szynki iberyjskiej, określanej mianem „pata negra”. Ciemna czysta rasa iberyjska, utrzymywana jest na dużych terenach wybiegowych z obsadą dębów korkowych. Po opadnięciu żołędzi zwiększa się znacznie ich udział w dawce pokarmowej. Ten okres żywienia jest nazwany „montanera”, po którym dokonywany jest ubój (między 14 a 18 miesiącem życia). Taka dieta powoduje, że wieprzowina nabiera orzechowego smaku, a tkanka tłuszczowa ma bogaty skład kwasów tłuszczowych typu omega-3 i omega-9 (Ortiz i in., 2020) Dojrzałe żołędzie zawierają znaczne ilości witamin z grupy B (szczególnie B6 i B9), a nie zawierają glutenu. Rozpatrując żołędzie jako materiał paszowy, należy pamiętać, że mogą one zawierać naturalne toksyny, jak fitotoksyny i mikotoksyny.

W badaniach własnych podjęto próbę oceny zanieczyszczenia mikotoksynami żołędzi (publikacja D3). Materiał badawczy pobrano jesienią 2017 r. w nadleśnictwie Czerniejewo (województwo wielkopolskie). Wiosną 2018 r. z zmagazynowany surowiec został podzielony na 2 grupy: bez wizualnych oznak pleśni oraz z widoczną grzybnią. Z każdego wariantu wydzielono losowo po 15 próbek. Spośród oznaczanych mikotoksyn w największych stężeniach występował kwas mikofenolowy i patulina. W spleśniałych żołędziach kwas mikofenolowy oznaczono na średnim poziomie 14580 µg/kg, a patulinę - 50 µg/kg. Ponadto w żołędziach z widocznymi oznakami pleśni wykryto w niższych stężeniach: ZEN, MAS, DAS, toksynę T-2 i OTA. W żołędziach wizualnie pozbawionych pleśni stwierdzono występowanie jedynie kwasu mikofenolowego (średni poziom 85,4 µg/kg). Toksyczne właściwości żołędzi badano od dziesięcioleci (Clarke i Cotchin, 1956), ale niewiele uwagi poświęcono metabolitom patogennych pleśni. W literaturze coraz częściej zwracana jest uwaga, że są materiały paszowe, w których wyniki analiz na obecność zanieczyszczeń są niedoszacowane. Takim materiałem mogą być żołędzie, których analiza nie obejmuje rutynowo mikotoksyn.

Kwas mikofenolowy jest wtórnym metabolitem wytwarzanym przez liczne gatunki *Penicillium spp.* (Schneweis i in., 2000). Jego pochodne są komercyjnie stosowane jako środki immunosupresyjne, zapobiegające odrzucaniu przeszczepionych narządów. Kwas mikofenolowy charakteryzuje się niską toksycznością u przeżuwaczy. Mohr i in. (2007) nie odnotowali żadnego niekorzystnego wpływu tej toksyny na zdrowie zwierząt i parametry biochemiczne krwi owiec, którym podawano 300 mg kwasu mikofenolowego (5,4 mg/kg) dziennie przez 44 dni. Wpływ kwasu mikofenolowego na owce badali również Dzidic i in. (2004), stwierdzając, że jego toksyczność jest niska. Puel i in. (2005) odkryli, że gatunek grzyba *Byssosclamyx nivea* może również wytwarzać kwas mikofenolowy, a jego spożycie przez zwierzęta domowe może znacznie zwiększyć ich podatność na choroby zakaźne. Sievers i in. (1997) zauważyli, że znane jest selektywne działanie immunosupresyjne tego kwasu, ponieważ ogranicza on metabolizm puryn. Jego kumulowanie w kiszonkach, może wiązać się ze zwiększoną podatnością na infekcje u zwierząt (Baum i in., 2005). Patulina produkowana jest przez pleśnie *Penicillium* i *Aspergillus spp.*, a głównym producentem jest *P. expansum* (Bennett i Klich, 2003). Toksyna ta jest najczęściej wykrywana w jabłkach, sokach jabłkowych i zawierających je produktach przetworzonych. Rzadziej występuje w innych owocach, takich jak winogrona czy gruszki. Długotrwałemu narażeniu na patulinę towarzyszy genotoksyczność, cytotoksyczność, immunotoksyczność, neurotoksyczność, a także poważne uszkodzenie narządów wewnętrznych, zwłaszcza nerek i wątroby (Zhong i in., 2018). Blood (2004) zauważył, że najbardziej wrażliwe na tę toksynę są świnie, u których związek ten zaburza funkcje układu nerwowego. Objawami zatrucia patuliną są wymioty, ślinotok, obniżenie apetytu, czasem także zwiększenie liczby białych krwinek (leukocytoza) i spadek całkowitej liczby czerwonych krwinek (erytropenia). U przeżuwaczy PAT może powodować problemy ze strawnością błonnika i mniejszą produkcją lotnych kwasów organicznych oraz syntezą białek drobnoustrojów (Tapia i in., 2002; 2005).

#### **4.2.2. Ewaluacja współwystępowania mikotoksyn materiale roślinnym i paszach**

Surowce i pasze mogą być zanieczyszczone różnymi gatunkami pleśni. Dodatkowo każdy gatunek może wytwarzać szerokie spektrum mikotoksyn, dlatego ważne jest badanie ich współwystępowania. Ponadto niekorzystne skutki zdrowotne wynikające z narażenia na większą liczbę mikotoksyn mogą być poważniejsze (efekt synergistyczny) w porównaniu do pojedynczych związków (Grenier i Oswald, 2011).

Współwystępowanie mikotoksyn z ustalonymi przez Komisję Europejską najwyższymi dopuszczalnymi poziomami oceniono dla próbek z wynikami powyżej granic wykrywalności. Najczęściej współwystępującymi kombinacjami mikotoksyn były DON+ZEN: od 81% (próbki kiszonek z kukurydzy do 99% (próbki pasz pełnoporcjowych) (publikacja D1). Współwystępowanie DON+T-2+HT-2, ZEN+T-2+HT-2 i DON+T-2+HT-2+ZEN, stwierdzono z dużą częstością w większości badanych

surowców i pasz. W ujęciu matrycowym najwyższy wskaźnik współwystępowania odnotowano w próbkach pasz pełnoporcjowych, gdzie ponad 95% z nich zawierało DON+T-2+HT-2+ZEN, a blisko 97% – DON+T-2+HT-2 i ZEN+T-2+HT-2. Wysoki wskaźnik współwystępowania zaobserwowano dla DON+FB w próbkach kukurydzy (56%), kiszzonek z kukurydzy (53%) oraz mieszankach paszowych pełnoporcjowych (86%). Stosunkowo wysoki poziom współwystępowania odnotowano dla kombinacji OTA z trichotecenami w paszach pełnoporcjowych (DON+OTA 70%, T-2+HT-2+OTA 69%). Ponieważ częstość występowania oraz zawartość aflatoksyn były niskie, ich współwystępowanie z innymi mikotoksynami było również niskie. Najmniejszy procent współwystępujących mikotoksyn zaobserwowano w próbkach kiszzonek (z wyjątkiem kombinacji z OTA, które miały najniższą częstość w próbkach kukurydzy).

Monbaliu i in. (2010) przebadali 42 próbki kukurydzy, m.in. w kierunku trichotecen, fumonizyn, zearalenonu, ochratoksyny A i aflatoksyn. Najczęściej występującymi kombinacjami były DON+FB (64%) i DON+ZEN (26%). 10% próbek zawierało DON+T-2+HT-2, a współwystępowanie ZEN+T-2+HT-2 i DON+T-2+HT-2+ZEN stwierdzono w 2% próbek. W odniesieniu do 8 próbek kukurydzy przeanalizowanych przez Zachariasova i in. (2014) kombinacje DON+ZEN i DON+FB<sub>1</sub> występowały w 25% próbek. Z 47 próbek kiszzonek kukurydzianej przeanalizowanych pod kątem DON i ZEN przez Driehuis i in. (2008), 17% zawierało te dwie mikotoksyny jednocześnie. W 84% z 19 próbek kiszzonek kukurydzy ze Szwajcarii Eckard i in. (2011) stwierdzili współwystępowanie DON+ZEN, a DON+T-2+HT-2+ZEN, DON+T-2+HT-2 i ZEN+T-2+HT-2 w 21% próbek. W Czechach, Zachariasova i in. (2014) wykazali, że 45% z 11 próbek kiszzonek z kukurydzy zawierało DON+ZEN. Ponadto odnotowali współwystępowanie DON+FB<sub>1</sub> (27% próbek) i DON+T-2+HT-2 (18% próbek). Poza kukurydzą Monbaliu i in. (2010) zbadali także 8 próbek pszenicy i stwierdzili, że jedna czwarta z nich zawierała DON+ZEN, podczas gdy DON+T-2+HT-2 były obecne tylko w jednej próbce i nie rozpoznano żadnych innych kombinacji. Zachariasova i in. (2014) przeanalizowali 37 próbek ziaren zbóż i odnotowali kombinacje DON+ZEN (37%), DON+OTA (5%), DON+T-2+HT-2 (3%) i DON+ZEN+OTA (3%). Ponad 80% badanych próbek pasz dla drobiu na Słowacji zawierało co najmniej dwie mikotoksyny, a najczęściej rejestrowaną kombinacją czterech związków (48%) była DON+T-2+HT-2+ZEN (Labuda i in., 2005). W ponad 70% próbek współwystępowały ZEN+T-2+HT-2, a połowa próbek zawierała DON+T-2+HT-2 oraz DON+ZEN. Z 72 próbek paszy dla bydła mlecznego analizowanych w Holandii 21% zawierało kombinację DON+ZEN (Driehuis i in., 2008). Spośród 70 próbek pasz dla drobiu i trzody chlewnej przebadanych przez Zachariasova i in. (2014), 33% zawierało DON+ZEN, podczas gdy kombinacje DON+T-2+HT-2, DON+OTA, DON+ZEN+OTA oraz DON+FB<sub>1</sub> występowały tylko w pojedynczych próbkach.

W badaniach żyta (publikacja D2), w sezonie wegetacyjnym 2016/2017 we wszystkich próbkach wykryto przynajmniej jedną mikotoksynę, a 70% z nich zawierało cztery lub więcej mikotoksyn. Natomiast w sezonie wegetacyjnym 2018/2019 70% próbek zawierało jedną mikotoksynę lub wcale, a cztery lub więcej mikotoksyn stwierdzono tylko w 10% próbek żyta. Częstość występowania mikotoksyn w różnych odmianach żyta w danym sezonie wegetacyjnym była na podobnym poziomie. W próbkach pobranych w Marianowie trzy lub więcej mikotoksyn było obecnych w 92% próbek, podczas gdy dla próbek pobranych w innych lokalizacjach wartości te wynosiły około 50%. We wcześniejszych badaniach w Polsce Błajet-Kosicka i in. (2014) stwierdzili, że ponad 50% próbek żyta zawierało co najmniej dwie mikotoksyny, a ponad 5% próbek zawierało pięć lub więcej mikotoksyn. Na Litwie Mankevičienė i in. (2011a) poddali analizie zboża ozime na obecność DON, ZEN i T-2. Ustalili, że dwie lub więcej z tych mikotoksyn było obecnych odpowiednio w 84% (2006 r.) i 96% próbek (2007 r.). W prezentowanych badaniach dwie lub więcej mikotoksyn wykryto w 67% próbek.

Udziały poszczególnych kombinacji mikotoksyn obliczono dla najczęściej występujących (DON, ZEN, toksyna T-2 i toksyna HT-2), a także dla ochratoksyny A – ze względu na ustalone wartości NDP. W sezonach wegetacyjnych 2016/2017 i 2017/2018 najczęściej występującymi kombinacjami były DON+ZEN oraz DON+T-2+HT-2. W sezonie wegetacyjnym 2018/2019 najczęściej występowała kombinacja DON +T-2+HT-2 (30% próbek). Biorąc pod uwagę odmianę żyta oraz miejsce pobierania próbek, współczynniki współwystępowania dla danych kombinacji były zbliżone. W ostatnich latach kilku badaczy przedstawiło współwystępowanie najważniejszych mikotoksyn w próbkach żyta. W badaniach Błajet-Kosicka i in. (2014) przebadano 76 próbek ziarna żyta i stwierdzono, że najczęściej występowały kombinacje DON+ZEN (15,4% próbek) oraz DON+T-2+HT-2+ZEN (14,5% próbek). Wyniki badań litewskiego żyta wykazały, że połączenia DON+ZEN (13% próbek) i DON+T-2+ZEN (70% próbek) występowały najczęściej w odpowiednio w 2006 i 2007 roku (Mankevičienė i in., 2011a). Tutelyan i in. (2013) stwierdzili współwystępowanie toksyn T-2+HT-2 w 13% z 23 próbek rosyjskiego żyta, a kombinacje T-2+HT-2+ZEN i ZEN+HT-2 obecne były w 4% próbek. W badaniach własnych współwystępowanie DON+ZEN odnotowano w 45% próbek.

#### **4.2.3. Określenie korelacji między badanymi mikotoksynami w surowcach i paszach**

Jednym z elementów analizy danych będących wynikiem wieloletniego monitoringu mikotoksyn w surowcach i paszach było wyznaczenie współczynników korelacji pomiędzy zawartościami poszczególnych mikotoksyn (publikacja D1). Obliczenia przeprowadzono dla czterech matryc i kombinacji mikotoksyn regulowanych przez UE, współwystępujących w przynajmniej pięćdziesięciu próbkach. Stwierdzono statystycznie istotne ( $p < 0,01$ ) dodatnie korelacje dla najczęściej występującej kombinacji mikotoksyn, czyli DON+ZEN – dla każdej matrycy; silna korelacja:  $r = 0,810$  dla kukurydzy;  $r = 0,719$  dla kiszonki z kukurydzy, umiarkowaną:  $r = 0,582$  dla ziarna zbóż;  $r = 0,413$

dla pasz pełnoporcjowych. Podobnie zaobserwowano statystycznie istotną ( $p < 0,01$ ) silną korelację dodatnią między stężeniami T-2 i HT-2 w większości matryc ( $r > 0,82$ ), za wyjątkiem próbek kiszzonek z kukurydzy o umiarkowanej sile zależności ( $r = 0,405$ ). Ponadto stwierdzono jeszcze jedną istotną, umiarkowaną korelację między DON i HT-2 w próbkach kiszzonek z kukurydzy ( $r = 0,439$ ,  $p < 0,01$ ). Kukurydza była jedyną badaną matrycą, w której zaobserwowano statystycznie istotną, ale słabą dodatnią korelację między zawartością DON i OTA, T-2 i FB, HT-2 i FB, ZEN i FB oraz ZEN i OTA. Podobną zależność stwierdzono w przypadku HT-2 i ZEN ( $r = 0,354$ ,  $p < 0,01$ ) oraz DON i T-2 ( $r = 0,245$ ,  $p < 0,01$ ) w próbkach kiszzonek z kukurydzy. W przypadku kombinacji z aflatoksynami nie wykazano żadnych statystycznie istotnych korelacji. Dodatnią korelację między zawartością DON i ZEN, będącą jedną z najsilniejszych w prezentowanej pracy, zaobserwowali także inni autorzy, a jej siła wahała się od umiarkowanej do bardzo silnej, w zależności od np. matrycy. Mankevičienė i in. (2011b) zbadali próbki pszenicy i jęczmienia i stwierdzili statystycznie istotną ( $p < 0,01$ ) dodatnią korelację zawartości DON i ZEN dla pojedynczych odmian pszenicy ozimej (o umiarkowanej sile) i dla jęczmienia jarego (bardzo silna). Borutova i in. (2012) przeanalizowali prawie półtora tysiąca próbek zbóż, pasz i innych surowców paszowych pochodzących z regionu Azji i Oceanii i określili ogólną korelację między DON i ZEN jako zależność o średniej sile, jednak analiza danych dotyczących wyłącznie próbek kukurydzy wykazała silną korelację dla tej matrycy. Ponadto autorzy zaobserwowali inne statystycznie istotne ( $p < 0,01$ ), bardzo silne korelacje między stężeniami AFB<sub>1</sub> i AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> i AFG<sub>2</sub> oraz między FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub> dla kukurydzy (Borutova i in., 2012). W badaniach własnych, ze względu na bardzo niski odsetek występowania (i współwystępowania) AF oraz małą liczbę próbek kukurydzy skażonych toksynami FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub> nie analizowano analogicznych zależności. Inne istotne korelacje dla kukurydzy stwierdzone w badaniach własnych (np. między DON a OTA, T-2 a FB, HT-2 a FB) nie zostały odnotowane w przypadku tej matrycy pochodzącej z regionu Azji i Oceanii (Borutova i in., 2012). Silna istotna statystycznie korelacja między zawartością T-2 i HT-2 może być związana z zależnością między tymi związkami (HT-2 jest metabolitem T-2). Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań dotyczących obecności T-2 i HT-2 w norweskim jęczmieniu, owsie i pszenicy (Langseth i Rundberget, 1999) oraz w angielskim owsie (Edwards, 2009).

Ze względu na względnie niski stopień zanieczyszczenia żyta mikotoksynami, korelacje zostały zbadane jedynie dla tych występujących najczęściej, tj. DON, T-2, HT-2 oraz ZEN (publikacja D2). Statystycznie istotna ( $p < 0,001$ ) silna korelacja została ustalona dla zawartości toksyn T-2 i HT-2 ( $r = 0,840$ ) oraz dla DON i ZEN ( $r = 0,708$ ). Natomiast zależności między stężeniami DON i T-2, DON i HT-2, T-2 i ZEN oraz HT-2 i ZEN były statystycznie nieistotne (odpowiednio:  $p = 0,528$ ,  $p = 0,816$ ,  $p = 0,745$  i  $p = 0,930$ ). Fakt, że DON i ZEN oraz T-2 i HT-2 mogą być wytwarzane przez te same gatunki grzybów może wyjaśniać korelacje ich zawartości (Richard, 2007). We wcześniejszych badaniach

w Polsce Błajet-Kosicka i in. (2014) przeanalizowali 76 próbek żyta i zaobserwowali statystycznie potwierdzone zależności między DON i ZEN, T-2 i HT-2 oraz T-2 i ZEN (odpowiednio  $r = 0,579$ ,  $r = 0,586$  i  $r = 0,556$ ). W Niemczech Gottschalk i in. (2009) określili korelację między toksynami T-2 i HT-2 oraz DON i 15-Ac-DON ( $r = 0,873$  i  $r = 0,957$ ), w 61 próbkach ziarna żyta, ale ze względu na niskie stężenia tych toksyn siła zależności była mniejsza w porównaniu z innymi gatunkami zbóż (pszenica i owies). Na Litwie Mankevičienė i in. (2011b) zaobserwowali statystycznie istotne korelacje między zawartością DON i ZEN, DON i T-2 oraz T-2 i ZEN w ziarnie ozimym (odpowiednio  $r = 0,624$ ,  $r = 0,717$  i  $r = 0,834$ ).

### **4.3. Ocena zagrożenia związanego z występowaniem mikotoksyn w żywności**

#### **4.3.1. Przeprowadzenie za pomocą opracowanych metod badawczych oceny występowania mikotoksyn w piwie i zielonej kawie**

Piwo jest jednym z najpopularniejszych napojów alkoholowych na świecie, spożywanym w dużych ilościach niemal w każdym kraju. Pochodzi z czasów prehistorycznych. Napoje podobne do piwa były znane w Chinach już 70 wieków przed naszą erą (Hornsey, 2003). Ze względu na poziom konsumpcji i charakter surowców (roślinne) używanych do produkcji, piwo może stanowić źródło spożycia substancji szkodliwych, włączając mikotoksyny. Piwo stanowi przykład artykułów spożywczych, dla których maksymalne dozwolone poziomy mikotoksyn nie zostały jeszcze ustalone. Polska jest obecnie trzecim producentem piwa w Europie. W 2016 r. najwyższe spożycie piwa w Europie dotyczyło Niemiec (85,5 mln hektolitrow, 104 litry na osobę), które wyprzedziły Wielką Brytanię (43,7 mln hektolitrow, 67 litrow na osobę), Hiszpanię (38,6 mln hektolitrow, 46 litrow na osobę), Polskę (37,9 mln hektolitrow, 98 litrow na osobę) i Francję (21,3 mln hektolitrow, 33 litry na osobę). Najwyższe spożycie piwa na mieszkańca w Europie stwierdzono dla Czech (143 litry), Niemcy i Austrii (103 litry na osobę) (Beer Production, 2017). W literaturze wskazuje się na możliwość przechodzenia OTA do piwa z zanieczyszczonych surowców stosowanych w browarnictwie. Z drugiej strony uważa się, że OTA może przetrwać procesy fermentacyjne, ale jej stężenie może się zmniejszyć (o około 90%) podczas procesu słodowania stosowanego w produkcji piwa (Anli i Alkis, 2010). Inne mikotoksyny, które mogą znajdować się w piwie, to trichoteceny (głównie DON) i ZEN wytwarzane przez gatunki *Fusarium*. Poziomy DON mogą się zmniejszać lub zwiększać w zależności od etapu procesu i parametrów produkcji piwa (Kostelanska i in., 2011; Lancova i in., 2008). Wydaje się, że głównym źródłem mikotoksyn w piwie są zanieczyszczone surowce jęczmienne i słodowe. Obecność OTA i toksyn *Fusarium* w surowcach przeznaczonych do słodowania i browarnictwa jest badana na całym świecie (Běláková i in., 2014; Habschied i in., 2011; Wolf-Hall, 2007). Podobnie zanieczyszczenie piwa mikotoksynami było przedmiotem badań w różnych krajach. Poziomy OTA w piwie mogą wahać się od pg/ml (Jørgensen, 1998; Medina i in., 2006) do µg/ml w tradycyjnych

piwach afrykańskich (Odhav i Naicker, 2002). Stężenie mikotoksyn fuzaryjnych zwykle nie przekracza wartości kilkudziesięciu ng/ml (Lancova i in., 2008; Rodríguez-Carrasco i in., 2015; Zöllner i in., 2000). Wyższe wartości odnotowano w próbkach piw rzemieślniczych, których wytwarzanie jest słabiej kontrolowane (Piacentini i in., 2015).

Sześćdziesiąt dziewięć próbek piwa (od czterech największych polskich firm piwowarskich) zakupiono losowo w 2018 r. w sklepach spożywczych na terenie Polski: 42 typu lager (23 normalne <6,2% alk obj.; 19 mocne >6,2% alk obj.), 5 typu porter, 9 piw niepasteryzowanych, 8 smakowych i 5 bezalkoholowych (publikacja D4). Wszystkie próbki przechowywano w 4°C i odgazowywano dzień przed analizą. Ochratoksynę A wykryto w 93% próbek, a 78% z nich zawierało OTA w stężeniu wyższym niż LOQ – z najwyższą wartością 0,347 ng/ml. W 4 próbkach piwa (1 lager, 1 niepasteryzowane i 2 typu porter) stężenia OTA były wyższe niż 0,2 ng/ml. Wartość ta stanowi proponowany maksymalny dopuszczalny poziom dla tej toksyny (Anli i Alkis, 2010). Wartości średnie i mediany stężeń OTA mieściły się w zakresie kilkudziesięciu pg/ml. Wyniki te w połączeniu wyznaczonym wskaźnikiem skażenia (odsetek próbek pozytywnych) są zgodne z wynikami badań przeprowadzonymi w różnych krajach europejskich (Jørgensen, 1998; Medina i in., 2005; 2006; Tangni i in., 2002). Jednak w niektórych tradycyjnych piwach pochodzących z Afryki poziom OTA może przekraczać wartości 2000 ng/ml (Odhav i Naicker, 2002). DAS nie został wykryty w żadnej z próbek, ale przynajmniej jedna z mikotoksyn *Fusarium* była obecna w 97% próbek. NIW wykryto tylko w jednej próbce (<LOQ), cztery próbki zawierały ZEN (3 próbki poniżej wartości LOQ i 0,413 ng/ml), a poziomy toksyn T-2 i HT-2 były zbliżone do LOQ. Średnie i najwyższe stężenia DON (wykryte w 96% próbek, a w 45% na poziomie >LOQ) wyniosły odpowiednio 17,1 ng/ml i 56,2 ng/ml. OTA, DON i HT-2 były jedynymi związkami wykrytymi w ponad 75% próbek. Stwierdzone w badaniach własnych powszechne zanieczyszczenie piwa DON jest zgodne z wynikami innych badań przeprowadzonych w Polsce i Europie (Bauer i in., 2016; Bryła i in., 2018; Rodríguez-Carrasco i in., 2015; Varga i in., 2013). Jednak niektóre badania prezentują wyniki odmienne. Pascari i in. (2018) przeanalizowali 64 dostępne na rynku piwa europejskie, ale DON wykryli tylko w 4 próbkach (6%), podczas gdy ZEN był obecny w 65% badanych próbek, w zakresie stężeń od 8,2 do 63 ng/ml. W badaniach własnych ZEN był obecny tylko w 6% próbek, na poziomie poniżej 0,5 ng/ml. Niskie wartości stężenia ZEN (maksymalnie 2,0 ng/ml) zostały również stwierdzone przez Bauer i in. (2016), a toksyna ta została wykryta we wszystkich analizowanych próbkach.

Zielona kawa, czyli surowe ziarna kawy, które nie zostały poddane fermentacji i obróbce termicznej, zyskuje coraz większą popularność na całym świecie. Wykazano, że zielona kawa i jej produkty mogą być korzystne dla zdrowia człowieka, przede wszystkim ze względu na wysoką zawartość przeciwutleniaczy. Postulowanym efektem zdrowotnym zielonej kawy jest jej wpływ na



redukcję wagi. Jeden z przeciwutleniaczy zawartych w nieprzetworzonych ziarnach, kwas chlorogenowy, zapobiega wchłanianiu cukrów przez przewód pokarmowy (Cho i in., 2010; Thom, 2007; van Dijk i in., 2009). Ponadto sugeruje się, że spożywanie produktów z zielonej kawy może również odgrywać pomocniczą rolę w kontroli nadciśnienia tętniczego (Ochiai i in., 2004). Wszystkie te spostrzeżenia znalazły odzwierciedlenie w rosnącym zapotrzebowaniu na kawę lekko lub średnio paloną, niepozbawioną antyoksydantów dzięki mniej agresywnej obróbce termicznej, a także na nieprzetworzone produkty z zielonej kawy, w tym suplementy diety (Castellanos-Onorio i in., 2011; Suarez-Quiroz i in., 2005). Jednak oprócz korzystnych efektów, produkty wytworzone z nieprzetworzonych lub średnio przetworzonych ziaren mogą również stwarzać pewne zagrożenia dla zdrowia. Podobnie jak inne materiały pochodzenia roślinnego, ziarna zielonej kawy są podatne na skażenie grzybami i mikotoksynami, w szczególności OTA. Zanieczyszczenie występuje głównie w okresie zbiorów i przechowywania owoców kawy, ale może być również związane ze złymi warunkami higienicznymi podczas transportu (Miraglia i Brera, 2002). Porównanie dwóch systemów upraw (konwencjonalnego i ekologicznego) nie wykazało istotnych różnic w poziomie zanieczyszczenia ziaren kawy OTA (de Fátima Rezende i in., 2013). Obecnie maksymalne dopuszczalne poziomy OTA zostały ustalone jedynie dla kawy palonej, mielonej i rozpuszczalnej (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006), a dla produktów z ziaren zielonej kawy, w tym suplementów diety z jej ekstraktem, nie istnieją żadne wartości referencyjne. Istnieje podejrzenie, że suplementy roślinne, powszechnie uważane za składnik zdrowej diety, mogą być skażone mikotoksynami (Vaclavik i in., 2013).

Badania własne (publikacja D5) obejmowały analizę w kierunku OTA i cytryniny 56 handlowo dostępnych próbek produktów z zielonej kawy oraz suplementów diety na bazie ekstraktu z zielonej kawy. Materiał do badań został zakupiony w sklepach spożywczych, zielarskich oraz aptekach i stanowił 34 próbki produktów z zielonej kawy: surowych ziaren (n=16), kawy mielonej (n=15) i rozpuszczalnej (n=3) oraz 22 próbki suplementów diety w postaci kapsułek (n=19), tabletek (n=2) i saszetek (n=1). Żadna z próbek nie zawierała cytryniny na wykrywalnych poziomach stężenia. Stężenia OTA w przetworzonej zielonej kawie były wyższe niż w surowych ziarnach. Wykryto ją tylko w jednej próbce surowych ziaren zielonej kawy (6%), odpowiednio w 40% i 67% próbek kawy mielonej i rozpuszczalnej. Średnie stężenia OTA w próbkach kawy mielonej i rozpuszczalnej wyniosły odpowiednio 3,28 µg/kg i 4,09 µg/kg, podczas gdy wartości maksymalne odpowiednio 6,65 µg/kg i 7,44 µg/kg. Toksynę tę oznaczono również w 58% próbek suplementów w postaci kapsułek (średnie stężenie 9,60 µg/kg, maksymalny poziom 31,4 µg/kg), ale była ona nieobecna w pozostałych formach suplementów. W żadnej z próbek tej grupy wykryto cytryniny.

Obecność OTA w zielonej kawie została po raz pierwszy opisana w 1974 (Levi i in., 1974), a następnie potwierdzona przez innych autorów (Alvindia i de Guzman, 2016; Broissin-Vargas i in., 2017; de Fátima Rezende i in., 2013; Jeszka-Skowron i in., 2017). Jednak większość wcześniejszych badań skupiała się na zanieczyszczeniu surowca (tj. ziaren zielonej kawy), a nie analizowała obecności mikotoksyn w produktach przetworzonych. Przeprowadzone badania sugerują, że OTA w takich produktach może występować częściej i w wyższych stężeniach niż w surowcu nieprzetworzonym. Ponadto dostępne wyniki badań wskazują, że nawet po paleniu produkty z zielonej kawy mogą zawierać toksyczne poziomy OTA (Suarez-Quiroz i in., 2005). W badaniach przeprowadzonych przez Lerda i in. (2013), ziarna zielonej kawy sztucznie zanieczyszczono OTA do stężenia 12 µg/kg, a następnie palono w 230°C przez 5, 8 i 12 min. Proces ten przyczynił się do redukcji wyjściowego poziomu OTA odpowiednio do 9 µg/kg, 5 µg/kg i 2,2 µg/kg. Badania toksyczności wykazały jednak, że stężenia OTA po paleniu kawy nadal wykazują potencjał toksykogeny (Lerda i in., 2013). Bessaire i in. (2019) ustalili maksymalne stężenia OTA, FB<sub>2</sub>, sterigmatocystyny, bowerycyny i enniatyny A w 71 próbkach zielonej kawy na poziomi odpowiednio: 12,2 µg/kg, 76,3 µg/kg, 19,8 µg/kg, 4,4 µg/kg i 1,7 µg/kg.

W badaniach własnych ponad 50% próbek suplementów diety zawierających ekstrakt z zielonej kawy zawierało OTA. Podobnie Vaclavik i in. (2013), oznaczyli OTA w 36% próbek 50 suplementów, w stężeniach do 137 µg/kg. Wykazano, że również suplementy diety oparte na innych składnikach, takich jak drożdże piwne, imbir i produkty z wina gronowego, mogą być zanieczyszczone mikotoksynami (Gottschalk i in., 2016; Solfrizzo i in., 2015; Trucksess i in., 2009). Dane te są alarmujące, biorąc pod uwagę, że suplementy diety są ogólnie uważane za produkty zdrowe i jako takie są spożywane regularnie przez dłuższy czas. Ponadto suplementy oparte na zielonej kawie zazwyczaj zawierają skoncentrowany ekstrakt; w przeciwieństwie do kawy, która jest rozcieńczana wodą i używana po procesie parzenia, który również może obniżyć zawartość mikotoksyn (Blanc i in., 1998; Heilmann i in., 1999). W konsekwencji, spożywanie skażonych suplementów diety zawierających ekstrakt z zielonej kawy może prowadzić do przewlekłej mikotoksykozy.

#### **4.3.2. Ewaluacja współwystępowania mikotoksyn i określenie narażenia konsumentów, związanego ze spożywaniem piwa zawierającego mikotoksyny**

Ziarno i wytwarzane z niego produkty mogą być zanieczyszczone różnymi gatunkami pleśni. Ponadto każdy gatunek może wytwarzać kilka mikotoksyn, dlatego ważna jest ocena ich współwystępowania. Współwystępowanie mikotoksyn może wzmacniać niekorzystne skutki zdrowotne w porównaniu z pojedynczymi związkami (Grenier i Oswald, 2011). Wyniki analizy próbek piwa (publikacja D4) wykazały, że ponad 93% z nich zawierało co najmniej dwie mikotoksyny (np. OTA i DON), a co najmniej trzy związki były obecne w 74% próbek. Największa liczba mikotoksyn

wykrytych w jednej próbce wyniosła 5 (3% próbek). Analiza rozkładu występowania mikotoksyn w poszczególnych rodzajach piwa wykazała, że blisko 60% próbek każdego typu zawierało 3 mikotoksyny.

W związku z faktem, że w badaniach własnych niewiele próbek zawierało mikotoksyny inne niż OTA, DON i HT-2 na poziomie wyższym niż LOD, obliczenia narażenia zostały wykonane tylko dla tych trzech związków. Do obliczeń wraz ze średnimi i maksymalnymi stężeniami mikotoksyn, wykorzystano dane dotyczące konsumpcji piwa oraz jego eksportu (Rocznik Statystyczny Handlu Zagranicznego, 2017). Wartości średniego spożycia piwa były następujące (ml/dzień): Niemcy i Polska 259,5; Holandia i Belgia 234,4; Wielka Brytania 180,2; USA, Kanada i Włochy 174,3; Czechy, Węgry, Irlandia, Rumunia i Słowacja 225,2; Cypr 174,3 (GEMS/Food, 2012). Do obliczeń przyjęto średnią masę ciała 70,8 kg dla Europy i 80,7 kg dla Ameryki Północnej (Walpole i in., 2012). Szacowane dzienne spożycie (EDI) zostało przedstawione jako procent wartości TDI (tolerowane dzienne spożycie), wynoszących: 17,14 ng/kg masy ciała (m.c.) dla OTA (pochodzące z tolerowanego tygodniowego spożycia TWI = 120 ng/kg m.c. (EFSA, 2010)), 1000 ng/kg m.c. dla DON i 60 ng/kg m.c. dla HT-2 (Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006). Ustalono dzienne spożycie OTA z piwa na poziomie 0,8-1,1% TDI. Nawet scenariusz „najgorszego przypadku” (tj. przy zastosowaniu maksymalnego stężenia zanotowanego w badaniach własnych) wyniósł tylko 5,0-7,5% TDI. Wartości te są zgodne z wcześniejszymi szacunkami zaprezentowanymi w raporcie SCOOP 3.2.7. (Miraglia i Brera, 2002). W raporcie tym udział piwa w pobraniu OTA (EDI) wyniósł 0,01-0,14 ng/kg m.c. Klasyfikuje to piwo jako stosunkowo mało znaczące źródło OTA. Udział pozostałych grup żywności oszacowano następująco: zboża (44%), wino (10%), kawa (9%), piwo (7%) kakao i produkty pochodne (5%), suszone owoce (4%), mięso (3%), przyprawy (3%) oraz pozostałe (15%). W badaniach własnych wartości EDI nie przekraczały 0,20 ng/kg m.c. Podobnie wcześniejsze badania nad OTA w piwie wykazały, że spożycie OTA nie przekracza wartości TDI (Coronel i in., 2012; Peters i in., 2017).

W przypadku HT-2 nie stwierdzono znacznych różnic między „scenariuszami” (wartość średnia HT-2: 5,0-7,5% TDI; wartość maksymalna HT-2: 6,5-9,7% TDI). Wynika to z faktu, że chociaż HT-2 była obecna w 74% próbek, jej stężenia były bliskie wartości LOQ. Rodríguez-Carrasco i in. (2015) przeanalizowali 154 próbki piwa pod kątem mikotoksyn *Fusarium* i wyznaczyli średni poziom spożycia toksyny HT-2 w zakresie 7-12% TDI ustalonego przez Komitet Naukowy ds. Żywności w 2002 r. (0,1 µg/kg m.c.), co odpowiada 11-20% TDI zastosowanego w prezentowanej pracy.

Przy zastosowaniu średniego stężenia DON uzyskanego w badaniach własnych obliczone dzienne spożycie tej mikotoksyny mieściło się w zakresie 4,1-6,0% TDI, natomiast na podstawie wartości maksymalnych osiągnięto poziom 14-21% TDI. Wartości te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, które szacowały pobranie DON z piwa na poziomie kilku procent TDI dla samego DON (Bauer i in.,

2016; Rodríguez-Carrasco i in., 2015) lub DON z jego metabolitami (Pascari i in.2018; Varga i in., 2013). We wcześniejszych badaniach stwierdzono również możliwe wyższe wartości dziennego spożycia wynoszące blisko 20% TDI (Piacentini i in., 2015).

#### **4.4. Porównanie występowania i poziomów ochratoksyny A w próbkach surowicy osób dializowanych i zdrowych**

Ostatnie lata w dziedzinie toksykologii i mikologii to intensywne badania dotyczących poziomów ochratoksyny A nie tylko w produktach pochodzenia roślinnego, ale także w organach zwierząt i ludzi, ich surowicy, mleku i moczu. Przeprowadzone w ramach pracy badania dotyczące stężenia OTA w surowicy pacjentów leczonych dializami są uaktualnieniem prac naukowych prowadzonych w Polsce ponad trzydzieści lat temu (Goliński i Grabarkiewicz-Szczęсна, 1985; 1989) i uzupełniają wiedzę w tym temacie. Łącznie pobrano 104 próbki od 88 pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych dializie w stacji dializ w centralnej części Polski oraz od 16 zdrowych ochotników (grupa kontrolna) (publikacja D6). Wszyscy pacjenci mieli obie nerki, a terapia nerkozastępcza trwała przynajmniej 5 lat. Dializa, której zostali poddani, to klasyczna hemodializa wodorowęglanowa. Średnie stężenie OTA w surowicy krwi zdrowych ochotników wynosiło 0,72 ng/ml dla kobiet i 0,69 ng/ml dla mężczyzn. Średnie stężenie u pacjentów dializowanych wynosiło 0,76 ng/ml i 0,74 ng/ml, odpowiednio dla kobiet i mężczyzn (wartości maksymalne: 2,53 ng/ml dla kobiet i 2,78 ng/ml dla mężczyzn). Najwyższe średnie stężenie OTA odnotowano w przedziale wiekowym 65-85 lat dla kobiet (0,89 ng/ml), a dla mężczyzn w przedziale 45-64 lat (0,86 ng/ml). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie różnic stężenia OTA pomiędzy grupą kontrolną (pacjenci niedializowani) a badanymi, zarówno dla kobiet ( $p = 0,87$ ), jak i dla mężczyzn ( $p = 0,84$ ). Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic przy porównaniu wyników grupy kontrolnej i poszczególnych grup wiekowych. W większości analizowanych próbek we wszystkich grupach wiekowych poziom OTA wahał się od 0,11 do 0,5 ng/ml.

Badania prowadzone w różnych regionach świata dowodzą, że ochratoksyna A jest obecna w większości pobranych do analizy próbek surowicy. W Polsce Goliński i Grabarkiewicz-Szczęсна (1989) przeanalizowali OTA w 1065 próbkach surowicy. OTA stwierdzono w 7% próbek, a jej średnie i maksymalne stężenie wynosiło odpowiednio 0,27 ng/ml i 40,0 ng/ml. Podejrzewa się, że ochratoksyna A jest jednym z czynników prowadzących do różnych chorób nerek m.in. przewlekłej niewydolności nerek i endemicznej nefropatii na Bałkanach. W wielu badaniach obecność OTA w surowicy jest kwalifikowana jako biomarker ekspozycji na tą mikotoksynę w różnych chorobach nerek. Breitholtz-Emanuelsson i in. (1994) przeanalizowali 65 próbek surowicy od osób zdrowych i 68 próbek surowicy od osób z różnymi zaburzeniami czynności nerek (pacjenci po przeszczepie, pacjenci z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek, pacjenci z kamieniem nerkowym oraz pacjenci

z torbielami z przewlekłą niewydolnością nerek i pacjenci poddawani dializie) w południowych Włoszech. Średnie stężenie ochratoksyny A u osób zdrowych wynosiło 0,53 ng/ml (maksymalna wartość 2,0 ng/ml), natomiast średni poziom OTA u pacjentów dializowanych wynosił 1,4 ng/ml (maksymalna wartość 14,0 ng/ml). Średnie stężenia OTA w surowicy pacjentów z pozostałymi chorobami nerek były zbliżone do zdrowych osób (0,47-0,60 ng/ml). Analizie poddano OTA w surowicy pacjentów cierpiących na różne schorzenia dróg moczowych w Turcji (Ozçelik i in., 2001). OTA wykryto w próbkach surowicy 40 zdrowych osób i 93 pacjentów z różnymi rodzajami zaburzeń układu moczowego (przewlekła niewydolność nerek leczona hemodializą, przewlekła niewydolność nerek leczona dializą otrzewnową, pacjenci z rakiem pęcherza moczowego i pacjenci z kamicą nerkową). Wyniki wskazały, że średnie stężenia OTA w surowicy pacjentów leczonych hemodializą (2,1 ng/ml) były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną (0,44 ng/ml). Autorzy stwierdzili również istotne różnice między średnimi stężeniami grup pacjentów leczonych dializami oraz pacjentów z kamicą nerkową lub rakiem pęcherza moczowego. Wyższe stężenia OTA u dializowanych pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną i innymi grupami pacjentów z chorobami nerek prawdopodobnie były powiązane się z obniżonym współczynnikiem filtracji kłębuszkowej u pacjentów poddanych dializie. W Czechach oznaczono ochratoksynę A w surowicy pięciu dializowanych pacjentów. Zakresy stężeń OTA przed i po dializie były takie same (0,5 – 3,6 ng/ml). Warto zauważyć, że autorzy nie wykryli OTA w dializacie (Malir i in., 2001). W Portugalii zbadano OTA w surowicy 95 pacjentów poddawanych hemodializie w miastach Coimbra i Aveiro. OTA stwierdzono we wszystkich próbkach surowicy, a średnie i maksymalne wartości wyniosły odpowiednio 0,50 ng/ml i 1,52 ng/ml. Autorzy nie stwierdzili istotnych różnic między populacjami Coimbra i Aveiro oraz między płciami pacjentów (Dinis i in., 2007). W Polsce Grajewski i in. (2007) przeanalizowali OTA w surowicy 20 pacjentów po nefrektomii i 6 zdrowych ochotników. Średnie stężenie OTA wynosiło 0,94 ng/ml (maksymalnie 2,27 ng/ml) i 1,06 ng/ml (maksymalnie 3,77 ng/ml), odpowiednio dla kobiet i mężczyzn poddanych nefrektomii. Średnie stężenie OTA w grupie zdrowych ochotników wynosiło 0,37 ng/ml. Uzyskane w prezentowanych badaniach wyniki potwierdzają narażenie populacji polskiej na ochratoksynę A. Średnie poziomy OTA zarówno u badanych dializowanych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek, jak i zdrowych ochotników były porównywalne z obserwowanymi w innych krajach europejskich (z wyjątkiem krajów bałkańskich, gdzie występuje BEN). Otrzymane wyniki średniego stężenia OTA są nieznacznie wyższe niż przedstawione wcześniej dla populacji polskiej przez Golińskiego i Grabarkiewicz-Szczęsną (1989). Wyniki analizy próbek wskazują na ekspozycję ludzi na OTA przez ograniczony okres czasu, pomimo że okres półtrwania OTA u ludzi jest stosunkowo długi, nie można ustalić, czy jest ona głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój chorób nerek. Choroby nerek rozwijają się powoli i stężenie OTA w próbkach surowicy powinno być monitorowane przez dłuższy czas, aby w pełni ocenić rolę tej mikotoksyny w etiologii chorób nerek w ludzi.

## 5. Wnioski

1. Opracowane procedury badawcze, oparte o techniki chromatograficzne z detekcją fluorescencyjną i spektrometrii mas, spełniają kryteria skuteczności metod analitycznych ustanowione przez UE dla urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn i mogą być wykorzystane do kompleksowego i rzetelnego monitorowania poziomu zanieczyszczenia tymi substancjami badanych matryc.
2. Badania wykazały że surowce roślinne jak i pasze są w znacznym stopniu zanieczyszczone mikotoksynami, aczkolwiek udział próbek z przekroczonymi wartościami NDP, wyznaczonymi przez UE, jest względnie niski. Niemniej jednak należy pamiętać że poziomy te ustalone są dla pojedynczych związków, a narażenie ludzi i zwierząt związane jest z ich ekspozycją na wiele związków w tym samym czasie. Jednocześnie problemy zdrowotne u zwierząt często występują już przy stężeniach niższych, niż wartości ustalone przez UE. Najczęściej występującymi mikotoksynami były DON i ZEN – obecne w ponad 95% próbek, a matrycami o najwyższym poziomie zanieczyszczenia były kukurydza i mieszanki paszowe pełnoporcjowe.
3. Wykonanie ponad 8000 oznaczeń w próbkach surowców roślinnych i pasz wykazało powszechne współwystępowanie mikotoksyn – ponad 95% próbek zawierało co najmniej 2 anality, a w 75% wykryto 5 toksyn. Wyniki te wraz z wiedzą o synergistycznym działaniu wielu mikotoksyn potwierdzają konieczność prowadzenia szczegółowych badań w tym zakresie.
4. Potwierdzono statystycznie istotne korelacje o różnej mocy (od silnej do średniej) między stężeniami mikotoksyn dla DON i ZEN oraz dla toksyny T-2 i HT-2. Ponadto korelacje o słabej mocy stwierdzono dla mikotoksyn produkowanych przez różne gatunki pleśni (OTA i DON, OTA i ZEN).
5. Badania żołądździ jako potencjalnego materiału paszowego wykazały wysokie stężenia kwasu mikofenolowego (14,6 mg/kg), a także patuliny (50 µg/kg). Szczególne obawy o bezpieczeństwo tego materiału może budzić jego zanieczyszczenie patuliną, która w żywności i paszach podlega ścisłemu monitorowaniu ze względu na jej toksyczność, włączając działanie teratogenne i rakotwórcze.
6. Spośród mikotoksyn oznaczanych w próbkach piwa najczęściej wykrywanymi były ochratoksyna A, deoksyniwalenol oraz toksyna HT-2. Przeprowadzona ocena narażenia konsumentów wykazała, że codzienne spożycie OTA wraz z piwem wynosi od 0,8% (dla wartości średniej) do 7,5% (dla wartości maksymalnej) TDI. W przypadku DON obliczone narażenie w zależności od scenariusza wahało się od 4,1% do 21% TDI, natomiast dla toksyny HT-2 od 5% do 9,7% TDI. Wyniki badań sugerują, że piwo ze względu na dużą zawartość wody, niewielki udział ekstraktu słodowego oraz relatywnie niską zawartość mikotoksyn nie jest głównym źródłem pobrania mikotoksyn przez człowieka, jednak występowanie wielu mikotoksyn w próbce może prowadzić

do działania synergistycznego. Stwierdzono występowanie wyższych poziomów mikotoksyn w piwach rzemieślniczych, co sugeruje że powinny one być częściej badane, aby chronić zdrowie „pasjonatów piwa”. W celu zapewnienia bezpieczeństwa konsumentów, UE powinna ustalić maksymalne dopuszczalne poziomy w piwie dla najczęściej występujących mikotoksyn.

7. Badania zielonej kawy i suplementów diety zawierających jej ekstrakt wykazały częste zanieczyszczenie próbek ochratoksyną A oraz pleśniami ją wytwarzającymi, nie stwierdzono natomiast obecności cytryniny. OTA występowała w wyższych stężeniach w produktach przetworzonych w porównaniu z surowymi ziarnami kawy, co sugeruje, że zanieczyszczenie mogło wystąpić podczas procesu produkcyjnego. Wyniki badań uzasadniają wdrożenie odpowiednich środków kontroli mikologicznej, zwłaszcza w odniesieniu do produkcji suplementów diety, w których najwyższe stężenie OTA wynosiło 31,4 µg/kg (wartość ponad 6-krotnie wyższa niż NDP dla kawy), a które są powszechnie uważane za zdrowe i bezpieczne.
8. Badania próbek biologicznych (surowica) nie wykazały statystycznie istotnych różnic w stężeniach OTA u osób zdrowych i poddawanych dializie. Nie stwierdzono również statystycznie istotnych różnic w stężeniach OTA przy porównaniu wyników grupy kontrolnej i poszczególnych grup wiekowych. Badania potwierdziły narażenie polskiej populacji na OTA. Średnie poziomy OTA u dializowanych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek oraz zdrowych ochotników były porównywalne z obserwowanymi w innych krajach europejskich (z wyjątkiem krajów bałkańskich, gdzie występuje BEN).

## 6. Piśmiennictwo

1. Ali WH, Derrien D, Alix F, Pérollier C, Lépine O, Bayoudh S, Chapuis-Hugon F, Pichon V. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals. *J Chromatogr A*. 2010; 1217:6668–6673. doi: 10.1016/j.chroma.2010.04.071.
2. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017; 14(6):632. doi: 10.3390/ijerph14060632.
3. Alvindia DG, de Guzman MF. Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Res*. 2016; 32(2):61-7. doi: 10.1007/s12550-016-0240-3.
4. Andrade PD, Caldas ED. Aflatoxins in cereals: worldwide occurrence and dietary risk assessment. *World Mycotoxin J*. 2015; 8:415–431. doi: 10.3920/wmj2014.1847.
5. Anli E, Alkis İM. Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. *J Inst Brew*. 2010; 116:23–32. doi: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00394.x.
6. Anukul N, Vangnai K, Mahakarnchanakul W. Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. *J Food Drug Anal*. 2013; 21(3):227-241. doi: 10.1016/j.jfda.2013.07.009.
7. Appell M, Jackson MA, Wang LC, Bosma WB. Determination of Citrinin Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Purification, HPLC Separation, and Fluorescence Detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2015; 38(20):1815-1819. doi: 10.1080/10826076.2015.1113546.
8. Arroyo-Manzanares N, Rodríguez-Estévez V, Arenas-Fernández P, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L. Occurrence of mycotoxins in swine feeding from Spain. *Toxins*. 2019; 11(6):1–13. doi: 10.3390/toxins11060342.
9. Bauer JI, Gross M, Gottschalk C, Usleber, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control*. 2016; 63:135–139. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.11.040.
10. Baum B, Mohr A, Pfaffl M, Bauer J, Hewicker-Trautwein M. Morphological Findings in Lymphatic Tissues of Sheep Following Oral Application of the Immunosuppressive Mycotoxin Mycophenolic Acid. *Mycopathologia*. 2005; 160:167–175. doi: 10.1007/s11046-005-6450-4.
11. Beer Production 2010–2016. In *Beer Statistics 2017; The Brewers of Europe*: Brussels, Belgium, 2017.
12. Belajová E, Rauová D, Daško L. Retention of ochratoxin A and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from beer on solid surfaces: comparison of efficiency of adsorbents with different origin. *Eur Food Res Technol*. 2007; 224:301–308. doi: 10.1007/s00217-006-0459-x.
13. Běláková S, Benešová K, Čáslavský J, Svoboda Z, Mikulíková R. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in Czech malting barley. *Food Control*. 2014; 37:93–98. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.033.



14. Benkerroum N. Aflatoxins: Producing-Molds, Structure, Health Issues and Incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020; 17(4):1215. doi: 10.3390/ijerph17041215.
15. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16(3):497-516. doi: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003.
16. Bernhoft A, Torp M, Clasen PE, Løes AK, Kristoffersen AB. Influence of agronomic and climatic factors on *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2012;29(7):1129-1140. doi: 10.1080/19440049.2012.672476.
17. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald IP, Seefelder W, Speijers G, Stroka J. Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(1):165-86. doi: 10.1002/mnfr.201100764.
18. Berthiller F, Krska R, Domig KJ, Kneifel W, Juge N, Schuhmacher R, Adam G. Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicol Lett*. 2011; 206(3):264-267. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.08.006.
19. Bessaire T, Perrin I, Tarres A, Bebius A, Reding F, Theurillat V. Mycotoxins in green coffee: occurrence and risk assessment. *Food Contr*. 2019; 96:59–67. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.08.033.
20. Binder EM. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim Feed Sci Technol*. 2007; 133(1-2):149–166. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.08.008.
21. Błajet-Kosicka A, Twarużek M, Kosicki R, Sibiorowska E, Grajewski J. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control*. 2014; 38:61–66. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.10.003.
22. Blanc M, Pittet A, Muñoz-Box R, Viani R. Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(2):673-675. doi: 10.1021/jf9707703.
23. Blood DC. *Poradnik lekarza weterynarii*. PZWL, 1st ed., Warszawa, Polska, ISBN: 83-200-2137-5, 2004.
24. Bloom E, Nyman E, Must A, Pehrson C, Larsson L. Molds and mycotoxins in indoor environments--a survey in water-damaged buildings. *J Occup Environ Hyg*. 2009; 6(11):671-8. doi: 10.1080/15459620903252053.
25. Blount WP. Turkey "X" Disease. *J. Br. Turkey* 1961; 9:55–58.
26. Borutova R, Aragon YA, Nährer K, Berthiller F. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. *Anim Feed Sci Technol*. 2012; 178:190–197. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.09.015.

27. Breidbach A. A Greener, Quick and Comprehensive Extraction Approach for LC-MS of Multiple Mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2017; 9(3):91. doi: 10.3390/toxins9030091
28. Breitholtz-Emanuelsson A, Minervini F, Hult K, Visconti A. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Nat Toxins*. 1994; 2:366–370. doi: 10.1002/nt.2620020605.
29. Broissin-Vargas LM, Snell-Castro R, Godon JJ, González-Ríos O, Suárez-Quiroz ML. Impact of storage conditions on fungal community composition of green coffee beans *Coffea arabica* L. stored in jute sacks during 1 year. *J Appl Microbiol*. 2018; 124(2):547–558. doi: 10.1111/jam.13656.
30. Bryła M, Ksieniewicz-Woźniak E, Waśkiewicz A, Szymczyk K, Jędrzejczak R. Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples. *Food Control*. 2018; 92:319–324. doi:10.1016/j.foodcont.2018.05.011.
31. Bryła M, Waśkiewicz A, Podolska G, Szymczyk K, Jędrzejczak R, Damaziak K, Sułek A. Occurrence of 26 Mycotoxins in the Grain of Cereals Cultivated in Poland. *Toxins*. 2016; 8(6):160. doi: 10.3390/toxins8060160.
32. Castellanos-Onorio O, Gonzalez-Rios O, Guyot B, Fontana TA, Guiraud JP, Schorr-Galindo S, Durand N, Suárez-Quiroz, M. Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control*. 2011; 22(8):1184–1188. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.01.014.
33. Cegielska-Radziejewska R, Stuper K, Szablewski T. Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Ann Agr Env Med*. 2013; 20:30–35.
34. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(3):937-43. doi: 10.1016/j.fct.2010.01.003.
35. Clarke EGC, Cotchin E. A note on the toxicity of the acorn. *Brit Vet J*. 1956; 112:135–139. doi: 10.1016/S0007-1935(17)46701-7.
36. Colvin BM, Harrison LR. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*. 1992; 117(1-2):79-82. doi: 10.1007/BF00497282.
37. Copetti MV. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. *Curr Opin Food Sci*. 2019; 25:57-61. doi: 10.1016/j.cofs.2019.02.014.
38. Coronel MB, Marín S, Cano-Sancho G, Ramos AJ, Sanchis V. Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2012; 29(6):979-93. doi: 10.1080/19440049.2012.660708.

39. Cramer B, Osteresch B, Muñoz KA, Hillmann H, Sibrowski W, Humpf HU. Biomonitoring using dried blood spots: detection of ochratoxin A and its degradation product 2'R-ochratoxin A in blood from coffee drinkers. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59(9):1837-1843. doi: 10.1002/mnfr.201500220.
40. da Rocha MW, Resck IS, Caldas ED. Purification and full characterisation of citreoviridin produced by *Penicillium citreonigrum* in yeast extract sucrose (YES) medium. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2015; 32(4):584-95. doi: 10.1080/19440049.2014.961177.
41. Dagnac T, Latorre A, Fernández Lorenzo B, Llompart M. Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2016; 33(12):1850-1863. doi: 10.1080/19440049.2016.1243806.
42. de Fátima Rezende E, Borges JG, Cirillo MÂ, Prado G, Paiva LC, Batista LR. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2013; 44(2):377-84. doi: 10.1590/S1517-83822013000200006.
43. de Matos NAV, de Moraes MHP, Sartori AV, Jacob SDC. Optimization and Validation of an Analytical Method for the Determination of Free and Hidden Fumonisin in Corn and Corn Products by UHPLC-MS/MS. *Food Anal Methods.* 2021; 14:1611–1624. doi:10.1007/s12161-021-01984-8.
44. De Rijk TC, Van Egmond HP, Van der Fels-Klerx HJ, Herbes R, De Nijs M, Samson RA, Slate AB, Van der Spiegel M. A study of the 2013 Western European issue of aflatoxin contamination of maize from the Balkan area. *World Mycotoxin J.* 2015; 8:641–651. doi: 10.3920/WMJ2015.1903.
45. den Hollander D, Croubels S, Lauwers M, Caekebeke N, Ringenier M, De Meyer F, Reisinger N, Van Immerseel F, Dewulf J, Antonissen G. Applied Research Note: Biomonitoring of mycotoxins in blood serum and feed to assess exposure of broiler chickens. *J Appl Poult Res.* 2021; 30(1):100111. doi: 10.1016/j.japr.2020.10.010
46. Desmarchelier A, Oberson JM, Tella P, Gremaud E, Seefelder W, Mottier P. Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(13):7510-7519. doi: 10.1021/jf100891m.
47. Dinis AM, Lino CM, Pena AS. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44(2):553-7. doi: 10.1016/j.jpba.2006.12.001.

48. Drakopoulos D, Sulyok M, Jenny E, Kägi A, Bänziger I, Logrieco AF, Krska R, Vogelgsang S. Fusarium Head Blight and Associated Mycotoxins in Grains and Straw of Barley: Influence of Agricultural Practices. *Agronomy*. 2021; 11(4):801. Doi: 10.3390/agronomy11040801.
49. Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, te Giffel MC. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J Dairy Sci*. 2008; 91:4261–4271. doi: 10.3168/jds.2008-1093.
50. Dyrektywa nr 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 7 maja 2002 r. w sprawie niepożądanych substancji w paszach zwierzęcych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej*. 2002; L 140/10-21.
51. Dzidic A, Mohr A, Meyer K, Bauer J, Meyer HH, Pfaffl MW. Effects of mycophenolic acid (MPA) treatment on expression of Fc receptor (FcRn) and polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) mRNA in adult sheep tissues. *Croat Med J*. 2004; 45(2):130-135.
52. Eckard S, Wettstein FE, Forrer H-R, Vogelgsang S. Incidence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Silage Maize. *Toxins*. 2011; 3(8):949-967. doi: 10.3390/toxins3080949.
53. Edwards SG. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional barley. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2009; 26:1185–1190. doi: 10.1080/02652030902919418.
54. EFSA (European Food Safety Authority). Statement on recent scientific information on the toxicity of Ochratoxin A. *EFSA J*. 2010; 8:1626. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1626.
55. Ehrlich KC. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Front. Microbiol*. 2014; 5:50. doi: 10.3389/fmicb.2014.00050
56. Eskola M, Altieri A, Galobart J. Overview of the activities of the European Food Safety Authority on mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin J*. 2018; 11(2):277–289. doi: 10.3920/wmj2017.2270.
57. Fabregat-Cabello N, Zomer P, Sancho JV, Roig-Navarro AF, Mol HGJ. Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin J*. 2016; 9(2):149–161. doi: 10.3920/wmj2014.1872.
58. Fang G, Liu G, Yang Y, Wang S. Quartz crystal microbalance sensor based on molecularly imprinted polymer membrane and three-dimensional Au nanoparticles@mesoporous carbon CMK-3 functional composite for ultrasensitive and specific determination of citrinin. *Sens Actuators B Chem*. 2016; 230:272–280. doi: 10.1016/j.snb.2016.02.053.
59. Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA, Nielsen KF. Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *PLoS ONE*. 2011; 6(8):e23496. doi: 10.1371/journal.pone.0023496.

60. Gadzała-Kopciuch R, Kwaśniewska K, Ludwiczak A, Skrzyniarz P, Jakubowski R, Nowak W, Wojtczak A, Buszewski B. Towards A New Approach for the Description of Cyclo-2,4-Dihydroxybenzoate, A Substance Which Effectively Mimics Zearalenone in Imprinted Polymers Designed for Analyzing Selected Mycotoxins in Urine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(7):1588. doi: 10.3390/ijms20071588.
61. Gelderblom WC, Cawood ME, Snyman SD, Marasas WF. Fumonisin B<sub>1</sub> dosimetry in relation to cancer initiation in rat liver. *Carcinogenesis*. 1994; 15(2):209-214. doi: 10.1093/carcin/15.2.209.
62. GEMS/Food Consumption Cluster Diets. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme. World Health Organization: Geneva, 2012. dostępne 22.03.2022 na: <https://www.who.int/teams/nutrition-and-food-safety/databases/global-environment-monitoring-system-food-contamination>
63. Ghali R, Hmaissia-Khlifa K, Mezigh C, Ghorberl H, Maaroufi K, Maschgoul S, Hedilli A. HPLC determination of Ochratoxin A in a low volume of human blood serum. *Anal Lett*. 2008; 41:757–766. doi: 10.1080/00032710801934528.
64. Goliński P, Grabarkiewicz-Szczęsna J. The first in Poland cases of detection of ochratoxin A residues in human blood. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 1985; 36:378–381.
65. Goliński P, Grabarkiewicz-Szczęsna J., 1989. A trial of determination of the daily dose of ochratoxin A consumed by humans in Poland. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 1989; 40:50–52.
66. González-López NM, Huertas-Ortiz KA, Leguizamon-Guerrero JE, Arias-Cortés MM, Tere-Peña CP, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Omics in the detection and identification of biosynthetic pathways related to mycotoxin synthesis. *Anal Methods*. 2021; 13:4038. doi: 10.1039/d1ay01017d.
67. Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2009; 26:1273–1289. doi: 10.1080/02652030903013260.
68. Gottschalk C, Biermaier B, Gross M, Schwaiger K, Gareis M. Ochratoxin A in brewer's yeast used as food supplement. *Mycotoxin Res*. 2016; 32(1):1-5. doi: 10.1007/s12550-015-0230-x.
69. Grajewski J, Jarzemski P, Twarużek M, Kuźminska K, Trępała M. The level of ochratoxin a in patients after nephrectomy. *Mycotoxin Res*. 2007; 23(1):22-26. doi: 10.1007/BF02946020.
70. Grajewski J, Moraczewska J, Fogt K, Twarużek M. Capacity of blood albumins to bind ochratoxin A and roridin A. *Med Weter*. 2008; 64(5):650-653.

71. Grenier B, Oswald IP. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin J.* 2011; 4:285–313. doi: 10.3920/WMJ2011.1281.
72. Habler K, Gotthardt M, Schüler J, Rychlik M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chem.* 2017; 218:447-454. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.100
73. Habler K, Rychlik M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408(1):307-317. doi: 10.1007/s00216-015-9110-7.
74. Habschied K, Krska R, Sulyok M, Šarkanj B, Krstanović V, Lalić A, Šimić G, Mastanjević K. Screening of Various Metabolites in Six Barley Varieties Grown under Natural Climatic Conditions (2016–2018). *Microorganisms.* 2019; 7(11):532. doi: 10.3390/microorganisms7110532.
75. Habschied K, Šarkanj B, Klapac T, Krstanović V. Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions. *Food Chem.* 2011; 129(2):329-332. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.064.
76. Hagelberg S, Hult K, Fuchs R. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol.* 1989; 9(2):91-96. doi: 10.1002/jat.2550090204.
77. Hajok I, Kowalska A, Piekut A, Ćwieląg-Drabek M. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. *Food Chem.* 2019; 284:264-269. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.101.
78. Heilmann W, Rehfeldt A, Rotzoll F. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *Eur Food Res Technol.* 1999; 209:297–300. doi: 10.1007/s002170050497.
79. Hornsey I. *A History of Beer and Brewing*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003.
80. Howard PC, Eppley RM, Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovach RM, Bucci TJ. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect.* 2001;109(Suppl 2):277-282. doi: 10.1289/ehp.01109s2277.
81. IARC (International Agency for Research on Cancer). *Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.* Int Agen Res Cancer, Lyon, France. 1993; 56,489.
82. Janić Hajnal E, Kos J, Malachová A, Steiner D, Stranska M, Krska R, Sulyok M. Mycotoxins in maize harvested in Serbia in the period 2012-2015. Part 2: Non-regulated mycotoxins and

- other fungal metabolites [published correction appears in Food Chem. 2021 Aug 15;353:129524]. Food Chem. 2020; 317:126409. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126409.
83. Janik E, Niemcewicz M, Podogrocki M, Ceremuga M, Gorniak L, Stela M, Bijak M. The Existing Methods and Novel Approaches in Mycotoxins' Detection. *Molecules*. 2021; 26(13):3981. doi: 10.3390/molecules26133981.
  84. Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarc'h A, Lebrihi A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2011; 28(11):1590-1609. doi: 10.1080/19440049.2011.595377.
  85. Jasińska I, Kołodziejczyk P, Michniewicz J. Rye seed as a potential source of pro-health compounds in diet. *Food Sci. Technol. Qual*. 2006; 2:85–92.
  86. Jedziniak P, Łukasz P, Pietruszka K, Posyniak A. Multiple mycotoxins analysis in animal feed with LC-MS/MS: Comparison of extract dilution and immunoaffinity clean-up. *J Sep Sci*. 2019; 42:1240–1247. doi: 10.1002/jssc.201801113.
  87. Jeszka-Skowron M, Zgoła-Grześkowiak A, Waśkiewicz A, Stępień Ł, Stanisław E. Positive and negative aspects of green coffee consumption - antioxidant activity versus mycotoxins. *J Sci Food Agric*. 2017; 97(12):4022-4028. doi: 10.1002/jsfa.8269.
  88. Jørgensen K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit Contam*. 1998; 15(5):550-4. doi: 10.1080/02652039809374680.
  89. Juan C, Oueslati S, Mañes J, Berrada H. Multimycotoxin Determination in Tunisian Farm Animal Feed. *J Food Sci*. 2019; 84(12):3885-3893. doi: 10.1111/1750-3841.14948.
  90. Kabak B. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in retail cereal products from Turkey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Control*. 2012; 28(1):1–6. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.04.043
  91. Kalogiouri NP, Papadakis E-N, Maggalou MG, Karaoglanidis GS, Samanidou VF, Menkissoglou-Spiroudi U. Development of a Microwave-Assisted Extraction Protocol for the Simultaneous Determination of Mycotoxins and Pesticide Residues in Apples by LC-MS/MS. *Applied Sciences*. 2021; 11(22):10931. doi: 10.3390/app112210931.
  92. Kaltner F, Rampl C, Rychlik M, Zimmermann T, Rohe A. Development and Validation of a Cost-Effective HPLC-FLD Method for Routine Analysis of Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Corn and Corn Products. *Food Anal. Methods*. 2017; 10:1349–1358. doi: 10.1007/s12161-016-0688-y.
  93. Kamphues J, Coenen M, Kienzle E, Pallauf J, Simon O, Zentek J. *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*. Verlag M.&H. Schaper Alfeld-Hannover, Germany, 2004.

94. Kiš M, Vulić A, Kudumija N, Šarkanj B, Jaki Tkalec V, Aladić K, Škrivanko M, Furmeg S, Pleadin J. A Two-Year Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 Toxin in Croatian Cereals Relative of the Regional Weather. *Toxins (Basel)*. 2021; 13(1):39. doi: 10.3390/toxins13010039.
95. Klarić MS, Cvetnić Z, Pepeljnjak S, Kosalec I. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2009; 60(4):427-434. doi: 10.2478/10004-1254-60-2009-1975.
96. Kolawole O, Meneely J, Petchkongkaew A, Elliott C. A review of mycotoxin biosynthetic pathways: associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. *Fungal Biol Rev*. 2021; 37:8-26. doi: 10.1016/j.fbr.2021.04.003.
97. Kos J, Janić Hajnal E, Malachová A, Steiner D, Stranska M, Krska R, Poschmaier B, Sulyok M. Mycotoxins in maize harvested in Republic of Serbia in the period 2012-2015. Part 1: Regulated mycotoxins and its derivatives. *Food Chem*. 2020; 312:126034. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126034.
98. Kostelanska M, Zachariasova M, Lacina O, Fenclova M, Kollos AL, Hajslova J. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chem*. 2011; 126(4):1870-6. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.008.
99. Kotowski K, Grabarkiewicz-Szczesna J, Waskiewicz A, Kostecki M, Golinski P. Ochratoxin A in porcine blood and in consumed feed samples. *Mycotoxin Res*. 2000; 16(2):66-72. doi: 10.1007/BF02946106
100. Křížová L, Richter M, Pavlok S, Veselý A. 2014. Distribution of mycotoxins deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA) and T-2 and HT-2 toxins in maize silage in various profile of the trench silo during feed-out phase. *Cattle Res*. 2014; 2:2–8.
101. Krogh P, Hald B, Plestina R, Ceović S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1977; 85(3):238-240. doi: 10.1111/j.1699-0463.1977.tb01702.x.
102. Krska R, Schuhmacher R, Grasserbauer M, Scott PM. Determination of the *Fusarium* mycotoxin beauvericin at micrograms/kg levels in corn by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A*. 1996; 746(2):233-238. doi: 10.1016/0021-9673(96)00329-9.
103. Krysińska-Traczyk E, Perkowski J, Dutkiewicz J. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2007; 14(1):159–167.



104. Labuda R, Parich A, Berthiller F, Tancinová D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *Int J Food Microbiol.* 2005; 105(1):19-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.005.
105. Lancova K, Hajslova J, Poustka J, Krplova A, Zachariasova M, Dostalek P, Sachambula L. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008; 25(6):732-44. doi: 10.1080/02652030701779625.
106. Langseth W, Rundberget T. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia.* 1999; 147;157–165. doi: 10.1023/a:1007153416269.
107. Langseth W., Rundberget T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A.* 1998; 815(1):103–121. doi: 10.1016/s0021-9673(98)0038.
108. Lattanzio VMT, von Holst C, Lippolis V, De Girolamo A, Logrieco AF, Mol HGJ, Pascale M. Evaluation of Mycotoxin Screening Tests in a Verification Study Involving First Time Users. *Toxins.* 2019; 11(2):129. doi: 10.3390/toxins11020129.
109. Lee MR. The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *J R Coll Physicians Edinb.* 2009; 39(2):179-84.
110. Lerda D, Pelliccioni P, Biagi M, Scalone G, Vallejos R, Stout M, Mezzano J, Flanagan C, Litterio N. Roasting coffee beans (*Coffea arabica*) artificially contaminated with ochratoxin A strongly reduces the analytical ochratoxin A content but not the genotoxic effects. *Curr Top Toxicol.* 2013; 9:75–80.
111. Levi CP, Trenk HL, Mohr HK. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J Assoc Off Anal Chem.* 1974; 57(4):866-70.
112. Li Y, Zhou, Y-C, Yang M-H, Ou-Yang Z. Natural occurrence of citrinin in widely consumed traditional Chinese food red yeast rice, medicinal plants and their related products. *Food Chem.* 2012; 132:1040–1045. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.051.
113. Lima HC, Porto EA, Marins JR, Alves RM, Machado RR, Braga KN, de Paiva FB, Carmo GM, Silva e Santelli AC, Sobel J. Outbreak of beriberi in the state of Maranhão, Brazil: revisiting the mycotoxin aetiologic hypothesis. *Trop Doct.* 2010; 40(2):95-7. doi: 10.1258/td.2009.090439.
114. Liu C, Van der Fels-Klerx HJ. Quantitative Modeling of Climate Change Impacts on Mycotoxins in Cereals: A Review. *Toxins.* 2021; 13(4):276. doi: 10.3390/toxins13040276.
115. Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A.* 2014; 1362:145-56. doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.037.

116. Malir F, Louda M, Ostry V, Toman J, Ali N, Grosse Y, Malirova E, Pacovsky J, Pickova D, Brodak M, Pfohl-Leszkwicz A, Degen GH. Analyses of biomarkers of exposure to nephrotoxic mycotoxins in a cohort of patients with renal tumours. *Mycotoxin Res.* 2019; 35(4):391-403. doi: 10.1007/s12550-019-00365-9.
117. Malir F, Severa J, Roubal T, Kacerovsky J, Fixa P, Moucka P, Zahradnik J, Knizek J, Osterreicher J, Brndiar M, Cerna M. The dialysis of Ochratoxin A (OTA). *Mycotoxin Res.* 2001; 17 Suppl 2:129-31. doi: 10.1007/BF03036420.
118. Mankevičienė A, Butkutė B, Dabkevičius Z. Peculiarities of cereal grain co-contamination with *Fusarium* mycotoxins. *Zemdirbyste-Agriculture* 2011b; 98:415–420.
119. Mankevičienė A, Butkutė B, Gaurilčikienė I, Dabkevičius Z, Supronienė S. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control.* 2011a; 22:970–976. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.12.004.
120. Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B<sub>1</sub>, isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 1988; 55:197–203.
121. Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L. Aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins (Basel).* 2018; 10(6):214. doi: 10.3390/toxins10060214.
122. Martinez-Miranda MM, Moreano MR, Ocampo G.T. Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control.* 2018, 98:359-366. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.046.
123. Martins HM, Marques M, Almeida I, Guerra MM, Bernardo F. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. *Mycotoxin Res.* 2008; 24(1):19-23. doi: 10.1007/BF02985266.
124. Masching S, Naehrer K, Schwartz-Zimmermann H-E, Sărăndan M, Schaumberger S, Dohnal I, Nagl V, Schatzmayr D. Gastrointestinal Degradation of Fumonisin B<sub>1</sub> by Carboxylesterase FumD Prevents Fumonisin Induced Alteration of Sphingolipid Metabolism in Turkey and Swine. *Toxins.* 2016; 8(3):84. doi: 10.3390/toxins8030084.
125. Medina A, Jiménez M, Gimeno-Adelantado JV, Valle-Algarra FM, Mateo R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *J Chromatogr A.* 2005; 1083(1-2):7-13. doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.089.
126. Medina A, Valle-Algarra FM, Gimeno-Adelantado JV, Mateo R, Mateo F, Jiménez M. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *J Chromatogr A.* 2006; 1121(2):178-83. doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.034.

127. Metzler M, Pfeiffer E, Hildebrand, A. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin J.* 2010; 3(4):385–401. doi: 10.3920/wmj2010.1244.
128. Miraglia M, Brera C. Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States. Report of SCOOP Task 3.2.7. 2002. dostępne 22.03.2022 na: [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/ochratoxin\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/ochratoxin_en)
129. Miraglia M, De Santis B, Minardi V, Debegnach F, Brera C. The role of sampling in mycotoxin contamination: an holistic view. *Food Addit Contam.* 2005; 22 Suppl 1:31-36. doi: 10.1080/02652030500389055.
130. Mohr AI, Lorenz I, Baum B, Hewicker-Trautwein M, Pfaffl M, Dzidić A, Meyer HH, Bauer J, Meyer K. Influence of oral application of mycophenolic acid on the clinical health status of sheep. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2007; 54(2):76-81. doi: 10.1111/j.1439-0442.2007.00914.x.
131. Monbaliu S, Van Poucke C, Detavernier C, Dumoulin F, Van De Velde M, Schoeters E, Van Dyck S, Averkieva O, Van Peteghem C, De Saeger S. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(1):66-71. doi: 10.1021/jf903859z.
132. Monson MS, Coulombe RA, Reed KM. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B<sub>1</sub> in Poultry. *Agriculture.* 2015; 5(3):742-777. doi: 10.3390/agriculture5030742.
133. Monti SM, Fogliano V, Logrieco A, Ferracane R, Ritieni A. Simultaneous determination of beauvericin, enniatins, and fusaproliferin by high performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(8):3317-3320. doi: 10.1021/jf990373n.
134. Mostrom MS, Raisbeck MF. Trichothecenes. In *Veterinary Toxicology*, 1st ed.; Gupta RC., Ed.; Elsevier: New York, NY, USA. 2007; pp 951–976. doi: 10.1016/B978-0-12-370467-2.X5095-0.
135. Mujahid C, Savoy M-C, Baslé Q, Woo PM, Ee ECY, Mottier P, Bessaire T. Levels of Alternaria Toxins in Selected Food Commodities Including Green Coffee. *Toxins.* 2020; 12(9):595. doi: 10.3390/toxins12090595.
136. Munawar H, Safaryan AHM, De Girolamo A, Garcia-Cruz A, Marote P, Karim K, Lippolis V, Pascale M, Piletsky SA. Determination of Fumonisin B<sub>1</sub> in maize using molecularly imprinted polymer nanoparticles-based assay. *Food Chem.* 2019; 298:125044. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125044.
137. Muñoz-Solano B, González-Peñas E. Mycotoxin Determination in Animal Feed: An LC-FLD Method for Simultaneous Quantification of Aflatoxins, Ochratoxins and Zearelanone in This Matrix. *Toxins (Basel).* 2020; 12(6):374. doi: 10.3390/toxins12060374.

138. Nagl V, Woechtl B, Schwartz-Zimmermann HE, Hennig-Pauka I, Moll WD, Adam G, Berthiller F. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicol Lett.* 2014; 229(1): 190–197. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.06.032.
139. Nathanail AV, Syvähuoko J, Malachová A, Jestoi M, Varga E, Michlmayr H, Adam G, Sieviläinen E, Berthiller F, Peltonen K. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(16):4745-55. doi: 10.1007/s00216-015-8676-4.
140. Nowak A, Mueller A. Biomin Mycotoxin Survey Polska. 2020. dostępne 18.02.2022 na: <https://www.mycotoxins.info/>
141. Nyandieka HS, Maina JO, Nyamwange C. Destruction of aflatoxins in contaminated maize samples using ammoniation procedures. *East Central Africa J Pharm Sci.* 2009; 12:47-51.
142. Ochiai R, Jokura H, Suzuki A, Tokimitsu I, Ohishi M, Komai N, Rakugi H, Ogihara T. Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertens Res.* 2004; 27(10):731-7. doi: 10.1291/hypres.27.731.
143. Odhav B, Naicker V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit Contam.* 2002; 19(1):55-61. doi: 10.1080/02652030110053426.
144. Onami JI, Watanabe M, Yoshinari T, Hashimoto R, Kitayama M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kamata Y, Takahashi H, Kawakami H, Terajima J. Fumonisin-production by *Aspergillus* section Nigri isolates from Japanese Foods and Environments. *Food Saf (Tokyo).* 2018; 6(2):74-82. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.2018005.
145. Ortiz A, Carrillo N, Elghannam A, Escribano M, Gaspar P. Views of Farmers and Industrial Entrepreneurs on The Iberian Pig Quality Standard: An In-Depth Interview Research Study. *Animals (Basel).* 2020; 10(10):1772. doi: 10.3390/ani10101772.
146. Osteresch B, Cramer B, Humpf HU. Analysis of ochratoxin A in dried blood spots - Correlation between venous and finger-prick blood, the influence of hematocrit and spotted volume. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016; 1020:158-64. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.03.026.
147. Otsuki T, Wilson JS, Sewadeh M. Saving two in a billion: Quantifying the trade effect of European Food Safety Standards on African exports. *Food Policy.* 2001; 26(5):495–514. doi: 10.1016/S0306-9192(01)00018-5.
148. Özçelik N, Koşar A, Soysal D. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol Lett.* 2001; 121(1):9-13. doi: 10.1016/s0378-4274(00)00291-5.

149. Parikka P, Hakala K, Tiilikkala K. Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2012; 29(10):1543-1555. doi: 10.1080/19440049.2012.680613.
150. Pascale MN. Detection Methods for Mycotoxins in Cereal Grains and Cereal Products. *Proc Nat Sci, Matica Srpska Novi Sad.* 2009; 117:15-25. doi: 10.2298/zmspn0917015p.
151. Pascari X, Ortiz-Solá J, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V. Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. *LWT.* 2018; 92:87–91. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.021.
152. Peters J, van Dam R, van Doorn R, Katerere D, Berthiller F, Haasnoot W, Nielen MWF. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS One.* 2017; 12(10):e0185887. doi: 10.1371/journal.pone.0185887.
153. Piacentini KC, Savi GD, Olivo G, Scussel VM. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control,* 2015; 50:925–929. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.10.038.
154. Pickova D, Ostry V, Toman J, Malir F. Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation. *Toxins.* 2021; 13(6):399. doi: 10.3390/toxins13060399.
155. Pleadin J, Staver MM, Markov K, Frece J, Zadavec M, Jaki V, Krupić I, Vahčić N.. Mycotoxins in organic and conventional cereals and cereal products grown and marketed in Croatia. *Mycotoxin Res.* 2017; 33(3):219-227. doi: 10.1007/s12550-017-0280-3.
156. Puel O, Tadrst S, Galtier P, Oswald IP, Delaforge M. *Byssochlamys nivea* as a source of mycophenolic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(1):550-553. doi: 10.1128/AEM.71.1.550-553.2005.
157. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2009; 8(3):202–251. doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.0.
158. RASFF Data, dostępne 18.03.2022 na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>
159. Razzazi-Fazeli E, Reiter EV. Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: principles, applications and recent developments. In: De Saeger S, ed. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*, Woodhead Publishing Limited; 2011; 37–70. doi: 10.1533/9780857090973.1.37.
160. Remža J, Lacko-Bartošová M, Kosík T. *Fusarium* mycotoxin content of Slovakian organic and conventional cereals. *J Cen Eur Agric.* 2016; 17:164–175. doi: 10.5513/JCEA01/17.1.1686.
161. Ren P, Ahearn DG, Crow SA Jr. Mycotoxins of *Alternaria alternata* produced on ceiling tiles. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998; 20(1):53-4. doi: 10.1038/sj.jim.2900477.

162. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. *Int J Food Microbiol.* 2007; 119(1-2):3-10. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019.
163. Rocznik Statystyczny Handlu Zagranicznego; Główny Urząd Statystyczny: Warszawa, Polska, ISSN 0079-2691, 2017. dostępne 18.02.2022 na: <https://www.stat.gov.pl/>
164. Rocznik Statystyczny Rolnictwa; Główny Urząd Statystyczny: Warszawa, Polska, ISSN 2080-8798, 2018. dostępne 18.02.2022 na: <https://www.stat.gov.pl/>
165. Rodríguez-Blanco M, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biol.* 2021; 125(2):103–114. doi: 10.1016/j.funbio.2019.08.006.
166. Rodríguez-Carrasco Y, Fattore M, Albrizio S, Berrada H, Mañes J. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chem.* 2015; 178:149-55. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.092.
167. Romagnoli B, Ferrari M, Bergamini C. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2010; 45(9):1075-80. doi: 10.1002/jms.1802.
168. Royer D, Humpf HU, Guy PA. Quantitative analysis of *Fusarium* mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam.* 2004; 21(7):678-692. doi: 10.1080/02652030410001711304.
169. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 105/2010 z dnia 5 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do ochratoksyny A. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2010; L 35/7-8.
170. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1058/2012 z dnia 12 listopada 2012 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów aflatoksyn w suszonych figach. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2012; L 313/14-15.
171. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1126/2007 z dnia 28 września 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do toksyn *Fusarium* w kukurydzy i produktach z kukurydzy. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2007; L 255/14-17.
172. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 165/2010 z dnia 26 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do aflatoksyn. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2010; L 50/8-12.

173. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. 2006; L 364/5-24.
174. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 2015/1137 z dnia 13 lipca 2015 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższego dopuszczalnego poziomu ochratoksyny A w przyprawach *Capsicum* spp. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. 2015; L 185/11-12.
175. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 519/2014 z dnia 16 maja 2014 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 401/2006 w odniesieniu do metody pobierania próbek z dużych partii, przypraw i suplementów żywnościowych, kryteriów skuteczności dla toksyn T-2, HT-2 i cytryniny oraz przesiewowych metod analizy. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. 2014; L147, 29–43.
176. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 594/2012 z dnia 5 lipca 2012 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych zanieczyszczeń ochratoksyną A, polichlorowanymi bifenylami o działaniu niepodobnym do dioksyn i melaminą w środkach spożywczych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. 2012; L 176/43-45.
177. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. 2006; L 70/12-34.
178. Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r. w sprawie wydajności metod analitycznych w odniesieniu do pozostałości substancji farmakologicznie czynnych stosowanych u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, oraz interpretacji wyników, jak również w sprawie metod stosowanych do pobierania próbek oraz uchylające decyzje 2002/657/WE i 98/179/WE. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej. 2021; L 180/84-109.
179. Rychlik M, Humpf HU, Marko D, et al Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin Res.* 2014; 30(4):197-205. doi: 10.1007/s12550-014-0203-5
180. Santana Oliveira I, da Silva Junior AG, de Andrade CAS, Lima Oliveira MD. Biosensors For Early Detection Of Fungi Spoilage And Toxigenic And Mycotoxins In Food. *Curr Opin Food Sci.* 2019; 29:64–79. doi: 10.1016/j.cofs.2019.08.004.
181. Schaarschmidt S, Faulh-Hassek C. Mycotoxins during the Processes of Nixtamalization and Tortilla Production. *Toxins (Basel).* 2019; 11(4):227. doi: 10.3390/toxins11040227.
182. Schneweis I, Meyer K, Hörmansdorfer S, Bauer J. Mycophenolic acid in silage. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(8):3639-3641. doi: 10.1128/AEM.66.8.3639-3641.2000.
183. Schollenberger M, Müller H-M, Ernst K, Sondermann S, Liebscher M, Schlecker C, Wischer G, Drochner W, Hartung K, Piepho H-P. Occurrence and Distribution of 13 Trichothecene Toxins in

- Naturally Contaminated Maize Plants in Germany. *Toxins*. 2012; 4(10):778-787. doi: 10.3390/toxins4100778.
184. Seefelder W, Knecht A, Goßmann M, Kleta S, Büttner C, Humpf HU. Occurrence of Fumonisin in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) from Germany. *Mycotoxin Res.* 2004;20(1):29-30. doi: 10.1007/BF02946706.
  185. Sforza S, Dall'asta C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2006; 25(1):54-76. doi: 10.1002/mas.20052.
  186. Shephard GS. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2008; 25(10):1246-56. doi: 10.1080/02652030802036222.
  187. Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, Arriola E, Nishimura P, Kawano M, Holt CD. Mycophenolate mofetil. *Pharmacotherapy.* 1997; 17(6):1178-1197. doi: 10.1002/j.1875-9114.1997.tb03082.x.
  188. Sipos P, Peles F, Brassó DL, Béri B, Pusztahelyi T, Pócsi I, Győri Z. Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. *Toxins*. 2021; 13(3):204. doi: 10.3390/toxins13030204.
  189. Skarkova J, Ostry V, Malir F, Roubal T. The determination of ultra-trace amounts of ochratoxin A in foodstuffs by HPLC method. *Anal Lett.* 2013; 46:1495–1504. doi: 10.1080/00032719.2013.771266.
  190. Solfrizzo M, Piemontese L, Gambacorta L, Zivoli R, Longobardi F. Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *J Agric Food Chem.* 2015; 63(13):3609-14. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00326.
  191. Spanjer MC, Scholten JM, Kastrup S, Jörissen U, Schatzki TF, Toyofuku N. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing?. *Food Addit Contam.* 2006; 23(1):73-83. doi: 10.1080/02652030500260439.
  192. Stanciu O, Juan C, Berrada H, Miere D, Loghin F, Mañes J. Study on Trichothecene and Zearalenone Presence in Romanian Wheat Relative to Weather Conditions. *Toxins*. 2019; 11(3):163. doi: 10.3390/toxins11030163.
  193. Storm IMLD, Kristensen NB, Raun BML, Smedsgaard J, Thrane U. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *J Appl Microbiol.* 2010; 109:1017–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x.
  194. Streit E, Schwab C, Sulyok M, Naehrer K, Krska R, Schatzmayr G. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins (Basel).* 2013; 5(3):504-523. doi: 10.3390/toxins5030504.



195. Suarez-Quiroz M, Louise BD, Gonzalez-Rios O, Barel M, Guyot B, Schorr-Galindo S, Guiraud, J-P. The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *Int J Food Sci Technol*. 2005; 40(6):605–611. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00958.x.
196. Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006; 20(18):2649-2659. doi: 10.1002/rcm.2640.
197. Sweeney MJ, Dobson AD. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 1999; 175(2):149-63. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13614.x.
198. Tangni EK, Ponchaut S, Maudoux M, Rozenberg R, Larondelle Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit Contam*. 2002; 19(12):1169-79. doi: 10.1080/02652030210007859.
199. Tapia MO, Stern MD, Koski RL, Bach A, Murphy MJ. Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters. *Anim Feed Sci Technol*. 2002; 97:239–246. doi: 10.1016/S0377-8401(02)00007-X.
200. Tapia MO, Stern MD, Soraci AL, Meronuck R, Olson W, Gold S, Koski-Hulbert R, Murphy MJ. Patulin-producing molds in corn silage and high moisture corn and effects of patulin on fermentation by ruminal microbes in continuous culture. *Anim Feed Sci Technol*. 2005; 119:247–258. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2004.12.002.
201. Tarazona A, Gómez JV, Jiménez M, Mateo F, Romera D, Mateo EM. Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. *Food Control*. 2020; 118:107370. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107370.
202. Thom E. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. *J Int Me. Res*. 2007; 35(6):900–908. doi: 10.1177%2F147323000703500620.
203. Tonti S, Mandrioli M, Nipoti P, Pisi A, Toschi TG, Prodi A. Detection of Fumonisin in Fresh and Dehydrated Commercial Garlic. *J Agric Food Chem*. 2017; 65(32):7000–7005. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02758.
204. Torović L. Aflatoxins and ochratoxin A in flour: a survey of the Serbian retail market. *Food Addit Contam Part B Surveill*. 2018; 11(1):26-32. doi: 10.1080/19393210.2017.1391335.
205. Trucksess MW, Whitaker TB, Weaver CM, Slate A, Giesbrecht FG, Rader JI, Betz JM. Sampling and analytical variability associated with the determination of total aflatoxins and ochratoxin A in powdered ginger sold as a dietary supplement in capsules. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(2):321-5. doi: 10.1021/jf8017854.

206. Tutelyan VA, Zakharova LP, Sedova IB, Perederyaev OI, Aristarkhova TV, Eller KI. Fusariotoxins in Russian Federation 2005-2010 grain harvests. *Food Addit Contam Part B Surveill.* 2013; 6:139–145. doi: 10.1080/19393210.2013.767862.
207. Twarużek M, Błajet-Kosicka A, Grajewski J. Occurrence of aflatoxins in selected spices in Poland. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 2013; 8:57-60. doi: 10.1007/s00003-013-0813-4.
208. Vaclavik L, Vaclavikova M, Begley TH, Krynitsky AJ, Rader JI. Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). *J Agric Food Chem.* 2013; 61(20):4822-30. doi: 10.1021/jf401139u.
209. Van der Fels-Klerx H, Stratakou I. T-2 toxin and HT-2 toxin in grain and grain-based commodities in Europe: occurrence, factors affecting occurrence, co-occurrence and toxicological effects. *World Mycotoxin J.* 2010; 3(4):349–367. doi: 10.3920/wmj2010.1237.
210. van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care.* 2009; 32(6):1023-5. doi: 10.2337/dc09-0207.
211. van Egmond HP, Jonker MA, 2004. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003.* Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Italy, Rome, ISBN 92-5-105162-3.
212. Varga E, Glauner T, Köppen R, Mayer K, Sulyok M, Schuhmacher R, Krska R, Berthiller F. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 402(9):2675-86. doi: 10.1007/s00216-012-5757-5.
213. Varga E, Malachova A, Schwartz H, Krska R, Berthiller F. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2013; 30(1):137-46. doi: 10.1080/19440049.2012.726745.
214. Venkatesh N, Keller NP. Mycotoxins in Conversation With Bacteria and Fungi. *Front Microbiol.* 2019; 10:403. doi: 10.3389/fmicb.2019.00403.
215. Vidal A, Claeys L, Mengelers M, Vanhoorne V, Vervaeke C, Huybrechts B, De Saeger S, De Boevre M. Humans significantly metabolize and excrete the mycotoxin deoxynivalenol and its modified form deoxynivalenol-3-glucoside within 24 hours. *Sci Rep.* 2018; 8:5255. doi: 10.1038/s41598-018-23526-9.
216. Vidal JC, Bertolín JR, Ezquerro A, Hernández S, Castillo JR. Rapid simultaneous extraction and magnetic particle-based enzyme immunoassay for the parallel determination of ochratoxin A,

- fumonisin B<sub>1</sub> and deoxynivalenol mycotoxins in cereal samples. *Analytical Methods*, 2017; 9(24): 3602–3611. doi: 10.1039/c7ay00386b.
217. Walker R, Larsen JC. Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Addit Contam.* 2005; 22 Suppl 1:6-9. doi: 10.1080/02652030500309343.
  218. Walpole SC, Prieto-Merino D, Edwards P, Cleland J, Stevens G, Roberts I. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. *BMC Public Health.* 2012; 12:439. doi: 10.1186/1471-2458-12-439.
  219. Walter S, Nicholson P, Doohan FM. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytol.* 2010; 185(1):54-66. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x
  220. Wang H, Peng H, Li W, Cheng P, Gong M. The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Front. Microbiol.* 2021; 12:705343. doi: 10.3389/fmicb.2021.705343.
  221. Wang SK, Wang TT, Huang GL, Shi RF, Yang LG, Sun GJ. Stimulation of the proliferation of human normal esophageal epithelial cells by fumonisin B<sub>1</sub> and its mechanism. *Exp Ther Med.* 2014; 7(1):55-60. doi: 10.3892/etm.2013.1364.
  222. Wangia-Dixon RN, Nishimwe K. Molecular toxicology and carcinogenesis of fumonisins: a review. *J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog.* 2021; 39(1):44-67. doi: 10.1080/26896583.2020.1867449.
  223. Wannop CC. Groundnut Toxicity in Poultry: Turkey X Disease. *Br. Vet. J.* 1963; 119:174–177.
  224. Weng MW, Lee HW, Choi B, Wang H, Hu Y, Mehta M, Desai D, Amin S, Zheng Y, Tang M. AFB<sub>1</sub> hepatocarcinogenesis is via lipid peroxidation that inhibits DNA repair, sensitizes mutation susceptibility and induces aldehyde-DNA adducts at p53 mutational hotspot codon 249. *Oncotarget.* 2017; 8(11):18213-18226. doi: 10.18632/oncotarget.15313.
  225. Whitaker T. Reducing variability of a mycotoxin test procedure. In: Whitaker T, Slate A, Doko B, Maestroni B, Cannavan A, eds. *Sampling Procedures to Detect Mycotoxin in Agricultural Commodities*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, The Netherlands; 2010. doi: 10.1007/978-90-481-9634-0\_9.
  226. Wolf-Hall CE. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int J Food Microbiol.* 2007; 119(1-2):89-94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.030.
  227. World Bank. *Food Safety and Agricultural Health Standards : Challenges and Opportunities for Developing Country Exports.* Washington, DC. World Bank. 2005. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/8491>
  228. Wu F. Global impacts of aflatoxin in maize: trade and human health. *World Mycotoxin J.* 2015; 8(2):137-142. doi: 10.3920/WMJ2014.1737.

229. Yang S, Luo Y, Mu L, Yang Y, Yang Y. Risk screening of mycotoxins and their derivatives in dairy products using a stable isotope dilution assay and LC-MS/MS. *J Sep Sci.* 2021; 44(4):782-792. doi: 10.1002/jssc.202000822.
230. Yoshinari T, Takeuchi H, Aoyama K, Taniguchi M, Hashiguchi S, Kai S, Ogiso M, Sato T, Akiyama Y, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Ishikuro E, Sugita-Konishi Y. Occurrence of four *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin, and HT-2 toxin, in wheat, barley, and Japanese retail food. *J Food Prot.* 2014; 77(11):1940-6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-185.
231. Zachariasova M, Dzuman Z, Veprikova Z, Hajkova K, Jiru M, Vaclavikova M, Zachariasova A, Pospichalova M, Florian M, Hajslova J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Anim Feed Sci Technol.* 2014; 193:124–140. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.02.007.
232. Zalecenie Komisji nr 2006/576/WE z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2006; L 229/7-9.
233. Zalecenie Komisji nr 2013/165/UE z dnia 27 marca 2013 r. w sprawie obecności toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2013; L 91/12-15.
234. Zalecenie Komisji nr 2013/637/UE z dnia 4 listopada 2013 r. zmieniające zalecenie 2006/576/WE w odniesieniu do toksyn T-2 i HT-2 w mieszankach paszowych dla kotów. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2013; L 294/44.
235. Zalecenie Komisji nr 2016/1319 z dnia 29 lipca 2016 r. zmieniające zalecenie 2006/576/WE w odniesieniu do deoksyniwalenolu, zearalenonu i ochratoksyny A w karmie dla zwierząt domowych. *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej.* 2016; L 229/58-60.
236. Zhang K, Banerjee K. A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins (Basel).* 2020; 12(9):539. doi: 10.3390/toxins12090539.
237. Zhang K, Schaab MR, Southwood G, Tor ER, Aston LS, Song W, Eitzer B, Majumdar S, Lapainis T, Mai H, Tran K, El-Demerdash A, Vega V, Cai Y, Wong JW, Krynitsky AJ, Begley TH. A Collaborative Study: Determination of Mycotoxins in Corn, Peanut Butter, and Wheat Flour Using Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J Agric Food Chem.* 2017; 65(33):7138-7152. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04872.
238. Zhang S, Zhou S, Gong YY, Zhao Y, Wu Y. Human dietary and internal exposure to zearalenone based on a 24-hour duplicate diet and following morning urine study. *Environ Int.* 2020; 142:105852. doi: 10.1016/j.envint.2020.105852.
239. Zhong L, Carere J, Lu Z, Lu F, Zhou T. Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins.* 2018; 10(11):475. doi: 10.3390/toxins10110475.

240. Zöllner P, Berner D, Jodlbauer J, Lindner W. Determination of zearalenone and its metabolites alpha- and beta-zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000; 738(2):233-41. doi: 10.1016/s0378-4347(99)00521-6.
241. Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2006; 1136(2):123-69. doi: 10.1016/j.chroma.2006.09.055.
242. Zougagh M, Ríos A. Supercritical fluid extraction of macrocyclic lactone mycotoxins in maize flour samples for rapid amperometric screening and alternative liquid chromatographic method for confirmation. *J Chromatogr A.* 2008; 1177(1):50-57. doi: 10.1016/j.chroma.2007.11.021.

## Prace naukowe wchodzące w skład cyklu



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Animal Feed Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/anifeedsci](http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci)

## Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs



R. Kosicki\*, A. Błajet-Kosicka, J. Grajewski, M. Twarużek

Department of Physiology and Toxicology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Natural Sciences, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz 85064, Poland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2015

Received in revised form 11 March 2016

Accepted 12 March 2016

#### Keywords:

Mycotoxins  
Complete feed  
Raw materials  
Monitoring  
Co-occurrence

### ABSTRACT

Mycotoxins are compounds that can be formed in many raw materials and agricultural products under very different conditions. The study aimed at evaluation of the level of raw materials and products for animal nutrition contamination due to mycotoxins in Poland in 2011–2014. A total of 1384 samples (295 maize samples, 143 maize silage samples, 466 small grain cereal samples and 480 complete feed samples) were analyzed for the occurrence of deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins. Deoxynivalenol as well as zearalenone were the most frequently occurring mycotoxins, present in 89% and 92% of maize samples, respectively. They were also the most common mycotoxins in maize silages—86% and 88% of the samples, respectively. Deoxynivalenol and zearalenone were present in 456 (98%) and 450 (97%) small grains samples. Additionally, in 24 samples the content of mycotoxins exceeded the EU recommendation. Regarding the complete feed, trichothecenes and zearalenone were found in more than 90% of the samples. A moderate to strong positive correlation between DON and ZEN, as well as T-2 toxin and HT-2 toxin contents was observed for all matrices. The four-year survey indicated again that both feed materials and feeding stuffs are contaminated with mycotoxins, and in most cases the samples contained several compounds of interest.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Both man and animals are exposed to undesirable substances that are harmful to their health. These include compounds naturally produced by plants, pollution emitted to the environment from industry, plant protection means or residues of veterinary drugs, that enter both animal and human organism most often through digestive tract. Nowadays, due to introduction of new cultivation techniques (e.g. intensive maize-wheat rotations, higher levels of nitrogen fertilizers) and climate changes, mainly in temperature and precipitation patterns, that have impact on the persistence and occurrence patterns of molds and thus their secondary metabolites—mycotoxins, the latter have become a problem of interest (Tirado et al., 2010; Landschoot et al., 2012).

**Abbreviations:** AF, aflatoxins; OTA, ochratoxin A; FUM, fumonisins; DON, deoxynivalenol; NIV, nivalenol; T2, T-2 toxin; HT2, HT-2 toxin; ZEN, zearalenone; ZAN, zearalanone; MeOH, methanol; ACN, acetonitrile; HPLC, high-performance liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation.

\* Corresponding author. Tel.: +48 52 3419186; fax: +48 52 3608396.

E-mail address: [robkos@ukw.edu.pl](mailto:robkos@ukw.edu.pl) (R. Kosicki).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.012>  
0377-8401/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**  
Feed samples exceeding recommended acceptable level of mycotoxins.

Mycotoxin	Feedingstuff	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
DON	Maize silage	7860 (17830) <sup>a</sup>
	Maize silage	7844 (18260) <sup>a</sup>
	Maize silage	7167 (15930) <sup>a</sup>
	Maize silage	7016 (17440) <sup>a</sup>
	Wheat	8187
	Complete feed (cattle)	5487
T2 + HT2	Maize	2133
	Maize	756
	Maize	563
	Oat	635
	Barley	514
	Complete feed (swine)	459
	Complete feed (swine)	440
	Complete feed (swine)	373
	Complete feed (swine)	314
	Complete feed (swine)	304
	Complete feed (poultry)	279
ZEN	Complete feed (swine)	349
	Complete feed (swine)	339
	Complete feed (poultry)	294
	Complete feed (poultry)	264
	Complete feed (poultry)	252
OTA	Complete feed (swine)	88.0
	Complete feed (cattle)	50.6

<sup>a</sup> Values calculated for a moisture content of 12%.

Mycotoxins are secondary metabolites of molds belonging mainly to the following genera: *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*. They may show acute toxic action, mutagenic (aflatoxins, fumonisins, ochratoxin A, T-2 toxin), teratogenic (ochratoxin A, patulin, aflatoxin B<sub>1</sub>, T-2 toxin), and estrogenic properties (zearalenone). From the health and economic point of view, the most important include, among others, aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, zearalenone, and trichothecenes (Richard and Payne, 2003). Factors affecting molds growth and/or mycotoxins production, and thus contamination of raw materials and feed are associated with field conditions (i.e. temperature and humidity around harvest). Especially the development of fusaria and their metabolites in cereal crops is strongly influenced by weather conditions. Mycotoxins production in the field is also dependent on crop susceptibility, insect or bird damages and mechanical injuries. The temperature and moisture as well as microbial and insect growth are also the main factors influencing the molds and mycotoxins infestation during storage. So, it is very important to apply the pre-harvest control strategies, appropriate harvest management as well as storage conditions to reduce at least the molds growth and mycotoxin production. The way of raw material processing (e.g. ensiling process in case of silages) is not meaningless and may influence the mold and mycotoxins occurrence as well, when its parameters, i.e. the raw material quality, the use of silage additives, silo filling rate or packing tightness are chosen improperly (Miličević et al., 2010; Cheli et al., 2013).

Aflatoxins (AF) are synthesized primarily by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains, particularly in warm climate. The four main compounds are B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>. The plant-origin products most often contain larger quantities of metabolites B<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>. Aflatoxins can be produced by molds, both during storage and in the field, and the main factors that promote contamination are drought stress in plants and wet weather conditions in combination with high temperature during harvest. Ochratoxin A (OTA) is produced by *Penicillium verrucosum* and some *Aspergillus* species: *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius*, particularly in north temperate growing areas. The greatest danger of the ochratoxin A formation occurs during storage of a grain characterized by excessive humidity, which favors the growth of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi. Fumonisin (FUM) are a group of mycotoxins often contaminating maize, frequently accompanied by other mycotoxins. The B<sub>1</sub> form is most common. These toxins are usually produced by fungi of *Fusarium* genus with the most important species: *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. The contamination by fumonisins may occur worldwide but higher content in commodities may be present in warm, dry climate areas. Deoxynivalenol (DON) belongs to a group of trichothecenes produced mainly by fungi such as: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, and *Fusarium nivale*. In addition to DON, other naturally occurring trichothecenes include, among others, nivalenol (NIV), T-2 toxin (T2), HT-2 toxin (HT2), and diacetoxyscirpenol. These compounds are produced most frequently during prolonged periods of cold, during the growing season and harvesting under conditions of high humidity, when the infected grains allow *Fusarium* spores to develop. Zearalenone (ZEN) is produced by: *Fusarium sporotrichoides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, and *Fusarium crookwellence*. Like trichothecenes, it is produced mainly during the growth of plants in the field (Weidenbörner, 2001; Richard, 2007).

Mycotoxins are compounds that can be formed in many raw materials and agricultural products under very different conditions. They are resistant to high and low temperatures, even after prolonged storage, they do not degrade being very



**Table 2**  
Mycotoxin concentrations in maize samples during 4-year period.

Maize <sup>a</sup>	2011								2012								2013								2014							
	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF/DON	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF/DON	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF
Number of samples	43	43	43	43	43	17	30	4	88	88	88	88	88	88	25	19	8	91	91	91	91	91	24	32	16	73	73	73	73	17	32	17
Positive (%) <sup>b</sup>	98	79	79	77	98	59	7	0	76	51	34	32	88	24	16	13	87	82	68	75	88	67	9	0	100	100	97	100	94	13	0	
Mean positive (µg/kg) <sup>b</sup>	624	20.7	45.0	41.5	58.2	550	20.1	–	391	22.1	7.81	13.2	31.3	219	32.2	0.18	494	23.2	10.3	20.0	48.5	83.3	2.39	–	1486	39.0	29.3	62.2	161	307	5.78	–
Mean (µg/kg) <sup>b</sup>	609	16.4	35.6	31.9	56.9	324	1.34	–	298	11.3	2.66	4.21	27.3	52.7	5.08	<LOD	429	19.1	7.03	15.0	42.7	55.5	0.22	–	1486	39.0	28.9	61.3	161	289	0.72	–
Median (µg/kg) <sup>b</sup>	344	7.64	3.47	5.00	28.9	19.2	<LOD	–	95.5	<LOQ	<LOD	<LOD	2.01	<LOD	<LOD	<LOD	253	9.33	0.83	4.09	15.2	21.7	<LOD	–	1066	28.7	9.43	23.9	95.6	75.8	<LOD	–
1st quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	81.2	<LOQ	0.76	<LOQ	6.95	<LOD	<LOD	–	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	39.4	<LOQ	<LOD	<LOQ	2.97	<LOD	<LOD	–	585	11.3	3.03	9.07	35.5	26.5	<LOD	–
3rd quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	998	30.0	16.5	20.3	71.4	57.5	<LOD	–	306	9.25	1.05	<LOQ	22.3	<LOD	<LOD	<LOD	634	24.8	6.09	15.7	55.2	56.7	<LOD	–	2150	46.1	28.3	46.1	256	396	<LOD	–
Maximum (µg/kg)	2027	89.2	434	322	312	1885	32.5	–	3075	251	63.7	105	430	671	86.0	0.18	2473	122	100	239	405	264	5.09	–	6688	550	550	1583	521	1559	11.9	–

LOD and LOQ values (µg/kg): DON 1.0 and 3.0; NIV 1.0 and 3.0; T-2 toxin 0.2 and 0.6; HT-2 toxin 0.7 and 2.0; ZEN 0.07 and 0.20; FB<sub>1</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>2</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>3</sub> 1.6 and 5.0; AFB<sub>1</sub> 0.05 and 0.15; AFB<sub>2</sub> 0.02 and 0.06; AFG<sub>1</sub> 0.25 and 0.75; AFG<sub>2</sub> 0.08 and 0.24; OTA 0.13 and 0.40, respectively.

<sup>a</sup> Dry matter of 85–86%; the results were not corrected for dry matter content.

<sup>b</sup> For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. A positive sample refers to a sample with a result above the limit of detection.

**Table 3**  
Mycotoxin concentrations in maize silage samples during 4-year period.

Maize silage <sup>a</sup>	2011						2012						2013						2014														
	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	OTA	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF
Number of samples	30	30	30	30	30	13	20	8	26	26	26	26	26	26	2	6	0	29	29	29	29	29	4	15	9	58	58	58	2	20	9		
Positive (%) <sup>b</sup>	93	87	40	80	100	31	50	0	46	62	35	42	46	100	17	17	–	93	83	41	86	93	75	47	11	97	86	60	78	97	100	20	0
Mean positive (µg/kg) <sup>b</sup>	874	122	3.67	36.8	121	36.7	2.82	–	70.7	24.4	0.98	4.33	16.6	19.8	1.67	–	322	67.1	0.85	14.6	38.6	14.4	2.08	0.15	1266	84.1	2.49	55.0	101.3	16.3	0.79	–	
Mean (µg/kg) <sup>b</sup>	816	106	1.47	29.4	121	11.3	1.41	–	32.6	15.0	<LOQ	<LOQ	7.65	19.8	<LOQ	–	300	55.5	<LOQ	12.6	36.0	10.8	0.97	<LOQ	1222	72.5	1.50	42.6	97.8	16.3	<LOQ	–	
Median (µg/kg) <sup>b</sup>	271	54.9	<LOQ	6.61	13.8	<LOQ	<LOQ	–	<LOQ	3.27	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19.8	<LOQ	–	211	44.4	<LOQ	5.89	13.1	13.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	482	46.5	<LOQ	21.3	25.4	16.3	<LOQ	–
1st quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	57.9	20.4	<LOQ	2.24	5.00	<LOQ	<LOQ	–	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16.4	<LOQ	–	23.1	14.0	<LOQ	3.43	3.00	9.15	<LOQ	<LOQ	63.0	5.39	<LOQ	3.77	8.75	13.3	<LOQ	–	
3rd quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	594	155	1.46	30.7	53.3	5.00	2.02	–	5.57	10.7	<LOQ	2.60	3.51	23.2	<LOQ	–	428	91.3	<LOQ	18.2	36.1	15.3	0.51	<LOQ	1062	99.1	1.14	60.6	79.6	19.3	<LOQ	–	
Maximum (µg/kg)	4892	447	19.9	185	1133	108	7.47	–	414	261	1.66	13.1	52.3	26.6	1.67	–	1419	167	2.52	57.8	260	15.9	10.2	0.15	7860	549	31.2	204	696	22.3	1.16	–	

LOD and LOQ values (µg/kg): DON 1.0 and 3.0; NIV 1.0 and 3.0; T-2 toxin 0.2 and 0.6; HT-2 toxin 0.7 and 2.0; ZEN 0.07 and 0.20; FB<sub>1</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>2</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>3</sub> 1.6 and 5.0; AFB<sub>1</sub> 0.05 and 0.15; AFB<sub>2</sub> 0.02 and 0.06; AFG<sub>1</sub> 0.25 and 0.75; AFG<sub>2</sub> 0.08 and 0.24; OTA 0.13 and 0.40, respectively.

<sup>a</sup> Dry matter of 35–40%; the results were not corrected for dry matter content.

<sup>b</sup> For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. A positive sample refers to a sample with a result above the limit of detection.

**Table 4**  
Mycotoxin concentrations in cereal grain samples during 4-year period.

Cereal grain <sup>a</sup>	2011						2012						2013						2014													
	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF
Number of samples	159	159	159	159	159	0	75	35	77	77	77	77	77	77	1	57	27	125	125	125	125	125	2	44	21	105	105	105	105	0	70	33
Positive (%) <sup>b</sup>	96	64	72	77	98	–	41	8	100	94	86	90	95	0	23	0	99	96	79	92	93	0	16	10	98	91	81	100	–	24	3	
Mean positive (µg/kg) <sup>b</sup>	319	14.8	5.16	11.5	29.5	–	9.37	0.17	297	44.9	3.15	9.24	12.8	–	5.62	–	586	49.6	3.96	15.6	10.9	–	7.66	0.15	466	34.1	6.86	19.1	21.0	–	4.62	0.15
Mean (µg/kg) <sup>b</sup>	305	9.51	3.70	8.84	28.7	–	3.87	<LOD	297	42.0	2.70	8.28	12.2	–	1.28	–	582	47.6	3.14	14.4	10.2	–	1.22	<LOD	457	31.2	5.55	17.3	21.0	–	1.12	<LOD
Median (µg/kg) <sup>b</sup>	106	3.13	0.69	2.42	5.72	–	<LOD	<LOD	93.2	19.0	0.84	5.08	3.91	–	<LOD	–	229	12.1	0.63	5.57	1.15	–	<LOD	<LOD	167	10.4	1.15	6.29	2.60	–	<LOD	<LOD
1st quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	20.0	<LOD	<LOD	<LOD	1.43	–	<LOD	<LOD	23.1	4.67	<LOD	<LOD	0.98	–	<LOD	–	67.9	4.35	<LOD	<LOD	0.47	–	<LOD	<LOD	24.3	4.15	<LOD	<LOD	0.79	–	<LOD	<LOD
3rd quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	300	8.50	1.55	5.34	32.7	–	0.96	<LOD	408	39.1	2.50	11.1	10.5	–	<LOD	–	928	32.2	1.95	13.4	5.43	–	<LOD	<LOD	581	31.7	4.98	23.8	9.73	–	<LOD	<LOD
Maximum (µg/kg)	8187	290	149	486	608	–	155	0.19	2044	784	37.9	50.2	205	–	18.8	–	3574	900	82.3	432	387	–	15.7	0.15	2833	271	69.7	133	493	–	37.5	0.15

LOD and LOQ values (µg/kg): DON 1.0 and 3.0; T-2 toxin 0.2 and 0.6; HT-2 toxin 0.7 and 2.0; ZEN 0.07 and 0.20; FB<sub>1</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>2</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>3</sub> 1.6 and 5.0; AFB<sub>1</sub> 0.05 and 0.15; AFB<sub>2</sub> 0.02 and 0.06; AFG<sub>1</sub> 0.25 and 0.75; AFG<sub>2</sub> 0.08 and 0.24; OTA 0.13 and 0.40, respectively.

<sup>a</sup> Dry matter of 87–89%; the results were not corrected for dry matter content.

<sup>b</sup> For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. A positive sample refers to a sample with a result above the limit of detection.

durable. Plant products, that are subsequently processed for animal feed or are a component used for food production, are particularly exposed to their occurrence. Therefore, it is important to control the hygienic condition of feed products and cereals. In recent years, the European Union has introduced a number of regulations and recommendations determining maximum levels of these compounds in products intended for animal consumption (European Commission, 2006, 2011, 2013). After destruction of the mycotoxin-producing flora, they are still present in raw materials or feeds, and only the use of detoxicants binds molecules of toxins in the non-absorbing form within the gut that is excreted in with feces; nevertheless the degree of detoxification is still little recognized. Secondary metabolites of molds have a significant impact on the economy, because they cause losses in the stock of animals, or difficulties in breeding conducting. Furthermore, in accordance with applicable legal regulations, their increased presence makes the products containing them may not be a subject to neither national nor international trade (Binder, 2007).

The purpose of this study was to evaluate the level of raw materials and products for animal nutrition contamination due to mycotoxins in Poland in 2011–2014. The present study is a continuation of research carried out by the authors in 2006–2009 (Grajewski et al., 2012).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples and sampling procedures

Between January 2011 and December 2014, a total of 1384 samples (295 maize samples, 143 maize silage samples, 466 small grain cereal samples and 480 complete feed samples for swine, poultry and cattle) were analyzed for the occurrence of deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins. The samples (approximately 1 kg) from the whole area of Poland were delivered consecutively throughout the entire year by feedstuff producers, farmers and veterinary doctors. All the maize and small grain cereals samples were delivered by the feed producers. Forty-eight maize silage samples as well as 346 complete feed samples came from feed manufacturers, whereas the remaining samples of both matrices (95—maize silage; 134—complete feed) were delivered by farmers and veterinary doctors. Eighty-one (60%) of the complete feed samples as well as 66 (70%) of the maize silage samples delivered by the farmers and veterinary doctors were examined after some breeding problems occurred in farms. The samples were taken by the authorized personnel in compliance with the Commission Regulation No 152/2009 EC (European Commission, 2009). The laboratory staff was not present to oversee the sampling procedure. The samples were ground using a ZM200 mill (Retsch, Germany), mixed thoroughly, and stored in a dark cold room at 4 °C until the analysis.

### 2.2. Chemicals

Aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>, OTA, DON, T-2 toxin, HT-2 toxin, zearalenone, FUM B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub>, <sup>13</sup>C-DON, <sup>13</sup>C-T-2 toxin, <sup>13</sup>C-HT-2 toxin, and zearalanone (ZAN) were purchased from Romer Labs Diagnostics GmbH (Tulln, Austria). Potassium bromide, sodium chloride, ammonium acetate, acetic acid, acetonitrile (gradient grade), and methanol (gradient grade) were purchased from Merck (AG, Germany). Deionized water was obtained using a Simplicity UV water purification system (Millipore, USA).

### 2.3. Mycotoxin analysis

#### 2.3.1. *Fusarium* mycotoxins

2.3.1.1. *Sample preparation of trichothecenes and zearalenone.* A total of 12.5 g of sample was homogenized with 50 mL of ACN:H<sub>2</sub>O (80:20) for 3 min, and the extract was filtered. The aliquot of 40 µL internal standard solution (ZAN; c = 1000 µg/L) was added to 4 mL of the extract and the mixture was applied to a Bond Elut<sup>®</sup> Mycotoxin column (Agilent, USA). Later, to 2 mL of purified extract, 50 µL of internal standards solution (<sup>13</sup>C-DON; c = 2500 µg/L; <sup>13</sup>C-T2; c = 250 µg/L and <sup>13</sup>C-HT2; c = 250 µg/L) was added and the mixture was evaporated to dryness using nitrogen. Then, 495 µL of MeOH:H<sub>2</sub>O (1:4) was added to the vial and the sample was vortexed.

2.3.1.2. *Sample preparation of fumonisins.* For fumonisins analysis, the MultiSep<sup>®</sup> 211 Fum columns were applied according to the procedures recommended by the manufacturers (Romer Labs Diagnostics GmbH, Austria).

2.3.1.3. *Chromatographic analysis of trichothecenes, zearalenone and fumonisins.* Trichothecenes, zearalenone and fumonisins were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) with MS/MS detection. The HPLC was performed using Shimadzu Nexera with Gemini-NX-C18 chromatographic column (150 × 4.6 mm, 3 µm; Phenomenex, USA) using 1% CH<sub>3</sub>COOH in H<sub>2</sub>O (mobile phase A) and MeOH (mobile phase B) with addition of 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> to both mobile phases at a flow rate of 0.5 mL/min and with an injection volume of 7 µL. Mass spectrometry was performed using API 4000 (AB Sciex, USA). Detection (LOD) and quantification (LOQ) limits for DON were 1.0 and 3.0 µg/kg, 1.0 and 3.0 µg/kg for NIV, 0.2 and 0.6 µg/kg for T-2 toxin, 0.7 and 2.0 µg/kg for HT-2 toxin, and 0.07 and 0.20 µg/kg for ZEN, respectively. LOD and LOQ for FB<sub>1</sub> were 1.6 and 5.0 µg/kg, 1.6 and 5.0 µg/kg for FB<sub>2</sub> and 1.6 and 5.0 µg/kg for FB<sub>3</sub>, respectively.

**Table 5**  
Mycotoxin concentrations in complete feed samples during 4-year period.

Complete feed <sup>a</sup>	2011						2012						2013						2014														
	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	DON	NIV	T2	HT2	ZEN	FUM	OTA	AF	
Number of samples	79	79	79	79	79	1	68	52	155	155	155	154	155	0	144	75	97	97	97	97	97	97	6	86	59	149	149	149	149	7	114	55	
Positive (%) <sup>b</sup>	99	58	91	92	99	100	56	4	99	99	98	99	99	–	76	7	100	100	100	100	100	99	67	80	7	98	98	96	97	99	100	61	2
Mean positive (µg/kg) <sup>b</sup>	248	28.0	5.88	15.5	32.9	10.0	6.81	1.05	442	26.6	4.56	8.61	42.5	–	2.70	0.50	629	43.2	14.6	28.6	26.7	49.0	2.76	0.22	567	28.4	8.89	17.8	35.8	329	2.22	0.15	
Mean (µg/kg) <sup>b</sup>	245	16.3	5.36	14.4	32.5	10.0	3.80	<LOQ	439	26.2	4.47	8.50	42.2	–	2.06	<LOQ	629	43.2	14.6	28.6	26.5	32.7	2.22	<LOQ	556	27.8	8.53	17.3	35.3	329	1.37	<LOQ	
Median (µg/kg) <sup>b</sup>	140	6.76	2.23	5.08	19.6	10.0	0.56	<LOQ	323	16.5	3.01	5.56	34.5	–	0.78	<LOQ	495	25.8	4.49	14.1	16.9	<LOQ	0.99	<LOQ	404	20.2	6.24	13.4	20.6	259	0.58	<LOQ	
1st quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	72.9	<LOQ	1.50	3.57	8.15	10.0	<LOQ	<LOQ	208	8.43	1.38	2.87	13.5	–	<LOQ	<LOQ	249	13.0	2.62	6.54	8.09	<LOQ	0.47	<LOQ	245	11.2	2.72	8.15	11.4	175	<LOQ	<LOQ	
3rd quartile (µg/kg) <sup>b</sup>	315	18.6	4.99	11.4	39.1	10.0	1.74	<LOQ	611	35.4	5.31	11.1	53.9	–	1.81	<LOQ	828	60.8	10.5	24.3	34.5	66.2	2.57	<LOQ	667	32.0	11.2	20.6	39.2	308	1.35	<LOQ	
Maximum (µg/kg)	1473	245	58.3	276	294	10.0	88.0	1.26	2504	211	62.5	103	339	–	30.6	1.31	5478	252	185	276	108	99.3	20.0	0.34	4554	253	53.5	118	349	1063	14.7	0.15	

LOD and LOQ values (µg/kg): DON 1.0 and 3.0; NIV 1.0 and 3.0; T-2 toxin 0.2 and 0.6; HT-2 toxin 0.7 and 2.0; ZEN 0.07 and 0.20; FB<sub>1</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>2</sub> 1.6 and 5.0; FB<sub>3</sub> 1.6 and 5.0; AFB<sub>1</sub> 0.05 and 0.15; AFB<sub>2</sub> 0.02 and 0.06; AFG<sub>1</sub> 0.25 and 0.75; AFG<sub>2</sub> 0.08 and 0.24; OTA 0.13 and 0.40, respectively.

<sup>a</sup> Dry matter of 87–89%; the results were not corrected for dry matter content.

<sup>b</sup> For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. A positive sample refers to a sample with a result above the limit of detection.

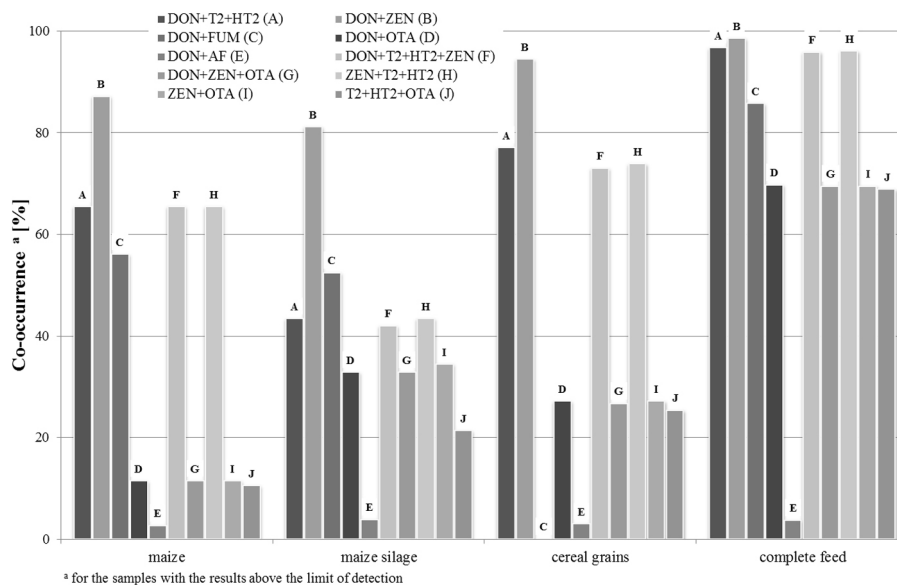


Fig. 1. Co-occurrence of mycotoxins in different feedingstuff matrices.

### 2.3.2. Aflatoxins and ochratoxin A

Extraction, purification and HPLC quantification of aflatoxins and ochratoxin A were performed by the technique described by Blajet-Kosicka et al. (2014a). LOD and LOQ for AFB<sub>1</sub> were 0.05 and 0.15 µg/kg, 0.02 and 0.06 µg/kg for AFB<sub>2</sub>, 0.25 and 0.75 µg/kg for AFG<sub>1</sub>, 0.08 and 0.24 µg/kg for AFG<sub>2</sub>, and 0.13 and 0.40 µg/kg for OTA, respectively.

### 2.4. Statistical analysis

Descriptive statistics (the number of samples, mean, mean of positive samples, median, 1st quartile, 3rd quartile and maximum mycotoxin content) as well as Pearson's correlation coefficient and statistical significance (for the significance level  $\alpha = 0.01$  and 0.05) were calculated using MS Excel 2013 for Windows (Microsoft). For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. A positive sample refers to a sample with a result above the limit of detection. In general, the results were not calculated taking the dry matter content into account. However, regarding the maize silage samples (dry matter of 35–40%) appropriate calculations, related to feedstuffs with a moisture content of 12%, were made in case of samples considered to exceed the EU guidance values (Table 1).

## 3. Results

### 3.1. Mycotoxin occurrence

The results of mycotoxin analysis on maize, maize silage, cereal grain and complete feed samples are shown in Tables 1–5. In 24 samples the content of mycotoxins exceeded the EU recommendation. DON, NIV, T2, HT2, ZEN, FUM, OTA and AF were present in 95%, 85%, 79%, 85%, 96%, 59%, 47% and 5% of all the samples in 4-year period, respectively.

Maize is one of the most important raw material in animal feeding. DON as well as ZEN were the most frequently occurring mycotoxins in maize samples. They were found in 89% and 92% out of 295 maize samples, respectively (median 328 µg/kg and 21.8 µg/kg; maximum contents 6688 µg/kg and 521 µg/kg, respectively). NIV, T2 and HT2 were present in 77%, 67% and 68%, respectively. Fumonisin, mycotoxins, which often contaminate maize, were detected in 58% out of 83 analyzed samples (median 15.0 µg/kg; maximum content 1885 µg/kg). Ochratoxin A was found in 12 samples (11%) and aflatoxins were detected only in 1 of 45 samples, in concentration near to the quantification limit.

DON and ZEN were also the most common mycotoxins in maize silages—86% and 88% of the 143 samples, respectively (median 223 µg/kg and 15.0 µg/kg; maximum 7860 µg/kg and 1133 µg/kg, respectively). NIV was present in 116 of 143 samples (81%), with median of 31.6 µg/kg and maximum content of 549 µg/kg. Trichotheceenes A, T-2 toxin and HT-2 toxin, were found in 47% and 73% of maize silage samples, respectively (maximum content 31.2 µg/kg and 204 µg/kg, respectively). Over half of the samples (53%) were contaminated by FUM, and their maximum content was 108 µg/kg. OTA was detected in 36% of the tested samples. One maize silage sample was contaminated by AF.

A total of 456 cereal grain samples (98%) contained DON (median 129 µg/kg; maximum content 8187 µg/kg). Other trichotheceenes, NIV, T2 and HT2, were found in about 80% of the samples (84%, 78% and 86%, respectively). Zearalenone was

**Table 6**  
Correlations between mycotoxins determined in different matrices.

Mycotoxin combination	Correlation coefficient, r			
	Maize (n) <sup>a</sup>	Maize silage (n) <sup>a</sup>	Cereal grain (n) <sup>a</sup>	Complete feed (n) <sup>a</sup>
DON/T2	0.150 <sup>c</sup> (295)	0.245 <sup>c</sup> (143)	−0.028 (466)	0.116 <sup>b</sup> (480)
DON/HT2	0.127 <sup>b</sup> (295)	0.439 <sup>c</sup> (143)	0.016 (466)	0.213 <sup>c</sup> (480)
DON/ZEN	0.810 <sup>c</sup> (295)	0.719 <sup>c</sup> (143)	0.582 <sup>c</sup> (466)	0.413 <sup>c</sup> (480)
DON/FUM	0.121 (76)	n.c. (21)	n.c. (3)	n.c. (14)
DON/OTA	0.334 <sup>c</sup> (105)	−0.120 (61)	−0.055 (225)	−0.024 (386)
DON/AF	n.c. (38)	n.c. (26)	−0.097 (100)	−0.039 (190)
T2/HT2	0.827 <sup>c</sup> (295)	0.405 <sup>c</sup> (143)	0.829 <sup>c</sup> (466)	0.853 <sup>c</sup> (480)
T2/ZEN	0.180 <sup>c</sup> (295)	0.088 (143)	0.006 (466)	0.166 <sup>c</sup> (480)
T2/FUM	0.377 <sup>c</sup> (76)	n.c. (21)	n.c. (3)	n.c. (14)
T2/OTA	0.045 (105)	0.097 (61)	0.015 (225)	0.008 (386)
T2/AF	n.c. (38)	n.c. (26)	−0.085 (100)	−0.016 (190)
HT2/ZEN	0.167 <sup>c</sup> (295)	0.354 <sup>c</sup> (143)	−0.024 (466)	0.203 <sup>c</sup> (480)
HT2/FUM	0.322 <sup>c</sup> (76)	n.c. (21)	n.c. (3)	n.c. (14)
HT2/OTA	0.028 (105)	−0.186 (61)	0.046 (225)	0.108 <sup>b</sup> (386)
HT2/AF	n.c. (38)	n.c. (26)	−0.137 (100)	−0.032 (190)
ZEN/FUM	0.244 <sup>b</sup> (76)	n.c. (21)	n.c. (3)	n.c. (14)
ZEN/OTA	0.293 <sup>c</sup> (105)	−0.148 (61)	−0.037 (225)	0.011 (386)
ZEN/AF	n.c. (38)	n.c. (26)	−0.042 (100)	−0.044 (190)
FUM/OTA	0.267 (51)	n.c. (19)	n.c. (3)	n.c. (14)
FUM/AF	n.c. (26)	n.c. (7)	n.c. (2)	n.c. (11)
OTA/AF	n.c. (35)	n.c. (24)	−0.043 (112)	−0.017 (197)

n.c., not calculated (n < 50).

<sup>a</sup> n, the number of samples.

<sup>b</sup> Significant at  $\alpha = 0.05$ .

<sup>c</sup> Significant at  $\alpha = 0.01$ .

present in 97% of the samples (in 450 of 466); its median was 2.98  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and maximum content was 608  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Fumonisin was not detected at all, whereas, aflatoxins and ochratoxin A were present in 5% and 28% of the samples, respectively (OTA: maximum content 155  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Regarding the complete feed, *Fusarium* mycotoxins were present in more than 90% of the samples (except the fumonisins: 86%). DON and ZEN were detected in 475 of 480 samples (99%). The median of those mycotoxins was 341  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 21.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the maximum content was 5478  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 349  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. T2 and HT2 were found in 97% of the samples (median 3.83  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 9.31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; maximum content 185  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 276  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively). NIV was present in 92% of the feed samples (median 16.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; maximum content 253  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). OTA and AF were found in 69% and 5% of complete feed samples, respectively (maximum content 88  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1.31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively).

### 3.2. Co-occurrence of mycotoxins

The co-occurrence of mycotoxins with the established by the European Commission limits was evaluated for samples with the results above the limit of detection. The most frequently co-occurring mycotoxin combinations were DON + ZEN (from 81% of maize silage to 99% of complete feed samples), DON + T2 + HT2, ZEN + T2 + HT2 and DON + T2 + HT2 + ZEN, found with high incidence in most of the examined feed materials and feedingstuffs (Fig. 1). From a matrix perspective the highest co-occurrence rate was recorded in the complete feed samples, as over 95% of them contained DON + T2 + HT2 + ZEN, and nearly 97%—DON + T2 + HT2 and ZEN + T2 + HT2. The fairly high co-occurrence was observed for DON + FUM in maize (56%), maize silage (53%) and complete feed (86%) samples. Quite high co-occurrence level was noticed for the combination of OTA with trichothecenes in complete feeds (DON + OTA 70%, T2 + HT2 + OTA 69%). Since the incidence as well as the content of aflatoxins were low, the co-occurrence with those mycotoxins was also low. The lowest percentage of the co-occurring mycotoxins was observed in maize silage samples (with the exception of the combinations with OTA, having the lowest frequency in the maize samples).

### 3.3. Correlation between mycotoxin contents

The correlations between individual mycotoxins contents in four matrices are shown in Table 6. The calculations of the correlation coefficients were performed for the combinations of the most important mycotoxins regulated by the EU, co-occurring in more than fifty samples. For the most frequently occurring combination (DON + ZEN) a positive strong ( $r = 0.810$  for maize;  $r = 0.719$  for maize silage) and moderate ( $r = 0.582$  for cereal grain;  $r = 0.413$  for complete feed) correlations were statistically significant ( $p < 0.01$ ). Similarly, the significant ( $p < 0.01$ ) strong positive correlation between T2 and HT2 in most matrices ( $r > 0.82$ ), except for maize silage samples with a weak-moderate relationship ( $r = 0.405$ ) was observed. One more significant moderate correlation was found between DON and HT2 in maize silages samples ( $r = 0.439$ ,  $p < 0.01$ ). Maize was the only matrix with significant but weak positive correlation between the contents of DON and OTA, T2 and FUM, HT2 and

FUM, ZEN and FUM, as well as ZEN and OTA. A relationship of the same nature was found in case of HT2 and ZEN ( $r=0.354$ ,  $p<0.01$ ) as well as DON and T2 ( $r=0.245$ ,  $p<0.01$ ) in maize silage samples. In case of aflatoxin combinations the evaluation did not reveal any statistically significant correlations.

#### 4. Discussion

Poland occupies the second place in the European Union (after France) in terms of cereal cultivation area, and the third referring to the harvest of cereal—(after France and Germany). Cultivation of cereal is one of the main directions of agricultural production in Poland. Cereal cultivation popularity results from the climate and soil conditions, a relatively simple production technology, relatively low labor consumption, ease of storage, transport and sale. Cereal industry, supplying basic raw material for the production of animal feed, determines, to a large extent, the economic conditions of livestock production, especially swine and poultry. Consumption of cereal has showed a downward trend. On the other hand, industrial consumption of grain has been growing steadily, although its share in the total cereal use is still low. The dominant position in the structure of the national cereal consumption (about 61%) is taken by grazing livestock. Up to 17 million tons of cereal have been used for the feed purposes. Of this amount, almost 80% of grain is used in farms. The accession of Poland to the European single market abolished customs and formal barriers between member states and contributed from one hand to the increase of the Polish cereals trade. On the other hand, it resulted in a stronger influence of the EU market to the domestic market (ARR, 2013).

##### 4.1. Mycotoxin occurrence

Deoxynivalenol is produced mainly by *F. graminearum* and, in some geographical areas, by *F. culmorum*. In this study, DON was detected in 1315 samples (95%) and its maximum concentration was 8187  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in a wheat sample. European Commission has set a guidance value of 8000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for DON in cereal feed materials, 12000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for maize feed materials, 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for complementary and complete feeds, and 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for complementary and complete feeds for swine (European Commission, 2006). In presented study, 6 samples (1 wheat, 1 complete feed and 4 maize silage samples) showed higher concentration of DON than the EU recommendation. In an earlier survey, Goertz et al. (2010) analyzed 44 (2006) and 40 (2007) maize samples in Germany and DON was found in 75% and 90% of the samples, respectively. Its mean concentrations were 1780  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (2006) and 2240  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (2007). In another study in Germany, Schollenberger et al. (2012) analyzed 13 maize samples and DON was found in 54% of samples, with mean and maximum concentration of 809  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 3118  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. In Czech Republic, Zachariasova et al. (2014) analyzed 8 maize samples and obtained mean and maximum concentration of 624  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1523  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. In 20% of 74 maize samples from Portugal, DON was found in the range of 100–500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Martins et al., 2008). In Belgium, Monbaliu et al. (2010) analyzed maize samples from Czech Republic, Belgium, Spain and Portugal, and DON was found in 86%, 70%, 79% and 91%, respectively. The highest mean concentration was recorded in samples from Czech Republic (2070  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the lowest from Belgium (188  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In this study, the contamination levels of DON in maize samples were similar to the results reported by Martins et al. (2008), Monbaliu et al. (2010), Schollenberger et al. (2012) and Zachariasova et al. (2014), while lower than the results reported by Goertz et al. (2010). In the Netherlands, DON was found in 53% samples of maize silage and its mean concentration was 550  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Driehuis et al., 2008). In Denmark, Storm et al. (2010) determined that 100% of maize silages were contaminated by DON, with mean and maximum concentration of 1056  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 5094  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. In another study upon 11 maize silages, it was found that DON mean content was 867  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Zachariasova et al., 2014). Krížová et al. (2014) analyzed 5 maize silages in Czech Republic, and DON was found in 100% of the samples at mean concentration of 725  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In presented study, the mean concentration of DON in silage samples were similar to the results reported by other researchers (Driehuis et al., 2008; Storm et al., 2010; Krížová et al., 2014; Zachariasova et al., 2014). In Czech Republic, Zachariasova et al. (2014) analyzed 37 cereal grain samples and determined a maximum concentration of 1582  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In another study, Monbaliu et al. (2010) analyzed Czech cereal grains and DON was found at a mean concentration of 3095  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In Portugal, DON was found in 14% of cereals samples with the concentration in the range of 100–300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Martins et al., 2008). In this study, the maximum contamination level of DON in cereal samples was higher than results presented by Martins et al. (2008) and similar to the results of Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014). In earlier survey of feeds in Poland, Cegielska-Radziejewska et al. (2013) examined poultry feed samples and detected DON contamination of all the samples in the range of 3.1–99.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (mean 33.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In Slovakia, DON was found in 56% of poultry feeds and the mean concentration was 303  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Labuda et al., 2005a). Driehuis et al. (2008) analyzed 72 samples of feed in the Netherlands and DON was found in 54% of the samples with maximum concentration of 2408  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (mean 433  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Martins et al. (2008) reported that in 9 (3%) out of 291 swine feed samples in Portugal, DON was detected in the range of 100–1649  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In a subsequent study conducted by Almeida et al. (2011), it was reported that 17% of feeds for fattening pigs were contaminated with DON in concentrations of 100–864  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In our study, the contamination levels of DON in complete feed samples were similar to the results obtained by Labuda et al. (2005a) and Driehuis et al. (2008), and they were higher than the results reported by Martins et al. (2008), Almeida et al. (2011) and Cegielska-Radziejewska et al. (2013).

Nivalenol is a mycotoxin that belongs to type B trichothecenes and it is produced by various *Fusarium* species. In the study, NIV was found in 1175 samples (85%) and its maximum concentration was 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in an oat sample. The regulatory limit for NIV has not been established by European Commission. In Germany, Goertz et al. (2010) found that 23% in 2006 and 48% in



2007 of maize samples were contaminated by NIV and its mean concentrations were 160 µg/kg and 210 µg/kg, respectively. In another study conducted in Germany, 23% of maize samples were contaminated with NIV at mean concentration of 3569 µg/kg and maximum content of 43064 µg/kg (Schollenberger et al., 2012). Zachariasova et al. (2014) analyzed 8 samples of maize and NIV was found at mean concentration of 153 µg/kg (maximum content 580 µg/kg). Monbaliu et al. (2010) reported that 6 out of 25 maize samples from Spain and Portugal contained NIV at maximum concentration of 435 µg/kg. In contrast, they did not detect NIV in 17 samples of maize originating from Czech Republic and Belgium. In this study, the mean contamination levels of NIV in maize samples were lower than the results reported by other researchers (Goertz et al., 2010; Monbaliu et al., 2010; Schollenberger et al., 2012; Zachariasova et al., 2014). Eckard et al. (2011) analyzed 19 samples of maize silage and NIV was found in 42% of the samples, with mean concentration of 219 µg/kg (maximum content 760 µg/kg). In Czech Republic, Zachariasova et al. (2014) found that NIV was at maximum content of 823 µg/kg in maize silage samples and mean concentration of 185 µg/kg. In presented study, the contamination levels of NIV in silage samples was again lower than the results obtained by Zachariasova et al. (2014) and Eckard et al. (2011). Zachariasova et al. (2014) reported that none of 37 cereal grain samples contained NIV. In another study, Monbaliu et al. (2010) found that 25% of 8 wheat samples were contaminated with NIV at a maximum content of 200 µg/kg (mean 19.1 µg/kg). In this study, the mean concentration of NIV in cereal samples was similar to the results reported by Monbaliu et al. (2010) and was higher than value reported by Zachariasova et al. (2014). Labuda et al. (2005a) analyzed 50 samples of poultry feed in Slovakia and none of them contained NIV. Similar results were obtained by Zachariasova et al. (2014), who analyzed 26 feeds for swine and 44 poultry feeds and all of them were free of NIV. In earlier survey of feeds in Poland, Cegielska-Radziejewska et al. (2013) examined poultry feed samples and detected NIV contamination in 27% of the samples, with mean concentration of 0.9 µg/kg. In this study, the contamination levels of NIV in complete feed samples were higher than the results reported by other researchers (Labuda et al., 2005a; Cegielska-Radziejewska et al., 2013; Zachariasova et al., 2014).

T-2 toxin is produced mainly by *Fusarium sporotrichioides* and it belongs to the type A trichothecenes (Richard, 2007). In this study, T2 was found in 79% of 1384 samples and its maximum content was 550 µg/kg in a maize sample. European Commission has set a guidance value of the sum of T-2 and HT-2 toxin for 2000 µg/kg for oat milling products (husks), 500 µg/kg for other cereal products, and 250 µg/kg for compound feeds (European Commission, 2013). In this study, 11 (0.8%) samples (3 maize, 1 barley, 1 oat, and 6 complete feed samples) showed higher concentration of the sum of T-2 and HT-2 toxin than the EU recommendation. In an earlier study, Goertz et al. (2010) analyzed maize samples in 2006 and 2007, and T-2 toxin was found in 6 (14%) out of 44 and in 4 (10%) out of 40 maize samples, respectively (mean concentrations: 4 µg/kg in 2006 and 10 µg/kg in 2007). In another study in Germany, Schollenberger et al. (2012) found that 23% of 13 maize samples were contaminated with the T2 at a mean content of 36 µg/kg (maximum 429 µg/kg). In Belgium, Monbaliu et al. (2010) analyzed 42 maize samples from four countries (Czech Republic, Belgium, Spain, Portugal). The highest mean concentration of T2 was found in samples from Belgium (11.2 µg/kg), while samples from Portugal were free of this mycotoxin. Zachariasova et al. (2014) did not find T-2 toxin in 8 maize samples. In this study mean concentration of T2 in 2011 and 2014 were similar to the results reported by Schollenberger et al. (2012), whereas the values obtained in 2012 and 2013 were similar to the results reported by Goertz et al. (2010). In Denmark, Storm et al. (2010) analyzed 20 samples of maize silage and T-2 toxin was found in 1 (5%) sample, at the concentration of 2 µg/kg. In another studies, Zachariasova et al. (2014) did not find T-2 toxin in 11 maize silage samples. In 37% of 19 maize silage samples from Switzerland, T2 was found at mean concentration of 13.3 µg/kg (Eckard et al., 2011). In this study, the mean concentrations of T-2 toxin in silages were higher than those reported by other researchers (Storm et al., 2010; Zachariasova et al., 2014) and lower than reported by Eckard et al. (2011). Monbaliu et al. (2010) analyzed 8 wheat samples and T2 was found only in 1 sample at concentration of 26 µg/kg. Zachariasova et al. (2014) reported that in 1 out of 37 wheat and barley samples, T-2 toxin was detected at a low concentration of 10 µg/kg. In this study, the contamination levels of T2 were higher than the results reported by Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014). In an earlier survey of feeds in Slovakia, Labuda et al. (2005a) examined poultry feed samples and detected T-2 toxin in 45 (90%) out of 50 samples, at mean concentration of 13 µg/kg. In Poland, Cegielska-Radziejewska et al. (2013) analyzed 45 poultry feed samples and did not find T2 in any of them. In 1 out of 70 poultry and swine feed samples, T2 was found at concentration of 15 µg/kg (Zachariasova et al., 2014). In this study, contamination levels of T-2 toxin in feed samples were higher than the results reported by Cegielska-Radziejewska et al. (2013) and Zachariasova et al. (2014), and they were lower than results obtained by Labuda et al. (2005a).

HT-2 toxin also belongs to the type A trichothecenes and frequently occurs together with the T-2 toxin. In the study, HT2 was found in 1174 samples (85%) and its maximum concentration was 1583 µg/kg in a maize sample. In an earlier survey of maize in Germany, Goertz et al. (2010) analyzed 44 and 40 samples in 2006 and 2007, and HT2 was found in 11% and 15% of the samples, respectively (mean concentrations: 7 µg/kg and 20 µg/kg, respectively). In another study in Germany, Schollenberger et al. (2012) found that 31% of 13 maize samples were contaminated with HT2 at a mean concentration of 38 µg/kg. Monbaliu et al. (2010) analyzed 42 maize samples, and HT2 was found in 10% of the samples, with maximum concentration of 116 µg/kg. In Czech Republic, Zachariasova et al. (2014) did not find HT-2 toxin in analyzed 8 maize samples. In presented study, the mean contamination levels of HT2 in maize samples were similar to results obtained by Goertz et al. (2010) and Schollenberger et al. (2012), and they were higher than results reported by Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014). In a previous study of silages performed in Denmark, Storm et al. (2010) reported that 60% of 20 maize silages contained HT2 at mean concentration of 104 µg/kg. In another study, samples of maize silage were collected in Switzerland and 26% of 19 were contaminated with HT2 at mean contamination of 24.9 µg/kg (Eckard et al., 2011). Zachariasova et al. (2014) analyzed 11 maize silage samples, and HT2 was found at maximum content of 111 µg/kg (mean 32 µg/kg). In this

study, the contamination levels of HT-2 toxin in silage samples were similar to the results reported by Eckard et al. (2011) and Zachariasova et al. (2014), but they were lower than the results reported by Storm et al. (2010). Zachariasova et al. (2014) analyzed 37 cereal grain (wheat and barley) samples and did not find HT2 in any of them. In 1 of 8 wheat samples, HT2 was found in concentration of 46 µg/kg (Zachariasova et al., 2014). In this study, mean concentration of HT-2 toxin in cereal grains was higher than the results reported by Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014). In 76% of 50 poultry feed samples collected in Slovakia, HT2 was detected at mean concentration of 18 µg/kg (maximum content 27 µg/kg) (Labuda et al., 2005a). Zachariasova et al. (2014) analyzed 70 poultry and swine feed samples, and HT2 was at a maximum concentration of 39 µg/kg. In Poland, Cegielska-Radziejewska et al. (2013) found that HT-2 toxin in poultry feeds was at mean concentration of 0.4 µg/kg in 21 (47%) out of 45 samples. In presented study, concentration levels of HT2 in complete feed samples were higher than the results reported by other researchers (Cegielska-Radziejewska et al., 2013; Zachariasova et al., 2014) and they were similar to the results obtained by Labuda et al. (2005a).

Zearalenone is one of the most frequently occurring mycotoxins, being produced mainly by *F. graminearum* and *F. culmorum* (Richard, 2007). In this study, ZEN was detected in 1323 samples (96%) and its maximum concentration was 1133 µg/kg in a maize silage sample. European Commission has set a guidance value of 2000 µg/kg for ZEN in cereal feed materials, 3000 µg/kg for maize feed materials, 100 µg/kg for complementary and complete feeds for piglets and gilts, 250 µg/kg for complementary and complete feeds for sows and fattening pigs, and 500 µg/kg for complementary and complete feeds for calves, dairy cattle, and sheep (European Commission, 2006). In presented study, 5 samples (complete feeds for swine and poultry) showed higher concentration of ZEN than the EU recommendation. In a survey of maize in Spain, Jaimez et al. (2004) analyzed 27 samples and ZEN was found in 15% of the samples with maximum concentration of 2.2 µg/kg. In Germany, Goertz et al. (2010) reported that 27% of 44 in 2006 and 93% of 40 maize samples in 2007 were contaminated by ZEN at mean concentrations of 70 µg/kg and 480 µg/kg, respectively (maximum content: 860 µg/kg in 2006, 14580 µg/kg in 2007). Zachariasova et al. (2014) analyzed 8 samples of maize and found ZEN at maximum concentration of 159 µg/kg (mean 30 µg/kg). In Belgium, Monbaliu et al. (2010) found, that 26% maize samples were contaminated with ZEN at maximum content of 387 µg/kg. In 88% of 24 maize samples collected in Croatia, ZEN was found in the range of 27.7–1182 µg/kg (mean 112 µg/kg) (Šegvić Klarić et al., 2009). In this study, the mean contamination levels of ZEN in maize samples were higher than the results reported by Jaimez et al. (2004); in 2011–2013, they were similar to the results obtained by Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014) and in 2014—similar to the results reported by Šegvić Klarić et al. (2009). In the Netherlands, Driehuis et al. (2008) found that 17% of 47 samples of grass and maize silage were contaminated with ZEN at mean concentration of 125 µg/kg (maximum 272 µg/kg). In another study, samples of maize silage were collected in Switzerland and 79% (15) were contaminated with ZEN at a mean content of 100 µg/kg (maximum 430 µg/kg) (Eckard et al., 2011). Zachariasova et al. (2014) analyzed 11 maize silage samples and ZEN was found at mean and maximum content of 29 µg/kg and 120 µg/kg, respectively. In Czech Republic, Krížová et al. (2014) determined ZEN in all of 15 maize silage samples and its mean content was 215 µg/kg. In presented study, the contamination levels of ZEN in silage samples were similar to the results reported by Driehuis et al. (2008) and Eckard et al. (2011), which were lower than the results reported by Krížová et al. (2014) and higher than the results obtained by Zachariasova et al. (2014). Monbaliu et al. (2010) analyzed 8 samples of wheat and ZEN was found in 2 (25%) of the samples at mean concentration of 27 µg/kg (maximum 155 µg/kg). In Croatia, ZEN was found in 42% of wheat, barley, and oat samples in the range of 12.5–83.6 µg/kg (Šegvić Klarić et al., 2009). Zachariasova et al. (2014) found ZEN in a maximum content of 131 µg/kg in 37 samples of wheat and barley. In this study, the contamination levels of ZEN in cereal grain samples were similar to the results reported by other researchers (Šegvić Klarić et al., 2009; Monbaliu et al., 2010; Zachariasova et al., 2014). In an earlier study upon poultry feed, Jaimez et al. (2004) found ZEN in 1 out of 22 samples at a low concentration of 0.5 µg/kg. In Slovakia, Labuda et al. (2005a) detected ZEN in 44 (88%) of the samples at a mean concentration of 21 µg/kg (maximum content 86 µg/kg). Driehuis et al. (2008) analyzed 72 samples of feed and ZEN was found in 28% of the samples with maximum concentration of 363 µg/kg (mean 80 µg/kg). In Portugal, Martins et al. (2008) detected that 13% of feed samples were contaminated by ZEN at a range 104–356 µg/kg. In a subsequent study in Portugal conducted by Almeida et al. (2011), it was reported that 26% of 404 swine feed samples contained ZEN at mean concentration of 19 µg/kg. In Croatia, Šegvić Klarić et al. (2009) detected ZEN in 100% (13) of feed samples at concentration ranging from 49.7 µg/kg to 1168 µg/kg (mean 627 µg/kg). Zachariasova et al. (2014) analyzed 70 samples of poultry and swine feed and found ZEN at maximum content of 104 µg/kg. In this study, the mean contamination levels of ZEN in complete feed samples were lower than results obtained by Driehuis et al. (2008) and Šegvić Klarić et al. (2009), and they were higher than those reported by Jaimez et al. (2004), Labuda et al. (2005a), Almeida et al. (2011) and Zachariasova et al. (2014).

The fumonisins are a group of mycotoxins (mainly FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> and FB<sub>3</sub>) produced primarily by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. Maize is the major commodity affected by this group of toxins, although they can be found also in sorghum and rice (Richard, 2007). In this study, FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) were found in 71 samples (59%) at maximum concentration of 1885 µg/kg in a maize sample. European Commission has set a guidance value of 60000 µg/kg for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> sum in maize feed materials, 5000 µg/kg for complementary and complete feeds for pigs, horses, rabbits, and pet animals, 10000 µg/kg for complementary and complete feeds for fish, 20000 µg/kg for complementary and complete feeds for poultry, calves (<4 months), lambs, and kids and 50000 µg/kg for complementary and complete feeds for adult ruminants (>4 months) and mink (European Commission, 2006). In presented study, we did not detect FUM at concentrations higher than the guidance values established by European Commission. In Germany, Goertz et al. (2010) analyzed 44 samples of maize and FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) were found in 34% of the samples at maximum concentration of 25090 µg/kg. In 21% of 58 maize samples from Portugal,

FB<sub>1</sub> was detected in the range of 10–300 µg/kg (Martins et al., 2008). Zachariasova et al. (2014) found FB<sub>1</sub> at a maximum content of 189 µg/kg in 8 maize samples. In Croatia, Šegvić Klarić et al. (2009) analyzed 12 samples of maize and found FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) in 25% of samples at mean concentration of 7630 µg/kg (maximum 20700 µg/kg). Monbaliu et al. (2010) analyzed maize samples from Czech Republic, Belgium, Spain and Portugal and FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) were found in 71% of 7, 60% of 10, 86% of 14 and 100% of 11, respectively. The highest mean concentration was recorded in samples from Spain (1576 µg/kg) and the lowest from Belgium (142 µg/kg). In this study, the contamination levels of fumonisins in samples of maize were lower than results reported by Šegvić Klarić et al. (2009), Goertz et al. (2010), and Monbaliu et al. (2010), which were higher than the results obtained by Martins et al. (2008) and Zachariasova et al. (2014). In Czech Republic, Zachariasova et al. (2014) analyzed 11 samples of maize silage and FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) were found at mean concentration of 51 µg/kg. In this study, the mean contamination levels of FUM in silages were lower than the results reported by Zachariasova et al. (2014). In Portugal, Martins et al. (2008) analyzed 79 samples of cereal grain (wheat and barley), and FB<sub>1</sub> was found in 8% of the samples in the range 10–40 µg/kg. Monbaliu et al. (2010) reported that in 1 out of 8 wheat samples, FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) were detected at mean concentration of 13.3 µg/kg. Šegvić Klarić et al. (2009) and Zachariasova et al. (2014) did not detect FUM in 12 and 37 samples of cereal grain, respectively. In this study, the concentration of FUM in cereal grain samples were lower than the results reported by Martins et al. (2008) and Monbaliu et al. (2010), and were similar to the results obtained by Šegvić Klarić et al. (2009) and Zachariasova et al. (2014). In Portugal, Martins et al. (2008) found that 1% of 337 swine and poultry feed samples were contaminated with FB<sub>1</sub> at a range of 24–34 µg/kg. In another study in Portugal, Almeida et al. (2011) analyzed 127 samples of swine feed and FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) were detected in 9% of samples at mean concentration of 164 µg/kg (maximum 390 µg/kg). In Slovakia, Labuda et al. (2005b) found that FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) in poultry feeds were at mean concentration of 304 µg/kg (maximum 1160 µg/kg) in 49 out of 50 samples. Zachariasova et al. (2014) analyzed 70 samples of poultry and swine feed and FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) were detected at maximum content of 10 µg/kg. In Croatia, 7 out of 13 feed samples were contaminated by FUM (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>), and their mean and maximum content were 2300 µg/kg and 5000 µg/kg, respectively (Šegvić Klarić et al., 2009). In presented study, mean concentration of FUM in complete feed samples were lower than the results reported by Labuda et al. (2005b) and Šegvić Klarić et al. (2009) (except for 2014) and they were similar (except for 2014) to results obtained by Martins et al. (2008) and Zachariasova et al. (2014).

Ochratoxin A is one of the major mycotoxins and it is produced mainly by *A. ochraceus* and *P. verrucosum* (Richard, 2007). In this study, OTA was found in 388 samples (47%) and its maximum concentration was 155 µg/kg in a wheat middling sample. European Commission has set a guidance value of 250 µg/kg for OTA in cereal feed materials, 50 µg/kg for complementary and complete feeds for swine and 100 µg/kg for complementary and complete feeds for poultry (European Commission, 2006). In the presented study, 2 samples of mixed-feeds for swine and cattle showed higher OTA concentration than the EU recommendation. In Spain, Jaimez et al. (2004) analyzed maize samples and detected 9 out of 27 (33%) to be contaminated with OTA in concentration of 0.5–12.2 µg/kg (mean 3.9 µg/kg). Šegvić Klarić et al. (2009) analyzed 12 samples of maize in Croatia and OTA was detected in 25% of samples in the range of 2.5–31.7 µg/kg (mean 12.7 µg/kg). Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014) evaluated the occurrence of OTA in 42 and 8 maize samples, respectively, and did not find the mycotoxin in any of them. In this study, the contamination levels of OTA in maize samples were higher than the results reported by Monbaliu et al. (2010) and Zachariasova et al. (2014); in 2011 and 2012, they were similar to the results by Šegvić Klarić et al. (2009), and in 2013–2014—to the results achieved by Jaimez et al. (2004). In presented study, the mean contamination levels of OTA in silage samples were higher than the results obtained by Zachariasova et al. (2014), who did not detect OTA in 11 samples of maize silage. In Croatia, Šegvić Klarić et al. (2009) found that 1 out of 12 cereal grain samples was contaminated by OTA (2.6 µg/kg). In Belgium, Monbaliu et al. (2010) analyzed 8 wheat samples, and detected OTA in 1 (13%) sample at concentration of 22 µg/kg. Zachariasova et al. (2014) found a maximum content of OTA at 56 µg/kg in analyzed 37 samples of cereal grain. In this study, the mean concentration levels of OTA in cereal grain samples were higher than the results reported by other researchers (Šegvić Klarić et al., 2009; Monbaliu et al., 2010; Zachariasova et al., 2014). In Spain, Jaimez et al. (2004) evaluated the occurrence of OTA in 22 samples of poultry and egg-laying hen feed. Forty-three percent of poultry feeds and 38% of egg-laying hen feeds were contaminated with OTA at mean content of 0.50 µg/kg and 0.52 µg/kg, respectively. Martins et al. (2008) analyzed 100 samples of swine and poultry feed samples, and OTA was found in 1 (1%) sample at concentration of 4 µg/kg. In another study in Portugal, OTA was found in 8% of 277 swine feed samples at mean concentration of 3.9 µg/kg (maximum 6.8 µg/kg) (Almeida et al., 2011). In Croatia, Šegvić Klarić et al. (2009) observed that in 2 (15%) of 13 feeds samples, OTA was detected in a concentration range of 5.4–12.9 µg/kg (mean 9.2 µg/kg). In this study, the mean contamination levels of OTA in complete feed samples were higher than results reported by Jaimez et al. (2004) and Martins et al. (2008), but they were lower than those obtained by Šegvić Klarić et al. (2009) and Almeida et al. (2011).

The major aflatoxins consist of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> and can be produced by selected isolates of *A. flavus* or *A. parasiticus* (Richard 2007). In presented study, AF (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) were detected in 5% out of 428 examined samples, at maximum content of 1.3 µg/kg in a complete feed sample. European Commission has set a maximum value for aflatoxin B<sub>1</sub> being 20 µg/kg for feed materials, 10 µg/kg for complementary and complete feed and 5 µg/kg for compound feed for dairy cattle and calves, dairy sheep and lambs, dairy goats and kids, piglets and young poultry animals (European Commission, 2011). For many years those toxins had not been considered an issue in European agricultural produce, until early in 2013 aflatoxins in maize, intended for feed, coming from the Balkan area caused severe problems in Europe (De Rijk et al., 2015). In presented study, we did not find AF in concentrations higher than a maximum permissible level established by European Commission. In Portugal, Martins et al. (2008) evaluated the occurrence of AFB<sub>1</sub> in 248 maize samples. Twelve

percent of them were contaminated with aflatoxin at a range of 1–45 µg/kg. Šegvić Klarić et al. (2009) analyzed 12 maize samples and found AF in the range of 2.7–4.5 µg/kg (mean 3.4 µg/kg) in 33% of samples. In this study, the contamination levels of AF were lower than the results reported by other researchers (Martins et al., 2008; Šegvić Klarić et al., 2009). Martins et al. (2008) investigated the occurrence of AFB<sub>1</sub> in 13 silage samples. The toxins were found in 15% of the samples at concentration range of 6–10 µg/kg. In contrast, Zachariasova et al. (2014) did not find AFB<sub>1</sub> in 11 maize silage samples. In presented study, the mean concentration levels of AF in silage samples were similar to results obtained by Zachariasova et al. (2014), and they were lower than the results reported by Martins et al. (2008). In Portugal, Martins et al. (2008) found 11% of 80 wheat samples and 7% out of 74 barley samples were contaminated with AFB<sub>1</sub> at a range 1–10 µg/kg. Šegvić Klarić et al. (2009) analyzed 12 samples of wheat, barley and oat, and AF were found in 1 wheat sample at the concentration of 2.6 µg/kg. In this study, the mean concentration of AF in cereal grain samples were lower than the results reported by other researchers (Martins et al., 2008; Šegvić Klarić et al., 2009). In Northern Italy, Decastelli et al. (2007) analyzed 616 feed samples and AF were found in 44 (7%) of the samples. Martins et al. (2008) observed swine and poultry feed and found that 10% and 22%, respectively were contaminated with AFB<sub>1</sub> at concentrations of 1–21 µg/kg. In Croatia, Šegvić Klarić et al. (2009) determined AF in feeds in the range of 4.2–10.3 µg/kg (mean 6.9 µg/kg) in 4 (31%) out of 13 samples. In this study, the mean contamination levels of AF in complete feed samples were lower than the results reported by Martins et al. (2008) and Šegvić Klarić et al. (2009).

#### 4.2. Co-occurrence of mycotoxins

Feed materials and feedingstuffs may be contaminated with various species of molds. Additionally, each species can produce a large spectrum of mycotoxins, therefore it is important to present information about their co-occurrence. Furthermore, the adverse health effects resulting from the exposure to a larger number of mycotoxins may be more serious compared to individual compounds (Grenier and Oswald, 2011). The combinations of the most frequently co-occurring mycotoxins in this study have been also recorded by several authors focused on the most important mycotoxins in feed materials and feedingstuffs. Monbaliu et al. (2010) examined 42 maize samples, i.e. for trichothecenes, fumonisins, zearalenone, ochratoxin A and aflatoxins. The combinations of DON + FUM (64%) and DON + ZEN (26%) were of the highest level. 10% of the samples contained DON + T2 + HT2, and the co-occurrence of ZEN + T2 + HT2 as well as DON + T2 + HT2 + ZEN was observed in 2% of the samples. Regarding 8 maize samples analyzed by Zachariasova et al. (2014), the combinations of DON + ZEN and DON + FB<sub>1</sub> were recorded in 25% of samples. Out of 47 maize silage samples analyzed for DON and ZEN by Driehuis et al. (2008) 17% contained these two mycotoxins simultaneously. In 84% of 19 maize silage samples from Switzerland, Eckard et al., 2011 determined DON + ZEN, and the co-occurrence of DON + T2 + HT2 + ZEN, DON + T2 + HT2 and ZEN + T2 + HT2 was recorded in 21% of the samples. In Czech Republic, Zachariasova et al. (2014) found that 45% of 11 maize silage samples contained DON + ZEN. Moreover, they recorded the co-occurrence of DON + FB<sub>1</sub> (27%) and DON + T2 + HT2 (18%). Along with the maize, Monbaliu et al. (2010) examined 8 wheat samples and found that one fourth of them contained DON + ZEN, whereas DON + T2 + HT2 were present in a single sample only, and no other combinations were recognized. Zachariasova et al. (2014) analyzed 37 cereal grains samples and recorded the combinations of DON + ZEN (37%), DON + OTA (5%), DON + T2 + HT2 (3%) and DON + ZEN + OTA (3%). More than 80% of poultry feed samples examined in Slovakia contained at least two mycotoxins, and the most frequently recorded four-compounds combination (48%) was DON + T2 + HT2 + ZEN (Labuda et al., 2005a). In over 70% of the samples ZEN + T2 + HT2 co-occurred, and half of the samples contained DON + T2 + HT2 as well as DON + ZEN. Out of 72 feed samples for dairy cattle analyzed in the Netherlands, 21% contained DON + ZEN (Driehuis et al., 2008). Among 70 poultry and swine feed samples examined by Zachariasova et al. (2014), 33% contained DON + ZEN, whereas the combinations of DON + T2 + HT2, DON + OTA, DON + ZEN + OTA, as well as DON + FB<sub>1</sub> were present in single samples only. The percentage of samples co-contaminated with several mycotoxins in this study was generally higher, when compared to the results reported by other researchers. The reason for this may be higher limits of detection (e.g., Driehuis et al., 2008) on the one hand, and limited number of the examined samples (e.g. 8 wheat samples, Monbaliu et al., 2010; 8 maize samples, Zachariasova et al., 2014), on the other.

#### 4.3. Correlation between mycotoxin contents

The positive correlation between DON and ZEN, being one of the strongest in this study, was also observed by other authors, however its strength varied from weak-moderate to very strong, depending on, i.e. the matrix. Mankevičienė et al. (2011) examined wheat and barley samples, and recognized statistically significant ( $p < 0.01$ ) positive correlation for single varieties of winter wheat (moderate) and spring barley (very strong). Borutova et al. (2012) analyzed nearly a thousand and a half samples of grain, feeds and other feed commodities originated from Asia-Oceania region, and determined the overall correlation between DON and ZEN as of moderate strength, however focusing on maize samples only revealed that these two compounds were strongly correlated in case of the matrix. Still, the results analysis of this particular material revealed other significant ( $p < 0.01$ ), very strong correlations recognized, between AFB<sub>1</sub> and AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>, as well as between FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> (Borutova et al., 2012). However, these findings cannot be confirmed by our study, because of the very low occurrence (and co-occurrence) rate in case of AF, and a limited number of maize samples co-contaminated with FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>. Other significant, but weak positive relationships recognized during our study on maize (e.g. between DON and OTA,

T2 and FUM, HT2 and FUM) were not reported in case of maize coming from Asia-Oceania region (Borutova et al., 2012). The relationship between T-2 and HT-2 toxins can be expected, since the latter is a metabolite of the former. Our findings in this issue (significant positive correlation) are in agreement with studies focused on T2 and HT2 in Norwegian barley, oats and wheat (Langseth and Rundberget, 1999), German wheat, rye and oats (Gottschalk et al., 2009), English oats (Edwards, 2009) and Polish rye samples (Błajet-Kosicka et al., 2014b).

## 5. Conclusions

Food and feed safety is one of the most important criteria for their quality. It is also one of the priorities of the European Union policy, which is reflected in its legislative action by laying down, i.e. the requirements for feed hygiene to ensure feed safety throughout the food chain, starting with primary production of feed, up to and including feeding of food-producing animals (European Commission, 2005). In the food chain agricultural crops play an important role as a source of food and feed. One of the highly undesirable factors in agricultural products and animal feed are mycotoxins. The four-year survey indicated again that both feed materials and feedingstuffs are contaminated with the secondary metabolites of molds. The most frequently occurring mycotoxins, DON and ZEN were present in more than 95% of the samples and the matrices with the highest contamination level were maize and complete feed. Although the number of samples analyzed for aflatoxins was limited, the results might have confirmed, that those compounds are not produced and yet pose a threat in a temperate climate of Poland. This fact does not mean that the aflatoxins occurrence monitoring should be stopped. Having performed more than 8000 determinations, we learnt that mycotoxins co-occurred in majority of samples—over 95% of the samples analyzed for *Fusarium* toxins contained at least two compounds, and in three-quarters of the samples 5 toxins were detected. Even though the inconsistency with EU Commission guidance values took place in case of 24 samples only, it should be taken into account, that the values are set for single compounds. Moreover, possible productivity and animal health problems connected with mycotoxins present in feed at levels lower than those set by the European Commission have been pointed out before (Rafai et al., 2000; Obremski et al., 2008; Yunus et al., 2012; Grenier and Applegate, 2013). With a view to the fact, that 60% of the complete feed samples as well as 70% of the maize silage samples delivered by veterinary doctors and farmers were examined following some breeding problems, and that other factors' influence had been eliminated, it may be assumed, that the problems could have been associated with the mycotoxins, even though their levels were below the guidance values given by the EU. The presence of mycotoxins in feed is not a research topic only with regard to animal health, but also in relation to the economic impact of the problem (Wu, 2007). However, in order to build proper health and economic risk models that help in feed quality and animal breeding management, data on mycotoxins occurrence in feed material and feeding stuffs are needed.

## Acknowledgments

This study was financially supported in part by project “Toxicity studies of moulds and their secondary metabolites contaminating human and animal habitats”: ROP of Kujawsko-Pomorskie Voievodship in the years 2007–2013, Task 5.4. Strengthening regional capacity for research and technology development.

## References

- Almeida, I., Martins, H.M., Santos, S., Costa, J.M., Bernardo, F., 2011. Co-occurrence of mycotoxins in swine feed produced in Portugal. *Mycotoxin Res.* 27, 177–181.
- ARR, 2013. Market in Cereals in Poland. available at <http://www.arr.gov.pl/broszury-rynkowe>.
- Binder, E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133, 149–166.
- Błajet-Kosicka, A., Kosicki, R., Twarużek, M., Grajewski, J., 2014a. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Addit. Contam. B Surveill.* 7, 302–308.
- Błajet-Kosicka, A., Twarużek, M., Kosicki, R., Sibirowska, E., Grajewski, J., 2014b. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control* 38, 61–66.
- Borutova, R., Aragon, Y.A., Nährer, K., Berthiller, F., 2012. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. *Anim. Feed Sci. Technol.* 178, 190–197.
- Cegielska-Radziejewska, R., Stuper, K., Szablewski, T., 2013. Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Ann. Agr. Env. Med.* 20, 30–35.
- Cheli, F., Campagnoli, A., Dell'Orto, V., 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183, 1–16.
- Decastelli, L., Lai, J., Gramaglia, M., Monaco, A., Nachtmann, C., Oldano, F., Ruffer, M., Sezian, A., Bandirola, C., 2007. Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. *Food Control* 18, 1263–1266.
- De Rijk, T.C., Van Egmond, H.P., Van der Fels-Klerx, H.J., Herbes, R., De Nijs, M., Samson, R.A., Slate, A.B., Van der Spiegel, M., 2015. A study of the 2013 Western European issue of aflatoxin contamination of maize from the Balkan area. *World Mycotoxin J.* 8, 641–651.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M., te Giffel, M.C., 2008. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J. Dairy Sci.* 91, 4261–4271.
- Eckard, S., Wettstein, F.E., Forrer, H.R., Vogelgsang, S., 2011. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3, 949–967.
- Edwards, S.G., 2009. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional oats. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess* 26, 1063–1069.
- European Commission, 2005. Regulation (EC) No 183/2005 of the European Parliament and of the Council of 12 January 2005 laying down requirements for feed hygiene. *Off. J. Eur. Union* 48, L35/1–L35/22.
- European Commission, 2006. Commission Recommendation 2006/576/EC on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union* 49, L229/7–L229/9.

- European Commission, 2009. Commission Regulation (EU) No 152/2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Off. J. Eur. Union 52, L54/1–L54/130.
- European Commission, 2011. Commission Regulation (EU) No 574/2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, *Ambrosia* spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto. Off. J. Eur. Union, L159/7–L159/24.
- European Commission, 2013. Commission Recommendation 2013/165/EU on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. Off. J. Eur. Union 56, L91/12–L91/15.
- Goertz, A., Zuehlke, S., Spittler, M., Steiner, U., Dehne, H.W., Waalwijk, C., de Vries, I., Oerke, E.C., 2010. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. Eur. J. Plant Pathol. 128, 101–111.
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K., 2009. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. Food Addit. Contam. A 26, 1273–1289.
- Grajewski, J., Błajet-Kosicka, A., Twarużek, M., Kosicki, R., 2012. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006–2009. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 96, 870–877.
- Grenier, B., Applegate, T.J., 2013. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. Toxins 5, 396–430.
- Grenier, B., Oswald, I.P., 2011. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. World Mycotoxin J. 4, 285–313.
- Jaimez, J., Fente, C.A., Franco, C.M., Cepeda, A., Vazquez, B.I., 2004. A survey of the fungal contamination and presence of ochratoxin A and zearalenone on Spanish feed and raw materials. J. Sci. Food Agr. 84, 832–840.
- Křížová, L., Richter, M., Pavlok, S., Veselý, A., 2014. Distribution of mycotoxins deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA) and T-2 and HT-2 toxins in maize silage in various profile of the trench silo during feed-out phase. Cattle Res. 2, 2–8.
- Labuda, R., Parich, A., Berthiller, F., Tančinová, D., 2005a. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. Int. J. Food Microbiol. 105, 19–25.
- Labuda, R., Parich, A., Vekiru, E., Tančinová, D., 2005b. Incidence of fumonisins, moniliformin and *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. Ann. Agr. Env. Med. 12, 81–86.
- Landschoot, S., Waegeman, W., Audenaert, K., Vandepitte, J., Baetens, J., De Baets, B., Geert Haesaert, G., 2012. An empirical analysis of explanatory variables affecting *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol content in wheat. J. Plant Pathol. 94, 135–147.
- Langseth, W., Rundberget, T., 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. Mycopathologia 147, 157–165.
- Mankevičienė, A., Butkutė, B., Dabkevičius, Z., Supronienė, S., 2011. Peculiarities of cereal grain co-contamination with *Fusarium* mycotoxins. Zemdirbyste-Agriculture 98, 415–420.
- Martins, H.M., Marques, M., Almeida, I., Guerra, M.M., Bernardo, F., 2008. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. Mycotoxin Res. 24, 19–23.
- Miličević, D.R., Škrinjarand, M., Baltić, T., 2010. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. Toxins 2, 572–592.
- Monbalieu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., Van Dyck, S., Averkieva, O., Van Peteghem, C., De Saeger, S., 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. J. Agr. Food Chem. 58, 66–71.
- Obremski, K., Zielonka, L., Gajecka, M., Jakimiuk, E., Bakuła, T., Baranowski, M., Gajecki, M., 2008. Histological estimation of the small intestine wall after administration of feed containing deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in the pig. Pol. J. Vet. Sci. 11, 339–345.
- Rafai, P., Pettersson, H., Bata, A., Papp, Z., Glávits, R., Tuboly, S., Ványi, A., Soós, P., 2000. Effect of dietary T-2 fusariotoxin concentrations on the health and production of white Pekin duck broilers. Poult. Sci. 79, 1548–1556.
- Richard, J.L., Payne, G.A., 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames: Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report No. 139.
- Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—an overview. Int. J. Food Microbiol. 119, 3–10.
- Schollenberger, M., Müller, H.M., Ernst, K., Sondermann, S., Liebscher, M., Schlecker, C., Wischer, G., Drochner, W., Hartung, K., Piepho, H.P., 2012. Occurrence and distribution of 13 trichothecene toxins in naturally contaminated maize plants in Germany. Toxins 4, 778–787.
- Šegvič Klarič, M., Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Kosalec, I., 2009. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography. Arh. Hig. Rada Toksikol. 60, 427–434.
- Storm, I.M.L.D., Kristensen, N.B., Raun, B.M.L., Smedsgaard, J., Thrane, U., 2010. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. J. Appl. Microbiol. 109, 1017–1026.
- Tirado, M.C., Clarke, R., Jaykus, L.A., McQuatters-Gollop, A., Franke, J.M., 2010. Climate change and food safety: a review. Food Res. Int. 43, 1745–1765.
- Weidenbörner, M., 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Springer-Verlag, Berlin.
- Wu, F., 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 363–374.
- Yunus, A.W., Błajet-Kosicka, A., Kosicki, R., Khan, M.Z., Rehman, H., Böhm, J., 2012. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. Poult. Sci. 91, 852–861.
- Zachariasova, M., Džuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vaclavikova, M., Zachariasova, A., Pospichalova, M., Florian, M., Hajslova, J., 2014. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. Anim. Feed. Sci. Technol. 193, 124–140.

Article

# Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017–2019)

Robert Kosicki <sup>1,\*</sup>, Magdalena Twarużek <sup>1</sup>, Paweł Dopierała <sup>2</sup>, Bartosz Rudzki <sup>2</sup> and Jan Grajewski <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kazimierz Wielki University, Faculty of Biological Sciences, Department of Physiology and Toxicology, Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz, Poland; twarmag@ukw.edu.pl (M.T.); jangra@ukw.edu.pl (J.G.)

<sup>2</sup> KWS Lochow Polska Sp. z o. o., Słowiańska 5, Kondratowice, 57-150 Prusy, Poland; pawel.dopierała@kws.com (P.D.); bartosz.rudzki@kws.com (B.R.)

\* Correspondence: robkos@ukw.edu.pl

Received: 22 May 2020; Accepted: 24 June 2020; Published: 26 June 2020



**Abstract:** Rye (*Secale cereale* L.) is one of the most important cereals and is used in both the food and feed industries. It is produced mainly in a belt extending from Russia through Poland to Germany. Despite the great economic importance of this cereal, there is little research on rye contamination with mycotoxins. In this study, the occurrence of *Fusarium* mycotoxins (deoxynivalenol, nivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, monoacetoxyscirpenol, diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, and zearalenone), as well as ochratoxin A, in 60 winter rye samples of four varieties (KWS Binnitto, KWS Serafino, Dańkowskie Granat and Farm Saved Seed) cultivated in three consecutive growing seasons in five different regions of Poland was determined using liquid chromatography with tandem mass spectrometry and fluorescence detection. Deoxynivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, and zearalenone had the highest occurrence in samples (90%, 63%, 57%, and 45% positive results, respectively). The mean concentrations of these analytes were 28.8 µg/kg (maximum 354.1 µg/kg), 0.98 µg/kg (maximum 6.63 µg/kg), 2.98 µg/kg (maximum 29.8 µg/kg), and 0.69 µg/kg (maximum 10.2 µg/kg), respectively. The mean concentrations for individual mycotoxins were highest in the 2016/2017 growing season. In the 2016/2017 growing season, at least two mycotoxins were detected in 95% of the samples, while in the 2018/2019 growing season, 70% of samples contained one or no mycotoxins. The frequencies of mycotoxin occurrence in different rye varieties were similar. Although a high frequency of mycotoxin occurrence was noted (especially deoxynivalenol), their concentrations were low, and none of the analyzed rye samples exceeded the maximum acceptable mycotoxin level set by the European Commission.

**Keywords:** winter rye; *Fusarium* mycotoxins; trichothecenes; ochratoxin A; chromatography; LC-MS

**Key Contribution:** Deoxynivalenol; T-2 toxin; HT-2 toxin; and zearalenone were the most frequent occurring mycotoxins in winter rye; but their concentrations were low. The occurrence and co-occurrence of mycotoxins depended on the weather conditions during the growing season. A highly significant correlation was determined for T-2 toxin and HT-2 toxin; as well as for deoxynivalenol and zearalenone.

## 1. Introduction

Rye (*Secale cereale* L.) is one of the younger cultivated plants. It reached Europe from Central Asia, where even now the wild forms of this plant still grow. Initially, as a weed of cereal crops, it spread to areas of Central and Northern Europe, where plants with higher climatic and soil requirements, such as wheat or barley, subsequently began to be displaced as the conditions of cultivation deteriorated. Rye cultivation began in Europe around 1000 B.C., but it arrived later to Poland, probably in the 5th century B.C. [1].

Although the rye acreage has decreased in recent years, the cool temperate zones of Europe still remain the major rye growing areas. The main producers are Germany (2737 thousand tons), Poland (2673 thousand tons), Russia (2547 thousand tons), Denmark (723 thousand tons), and Belarus (670 thousand tons). In Poland, rye is grown on approximately 873 thousand ha, which accounts for over 8% of all cereals sown. On average, around 2673 thousand tons of grain are obtained in Poland during the year, which constitutes 19.5% of the world harvest [2].

Rye is a typical feed plant. It is given to animals as grain (over 50% of the grain harvest is fed), as well as forage or rye bran. Rye grain is also used in the cereal and milling industry as a raw material for the production of flour (light or dark), from which various types of bread are made. Rye grains contain relatively large amounts of dietary fiber, which includes health-promoting pentosans, fructans, and  $\beta$ -glucans, as well as easily digestible proteins and vitamins. Rye grain also contains phenolic acids and phytoestrogens [3]. Eating rye becomes dangerous when the rye grains contain mycotoxins—secondary metabolites of mold fungi. Mycotoxins can be formed both during plant growth in the field and during grain storage [4]. Field toxins include the ergot alkaloids produced by fungi of the genus *Claviceps* (such as *Claviceps purpurea*), as well as trichothecenes and zearalenone produced by fungi of the *Fusarium* genus (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, and *F. nivale*). The mycotoxins produced during storage include ochratoxin A produced by the fungi *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*. The production of mycotoxins is closely related to environmental factors, which include: substrate type and consistency, presence of microelements, occurrence of accompanying microflora, humidity, and temperature, of which the latter two are of greatest importance [5]. Gaikpa et al. [6] found that rye is the most resistant grain to *Fusarium* head blight (FHB) and has the lowest kernel damage, compared to triticale, durum wheat and bread wheat.

Trichothecenes are a group of over 150 compounds, among which the most important is group B containing such toxins as nivalenol (NIV) and deoxynivalenol (DON), as well as group A, to which toxins T-2 and HT-2 belong. In Central Europe, deoxynivalenol is one of the most common mycotoxins in cereals and cereal products. It inhibits protein synthesis and gives rise to immunological weakness, while its symptoms are mainly vomiting and decreased appetite. The T-2 and HT-2 toxins have cytotoxic and immunosuppressive effects. Zearalenone (ZEN), due to its structure, has the ability to bind to estrogen receptors in mammals, which can lead to hormonal changes. Ochratoxin A (OTA) is mainly nephrotoxic, but it also has hepatotoxic, teratogenic, mutagenic, and carcinogenic effects [7]. Due to the chemical stability of mycotoxins and the inability to completely eliminate them from raw materials and cereal products, the best way to ensure the safety of humans and animals against the undesirable effects of mycotoxins is to introduce standards regarding their permitted concentration and to systematically monitor their contamination of raw materials and products. In the European Union, maximum levels in rye are set as follows: ochratoxin A, 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (unprocessed rye), 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (all products derived from unprocessed rye); deoxynivalenol, 1.250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (unprocessed rye), 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye intended for direct human consumption, e.g., rye flour, bran), 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (bread, rye snacks, and breakfast cereals); sum of T-2 and HT-2 toxins, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye), 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye for direct human consumption), 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye bran), 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (other rye milling products), 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (bread, snacks, and pasta); zearalenone, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (unprocessed rye), 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye intended for direct human consumption, e.g., rye flour, bran), 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (bread, rye snacks, and breakfast cereals) [8,9]. In addition, the European Union has set guidance levels for rye mycotoxin contamination for feed purposes: ochratoxin A, 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye and rye products); deoxynivalenol, 8.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye and rye products); sum of T-2 and HT-2 toxins, 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye and rye products); zearalenone, 2.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (rye and rye products) [10].

The aim of this study was to evaluate the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins and ochratoxin A in winter rye varieties grown in five locations across Poland over a three-year period. Another aspect of the research concerns the co-occurrence of the determined mycotoxins, as well as potential correlations between them.



## 2. Results and Discussion

### 2.1. Weather Data and Agronomic Practise

Weather conditions (temperature and precipitation level) during the growing season are considered to be the main factors affecting fungal infection and mycotoxin production. Weather conditions in May (flowering) and July (harvest) are crucial for the biosynthesis of mycotoxins in cereals [11]. Exposure to lower temperatures is often connected with higher humidity (higher water activity) and late harvest, and may lead to higher deoxynivalenol concentrations [12,13]. In the 2016/2017 growing season, weather conditions were favorable for the formation of *Fusarium* head blight. From the middle of heading (the 11th to 20th of May) to the end of the early dough stage (the first ten days in July), the rainfall total reached 156.3 mm, and the mean temperature was 17.3 °C (Figures 1 and 2).

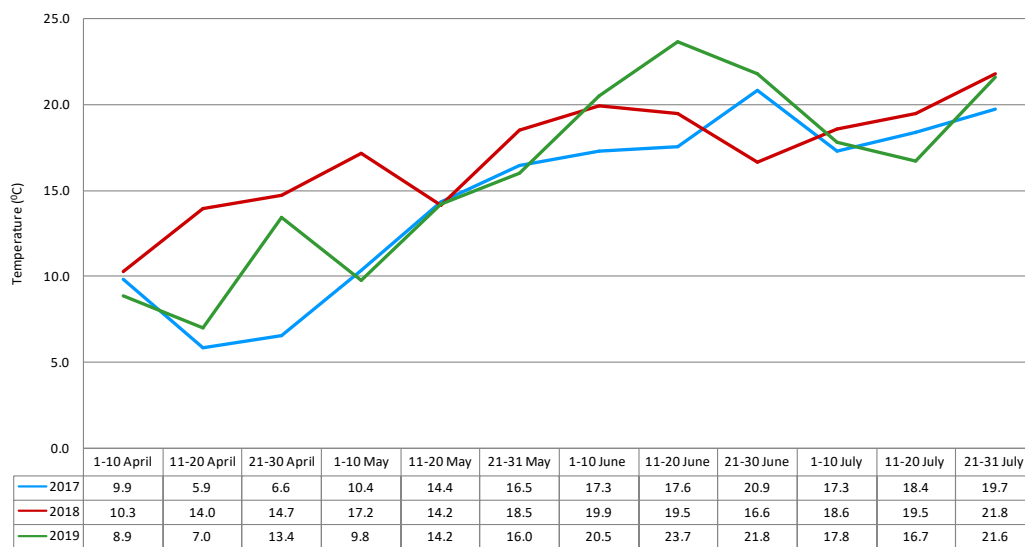


Figure 1. Temperature (ten-days mean) during the growing seasons of winter rye (recorded at Boguszyn).

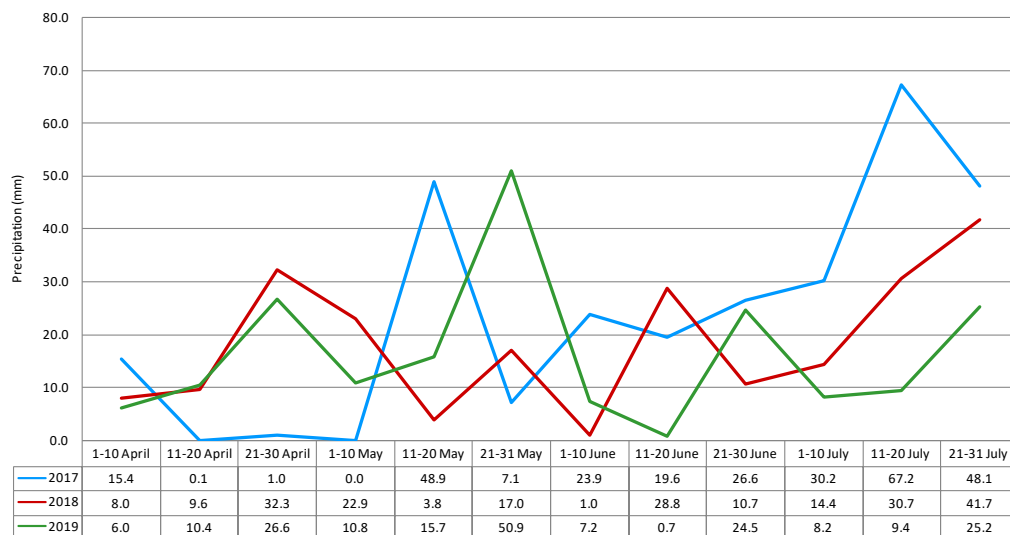


Figure 2. Precipitation (ten-days mean) during the growing seasons of winter rye (recorded at Boguszyn).

These conditions were more favorable for the development of *Fusarium* fungi and rye contamination by mycotoxins compared to the 2017/2018 and 2018/2019 growing seasons, when the total rainfall was 75.7 mm and 107.2 mm, respectively, and the mean temperatures for these periods were 17.9 °C and 19.0 °C, respectively.

In addition to climatic conditions, agricultural practice may have a significant impact on the development of *Fusarium* fungi. For now, however, the results of research on this topic are ambiguous. In Germany, Klix et al. [14] conducted a three-year monitoring of wheat and concluded that tillage and previous crops did not influence the FHB causing species composition in wheat heads. In contrast, in Sweden, Karlsson et al. [15] found that the agricultural practice (application of fertilizers, pesticides and tillage), did have an impact on the amount of some *Fusarium* species in wheat grains. Replacement of conventional farming with organic ones can lead to a reduction in the number of *Fusarium* fungi, and thus a potential reduction in the concentrations of mycotoxins present in cereals. In Norway, Bernhoft et al. [13] revealed that lack of crop rotation, lodged fields, use of mineral fertilizers and, to some extent, use of pesticides (commonly used in conventional farming) were connected to an increase of total *Fusarium* molds.

## 2.2. Occurrence of Mycotoxins

DON is the most prevalent and important mycotoxin occurring in cereal grain in countries with a temperate climate. It belongs to the type B trichothecene group and is produced mainly by *F. graminearum* and *F. culmorum* [16]. In this study, DON was the most common mycotoxin, being detected in 54 samples (90%). No sample exceeded the maximum levels set by the EU [8,10]. All the samples taken in the 2016/2017 growing season contained DON (mean 70.6 µg/kg; maximum 354.1 µg/kg), while in the 2017/2018 and 2018/2019 growing seasons the percentage of positive samples was 90% and 80%, respectively (mean 9.62 µg/kg and 6.21 µg/kg, respectively). Statistically significant differences were found for DON between all three growing seasons ( $\alpha = 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** Concentrations of mycotoxins in investigated rye samples in different growing seasons.

	DON	NIV	3ADON	MAS	DAS	T2	HT2	ZEN	OTA
<b>Growing Season 2016/2017</b>									
Number of samples	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Positive (%)	100	15	10	5	0	85	85	80	10
Mean (µg/kg)	70.6 <sup>c</sup>	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	1.64 <sup>c</sup>	6.59 <sup>b</sup>	1.82 <sup>b</sup>	<LOQ
Mean positive (µg/kg)	70.6	8.06	<LOQ	<LOQ	<LOD	1.93	7.75	2.27	1.58
Median (µg/kg)	45.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.98	3.95	0.60	<LOD
Maximum (µg/kg)	354.1	9.72	3.00	<LOQ	<LOD	6.63	29.8	10.2	2.75
<b>Growing Season 2017/2018</b>									
Number of samples	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Positive (%)	90	10	0	10	0	70	55	50	0
Mean (µg/kg)	9.62 <sup>b</sup>	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	0.96 <sup>b</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	<LOD
Mean positive (µg/kg)	10.7	15.5	<LOD	2.29	<LOD	1.37	2.27	0.49	<LOD
Median (µg/kg)	8.44	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.61	<LOQ	<LOQ	<LOD
Maximum (µg/kg)	27.9	26.4	<LOD	3.07	<LOD	5.62	3.25	1.99	<LOD
<b>Growing Season 2018/2019</b>									
Number of samples	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Positive (%)	80	5	0	5	0	35	30	5	0
Mean (µg/kg)	6.21 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOD	<LOD
Mean positive (µg/kg)	7.77	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	1.03	3.64	<LOQ	<LOD
Median (µg/kg)	4.17	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Maximum (µg/kg)	17.0	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	1.68	6.93	<LOQ	<LOD

For the calculation, the results below the limit of detection (LOD) value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the limit of quantification (LOQ) were set as the LOQ value for each mycotoxin. Mean concentrations in the same column with different letters a–c are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ).

As observed in Table 2, the highest mean concentration was determined in Wyczechy (54.1 µg/kg, 100% positive samples), whereas the lowest was in Boguszyn (13.3 µg/kg, 75% positive samples). No statistically significant differences for DON mean concentration were noted only in Boguszyn and Marianowo.

**Table 2.** Concentrations of mycotoxins in investigated rye samples in different samples collection location.

	DON	NIV	3ADON	MAS	DAS	T2	HT2	ZEN	OTA
<b>Boguszyn</b>									
Number of samples	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Positive (%)	75	0	0	0	0	42	42	50	0
Mean (µg/kg)	13.3 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	<LOD
Mean positive (µg/kg)	17.8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.91	2.12	0.55	<LOD
Median (µg/kg)	10.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
Maximum (µg/kg)	42.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.22	2.58	1.92	<LOD
<b>Marianowo</b>									
Number of samples	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Positive (%)	100	0	0	0	0	92	92	33	0
Mean (µg/kg)	13.5 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.03 <sup>d</sup>	7.43 <sup>c</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	<LOD
Mean positive (µg/kg)	13.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.21	8.10	0.23	<LOD
Median (µg/kg)	8.20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.13	2.70	<LOD	<LOD
Maximum (µg/kg)	48.2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.63	29.8	0.30	<LOD
<b>Walewice</b>									
Number of samples	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Positive (%)	100	17	0	25	0	50	50	58	0
Mean (µg/kg)	19.3 <sup>b</sup>	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	0.98 <sup>b</sup>	3.38 <sup>b</sup>	0.37 <sup>c</sup>	<LOD
Mean positive (µg/kg)	19.3	15.5	<LOD	2.02	<LOD	1.96	6.77	0.63	<LOD
Median (µg/kg)	14.0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	0.21	<LOD
Maximum (µg/kg)	48.3	26.4	<LOD	3.07	<LOD	3.01	14.47	1.99	<LOD
<b>Prusim</b>									
Number of samples	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Positive (%)	75	25	8	8	0	58	50	42	8
Mean (µg/kg)	44.0 <sup>c</sup>	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ <sup>a</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	0.93 <sup>d</sup>	<LOQ
Mean positive (µg/kg)	58.6	6.10	<LOQ	<LOQ	<LOD	0.74	3.58	2.24	2.75
Median (µg/kg)	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Maximum (µg/kg)	210.7	9.72	<LOQ	<LOQ	<LOD	1.44	5.51	3.82	2.75
<b>Wyczechy</b>									
Number of samples	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Positive (%)	100	8	8	0	0	75	50	42	8
Mean (µg/kg)	54.1 <sup>d</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.10 <sup>c</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	1.80 <sup>e</sup>	<LOD
Mean positive (µg/kg)	54.1	8.89	<LOQ	<LOD	<LOD	1.47	2.80	4.32	<LOQ
Median (µg/kg)	12.9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Maximum (µg/kg)	354.1	8.89	<LOQ	<LOD	<LOD	5.62	3.57	10.2	<LOQ

For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. Mean concentrations in the same column with different letters a-e are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ).

In the presented study (Table 3), the highest mean concentration (43.5 µg/kg) of DON was found in the population of rye from farm reproduction (FSS), while the lowest was in the Dańkowskie Granat rye variety (19.3 µg/kg). Statistically significant differences appeared among all four rye varieties ( $\alpha = 0.05$ ).

**Table 3.** Concentrations of mycotoxins in investigated rye samples in different varieties.

	DON	NIV	3ADON	MAS	DAS	T2	HT2	ZEN	OTA
<b>KWS Binntto hybrid rye</b>									
Number of samples	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Positive (%)	87	20	7	7	0	67	60	47	0
Mean ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	24.1 <sup>b</sup>	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	1.06 <sup>c</sup>	4.01 <sup>c</sup>	1.13 <sup>d</sup>	<LOD
Mean positive ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	27.8	15.0	<LOQ	3.07	<LOD	1.59	6.69	2.42	<LOD
Median ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	12.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Maximum ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	136.7	26.4	<LOQ	3.07	<LOD	5.42	23.9	10.2	<LOD
<b>KWS Serafino Hybrid Rye</b>									
Number of samples	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Positive (%)	93	7	0	7	0	60	53	40	7
Mean ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	28.4 <sup>c</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.80 <sup>a</sup>	2.03 <sup>b</sup>	0.35 <sup>a</sup>	<LOQ
Mean positive ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	30.4	4.65	<LOD	<LOQ	<LOD	1.34	3.81	0.87	2.75
Median ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	9.05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.65	<LOQ	<LOD	<LOD
Maximum ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	210.7	4.65	<LOD	<LOQ	<LOD	3.00	9.88	3.28	2.75
<b>Dańkowskie Granat Population Rye</b>									
Number of samples	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Positive (%)	87	7	0	7	0	60	53	53	7
Mean ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	19.3 <sup>a</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.86 <sup>b</sup>	<LOQ <sup>a</sup>	0.59 <sup>b</sup>	<LOD
Mean positive ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	22.3	5.58	<LOD	<LOQ	<LOD	1.43	3.42	1.10	<LOQ
Median ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	7.83	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
Maximum ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	96.6	5.58	<LOD	<LOQ	<LOD	5.62	6.51	3.64	<LOQ
<b>Farm Saved Seed Population Rye</b>									
Number of samples	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Positive (%)	93	7	7	7	0	67	60	40	0
Mean ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	43.5 <sup>d</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.21 <sup>d</sup>	4.04 <sup>c</sup>	0.70 <sup>c</sup>	<LOD
Mean positive ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	46.7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	1.82	6.73	1.75	<LOD
Median ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	11.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
Maximum ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	354.1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	6.63	29.76	6.79	<LOD

For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. Mean concentrations in the same column with different letters a-d are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ).

In our previous study, Błajet-Kosicka et al. [17], we analyzed 76 rye grain samples (collected during the 2009–2012 period), DON being detected in 38 of these (50%). Its mean and maximum concentrations were 22.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 254.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. In Lithuania, Mankevičienė et al. [18] found that 50% of rye samples were contaminated by DON, with a maximum concentration of 158.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In one out of 63 rye samples (2%), DON was found at a concentration of 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in a 6-year survey in the Russian Federation [19]. In another study, Remža et al. [20] analyzed 39 Slovak rye grains, and DON was found at mean and maximum concentrations of 67.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 289.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. In an earlier study in Germany, Gottschalk et al. [21] detected DON in 100% out of 61 analyzed rye samples, with mean and maximum concentrations of 28.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 288  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. Pleadin et al. [22] analyzed 16 rye samples in Croatia, and DON was found in six of the samples (38%) at a mean concentration of 50.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In our study, the contamination rate of rye samples was similar to the results reported by Gottschalk et al. [21] and much higher than the results presented by Błajet-Kosicka et al. [17], Mankevičienė et al. [18], Tutelyan et al. [19], Remža et al. [20], and Pleadin et al. [22]. The mean concentration of DON in rye samples was similar to the results obtained by Błajet-Kosicka et al. [17] and Gottschalk et al. [21], and lower than the results reported by Remža et al. [20] and Pleadin et al. [22].

Nivalenol was found in six out of 60 rye samples (10%), giving an overall mean concentration below its detection limit. Its highest concentration (26.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) was determined in Walewice in the 2017/2018 growing season for the KWS Binntto hybrid rye variety. Błajet-Kosicka et al. [17] reported that in two out of 76 rye samples (3%), NIV was detected, with a maximum concentration below the limit of quantification (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In Germany, NIV was found in 3% of rye samples, and its mean

concentration was 0.06 µg/kg [21]. In the presented study, the mean concentration of NIV in the rye samples was similar to the results reported by other researchers [21].

Similarly to nivalenol, low levels of 3-acetyl-deoxynivalenol (3ADON) were determined in the rye samples. The 3ADON was detected in two samples, with the highest concentration being below the limit of quantification (3 µg/kg). The results presented in this study are similar to those obtained earlier in Poland by Błajet-Kosicka et al. [17], who detected 3ADON in two out of seventy-six samples, at a maximum level of <15 µg/kg. Other results were reported by Gottschalk et al. [21]: the maximum concentration was low (5.0 µg/kg), but 3ADON was found in 59% of the samples.

T-2 toxin is the most important type A trichothecene mycotoxin and is produced mainly by *F. sporotrichioides*, *F. poae*, and *F. equiseti* [4]. T-2 toxin occurred in 63% of the rye samples, and its highest concentration was 6.63 µg/kg. The highest mean concentration of this toxin was recorded in the 2016/2017 growing season (1.64 µg/kg; 80% positive samples), while the lowest was in the 2018/2019 growing season (mean below the limit of quantification; 35% positive samples). The highest mean concentration was determined in Marianowo (2.03 µg/kg, 92% positive samples), while the mean concentrations in Boguszyn and Prusim were below the limit of quantification. In this study, T-2 toxin at the highest mean concentration (1.21 µg/kg) was found in the population of rye from farm reproduction (FSS), while the lowest was in KWS Serafino hybrid rye (0.80 µg/kg). Statistically significant differences were noted between all growing seasons ( $\alpha = 0.05$ ), as well as between all rye varieties ( $\alpha = 0.05$ ). In the earlier study in Poland, Błajet-Kosicka et al. [17] found that 30% of 76 rye samples were contaminated with T-2 toxin at a mean content <2 µg/kg (maximum 24.8 µg/kg). In another study with eight rye samples, T-2 toxin was found in 88% of the samples with a maximum value of 20.2 µg/kg [18]. In Russia, Tutelyan et al. [19] analyzed 33 rye samples, and T-2 toxin was found in 12% of the samples with a maximum concentration of 12.0 µg/kg (mean <2 µg/kg). Gottschalk et al. [21] reported that T-2 toxin was detected in 53 (87%) out of 61 rye samples in Germany, at mean and maximum concentrations of 0.13 µg/kg and 0.77 µg/kg, respectively. In our study the contamination rate was lower than that reported by some other authors [18,21] but higher than that reported by Błajet-Kosicka et al. [17] and Tutelyan et al. [19].

HT-2 toxin was detected in 34 samples (57%), and its mean and maximum concentrations were 2.98 µg/kg and 29.8 µg/kg, respectively. The highest mean concentration was obtained in the 2016/2017 growing season (6.59 µg/kg; 85% positive samples). Statistically significant differences for this toxin were found in 2016/2017 growing season ( $\alpha = 0.05$ ). Similarly to T-2 toxin, the highest mean content of HT-2 toxin was found in Marianowo (7.43 µg/kg, 92% positive samples). No statistically significant differences for HT-2 mean concentration values were observed between Boguszyn, Prusim and Wyczechy. The most contaminated rye varieties were KWS Binntto and rye from farm reproduction (FSS), with mean concentrations of 4.01 µg/kg and 4.04 µg/kg, respectively. The mean content of this mycotoxin was the lowest in the Dańkowskie Granat variety (below the limit of quantification). For HT-2 toxin no statistically significant differences were noted between KWS Binntto and FSS rye varieties. In the earlier survey of rye in Poland, Błajet-Kosicka et al. [17] detected HT-2 toxin in 29% of the samples, with a maximum concentration of 44.1 µg/kg. In five out of 33 rye samples, HT-2 was found at a mean content of <5 µg/kg (maximum 38 µg/kg). In Germany, Gottschalk et al. [21] analyzed 61 rye samples, and HT-2 toxin was found in 57 (93%) samples at mean and maximum concentrations of 0.56 µg/kg and 2.6 µg/kg, respectively. In our study, the mean and maximum levels were similar to the results obtained by Błajet-Kosicka et al. [17], and they were higher than the results reported by Gottschalk et al. [21].

Monoacetoxyscirpenol (MAS) and diacetoxyscirpenol (DAS) are two more mycotoxins belonging to the type A trichothecene group. MAS was detected in 7% of the samples (mean below LOD; maximum 3.07 µg/kg), while DAS was not detected in any rye sample. The highest concentrations of MAS were recorded in the 2017/2018 growing season (mean from positive results 2.29 µg/kg). Similar results were presented by Błajet-Kosicka et al. [17]. MAS was detected in five (7%) out of seventy-six samples with mean and maximum concentrations below the limits of detection (1 µg/kg)

and quantification (3 µg/kg), respectively. DAS was not detected in any of the analyzed samples. Gottschalk et al. [21] reported that in 53 (87%) out of 61 rye samples, the mean and maximum contents of MAS were 0.05 µg/kg and 0.31 µg/kg, respectively, whereas DAS was not found in any sample.

Zearalenone is one of the most common *Fusarium* mycotoxins in the temperate climate of Central Europe, being produced mainly by *F. graminearum* and *F. culmorum* [4]. In the presented study, ZEN was detected in 27 samples (45%). In all the samples, ZEN concentrations were below the maximum levels set by the EU [8,10]. Eighty percent of the samples in the 2016/2017 growing symptoms contained ZEN (mean 1.82 µg/kg; maximum 10.2 µg/kg), while in the 2018/2019 growing season the percentage of positive samples was only 5% (mean < LOD, maximum < LOQ). The highest mean concentration was found in Wyczechy (1.80 µg/kg, 42% positive samples), whereas the lowest was in Marianowo (<LOQ, 33% positive samples). In this study, the highest mean concentration (1.13 µg/kg) of ZEN was found in the KWS Binntto hybrid rye, while the lowest was in the KWS Serafino hybrid rye variety (0.35 µg/kg). Statistically significant differences for ZEN mean concentration were determined between all growing seasons ( $\alpha = 0.05$ ), sample collection locations ( $\alpha = 0.05$ ), as well as all rye varieties ( $\alpha = 0.05$ ) (Tables 1–3). In our earlier study, Błajet-Kosicka et al. [17], we analyzed 76 rye samples and ZEN was detected in 54% of the samples with mean and maximum concentrations of 4.5 µg/kg and 148 µg/kg, respectively. In Lithuania, Mankevičienė et al. [18] analyzed eight winter rye samples, and ZEN was found in 50% of the samples with a maximum content of 21.2 µg/kg. In another study, Pleadin et al. [22] determined ZEN in 25% of Croatian rye grain samples with mean and maximum contents of 1.44 µg/kg and 7.81 µg/kg, respectively. In the presented study, the level of ZEN rye contamination was similar to the results reported by Błajet-Kosicka et al. [17] and Mankevičienė et al. [18], while higher than the results reported by Pleadin et al. [22]. The maximum ZEN concentration was lower than the results presented by Błajet-Kosicka et al. [17] and Mankevičienė et al. [18], and similar to the results of Pleadin et al. [22].

Ochratoxin A is produced primarily by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* in storage conditions that favor fungal growth and toxin production. There is little information about the conditions needed to produce OTA from fungi in grains during development in the field [4]. No sample exceeded the maximum levels of OTA set by the EU [8,10]. Ochratoxin A was found in two (3%) out of 60 samples of rye grain. Its highest concentration was determined in KWS Serafino hybrid rye in Prusim in the 2016/2017 growing season. In an earlier study, Krysińska-Traczyk et al. [23] analyzed five rye samples in Poland, and OTA was found in 40% of the samples. Its mean and maximum concentrations were 0.19 µg/kg and 0.55 µg/kg, respectively. In another study in Poland, Hajok et al. [24] analyzed 12 samples of rye flour, and OTA was detected in 67% of the samples, with mean and maximum concentrations of 4.3 µg/kg and 19.5 µg/kg, respectively. In Croatia, Pleadin et al. [22] analyzed 16 rye samples and obtained mean and maximum concentrations of 0.89 µg/kg and 4.12 µg/kg, respectively. In 75% of eight rye samples from Serbia, OTA was found at a mean concentration of 3.93 µg/kg (maximum 23.04 µg/kg) [25]. In another study, Cardoso et al. [26] did not find OTA in Portuguese rye flour. In our study, the contamination levels of OTA in rye samples were lower than the results reported by Pleadin et al. [22], Krysińska-Traczyk et al. [23], Hajok et al. [24], and Torović [25].

### 2.3. Co-Occurrence and Correlation Between Mycotoxins

Although mycotoxins produced by *Fusarium* molds are a major concern worldwide, there are few published articles regarding the interaction between them. Most of the research shows synergistic or additive effects on the different parameters of animals' well-being [27]. Therefore, it is extremely important to determine not just one, but the largest possible number of mycotoxins in the samples tested. In the 2016/2017 growing season, at least one mycotoxin was detected in all samples, and 70% of the samples contained four or more mycotoxins. While in the 2018/2019 growing season, 70% of the samples contained one or no mycotoxins, and four or more mycotoxins were found in only 10% of the rye samples (Figure 3). The frequencies of mycotoxin occurrence in different rye varieties were similar

(Figure 4). In Marianowo, three or more mycotoxins were present in 92% of the samples, while in other locations these values were around 50% (Figure 5).

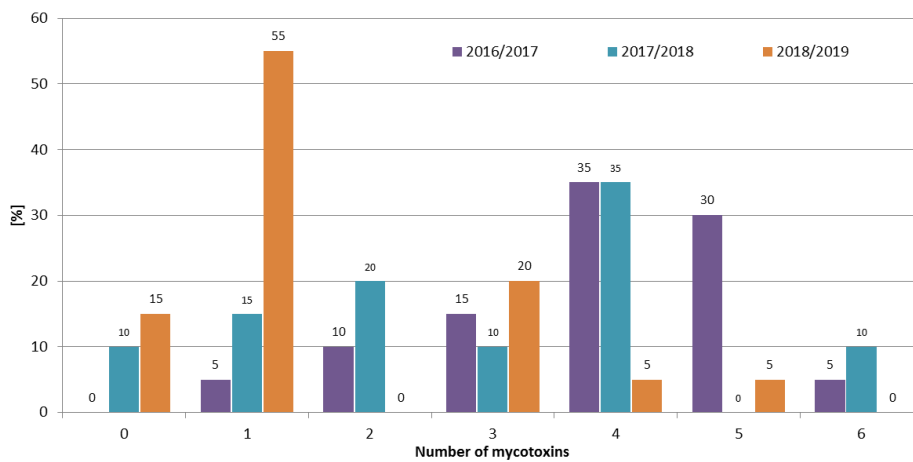


Figure 3. Distribution of the number of mycotoxins in different growing seasons.

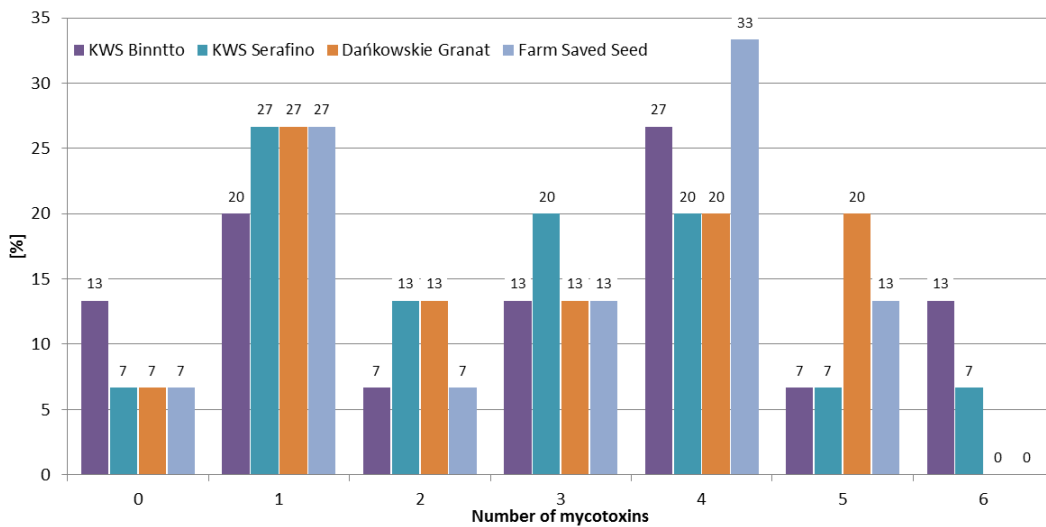


Figure 4. Distribution of the number of mycotoxins in different rye varieties.

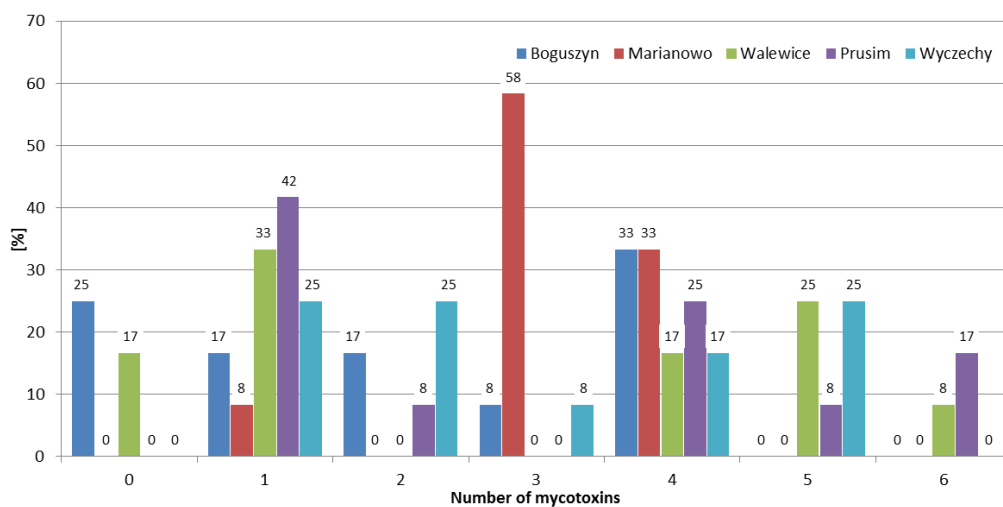


Figure 5. Distribution of the number of mycotoxins in different samples collection location.

In earlier research in Poland, Błajet-Kosicka et al. [17] found that over 50% of the rye samples contained at least two mycotoxins, and over 5% of the samples contained five or more mycotoxins. In Lithuania, Mankevičienė et al. [18] analyzed DON, ZEN, and T-2 toxin in winter cereals in 2006 and 2007, and found that two or more of these mycotoxins were present in 84% and 96% of the samples, respectively. In the presented study, two or more mycotoxins were detected in 67% of the samples; the results are lower than those reported by Mankevičienė et al. [18], while higher than those presented by Błajet-Kosicka et al. [17].

The combinations between mycotoxins were calculated for the most frequently occurring ones (DON, ZEN, T-2 toxin, and HT-2 toxin), as well as for ochratoxin A (since it is regulated by the EU). In the 2016/2017 and 2017/2018 growing seasons the most frequently co-occurring combinations were DON + ZEN and DON + T-2 + HT-2. In the 2018/2019 growing season the combination of DON + T-2 + HT-2 was the most frequent one (30% of the samples) (Figure 6). Considering the variety of rye and the location, the co-occurrence rates were similar for a given combination (Figure 7, Figure 8).

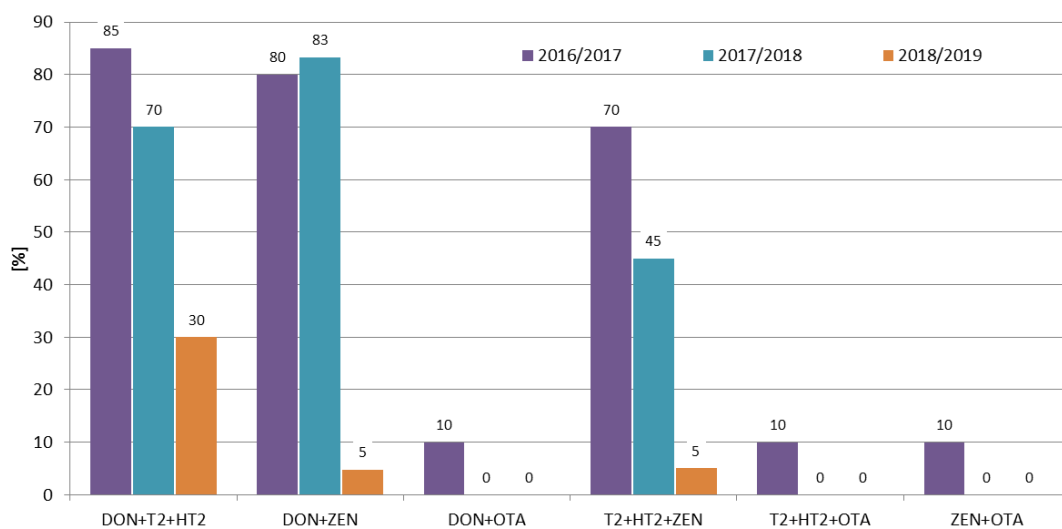


Figure 6. Percentage of co-occurrence of mycotoxins in different growing seasons.

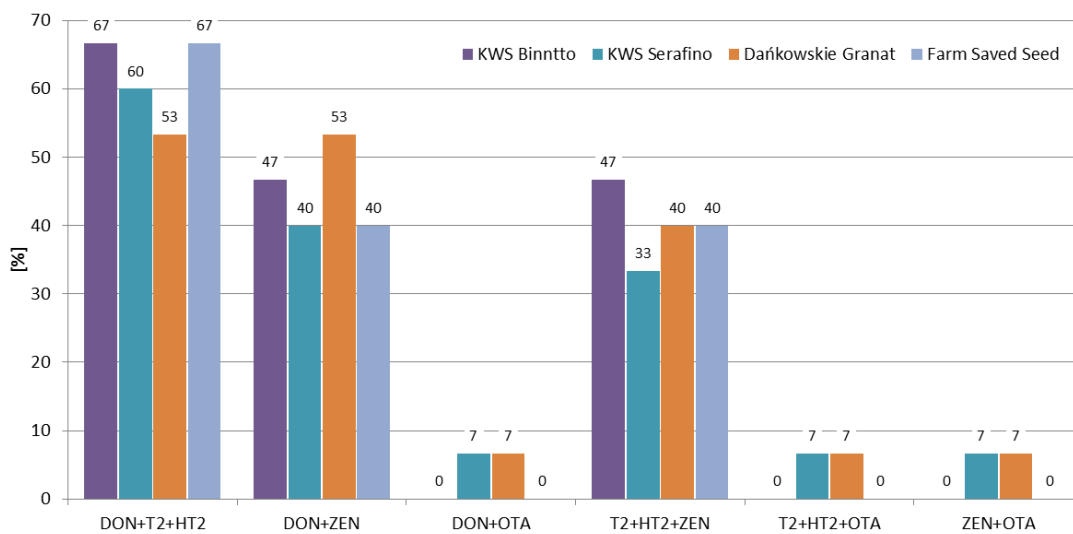
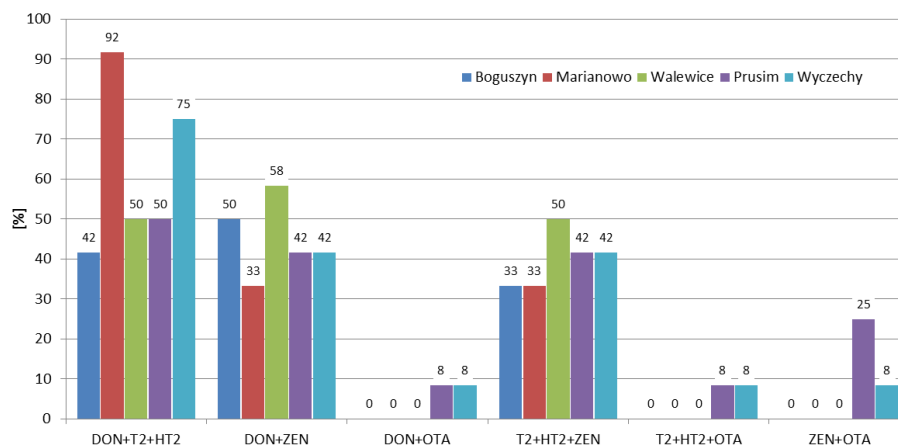


Figure 7. Percentage of co-occurrence of mycotoxins in different rye varieties.





**Figure 8.** Percentage of co-occurrence of mycotoxins in different locations.

In recent years, several researchers have presented the co-occurrence of the most important mycotoxins in rye samples. In our previous study, Błajet-Kosicka et al. [17], we examined 76 rye grain samples and found that combinations of DON + ZEN (15.4% of all samples) and DON + T-2 + HT-2 + ZEN (14.5% of the samples), were the most common. In Lithuania, Mankevičienė et al. [18] analyzed *Fusarium* mycotoxins in 32 (in 2006) and 28 (in 2007) winter grain samples (including rye), and found that combinations of DON + ZEN (13% of the samples) and DON + T-2 + ZEN (70% of the samples) were present at the highest percentage in 2006 and 2007, respectively. Tutelyan et al. [19] found T-2 + HT-2 in 13% of 23 rye samples from Russia, and the co-occurrence of T-2 + HT-2 + ZEN and ZEN + HT-2 was found in 4% of the samples. In the present study, the co-occurrence of DON + ZEN (45% of all samples) was higher than the results reported by Błajet-Kosicka et al. [17] and Mankevičienė et al. [18].

Table 4 shows the correlations between individual mycotoxin levels in the analyzed rye samples. Due to the low contamination rate of most mycotoxins, we determined correlations for the most frequently occurring ones, i.e., DON, T-2, HT-2, and ZEN. A highly significant ( $p < 0.001$ ) correlation was determined for T-2 and HT-2 ( $r = 0.840$ ), as well as for DON and ZEN ( $r = 0.708$ ). In contrast, the correlations between DON and T-2, DON and HT-2, T-2 and ZEN, and HT-2 and ZEN were not significant ( $p = 0.528$ ,  $p = 0.816$ ,  $p = 0.745$ , and  $p = 0.930$ , respectively). The fact that DON and ZEN as well as T-2 and HT-2 can be produced by the same molds can explain their correlations [4]. In previous research in Poland, Błajet-Kosicka et al. [17] analyzed 76 rye samples and observed statistically confirmed dependencies between DON and ZEN, T-2 and HT-2, as well as T-2 and ZEN ( $r = 0.579$ ,  $r = 0.586$ , and  $r = 0.556$ , respectively). In Germany, Gottschalk et al. [21] determined a correlation between T-2 and HT-2, as well as DON and 15acetylDON ( $r = 0.873$  and  $r = 0.957$ ), in 61 rye grain samples, but due to the low concentrations of these toxins, the correlations were less evident than in other analyzed grains (wheat and oats). In Lithuania, Mankevičienė et al. [28] observed statistically significant correlations between DON and ZEN, DON and T-2, as well as T-2 and ZEN in winter grains ( $r = 0.624$ ,  $r = 0.717$ , and  $r = 0.834$ , respectively); however, they were dependent on the year of research and the variety. The determined correlations in the presented study are in agreement with the results reported by Błajet-Kosicka et al. [17], Gottschalk et al. [21], and Mankevičienė et al. [28].

**Table 4.** Correlation between individual mycotoxins in rye samples.

	DON	T2	HT2	ZEN
DON	1			
T2	0.124	1		
HT2	0.134	0.840 <sup>a</sup>	1	
ZEN	0.708 <sup>a</sup>	0.001	0.010	1

<sup>a</sup> Significant at  $p < 0.001$ .

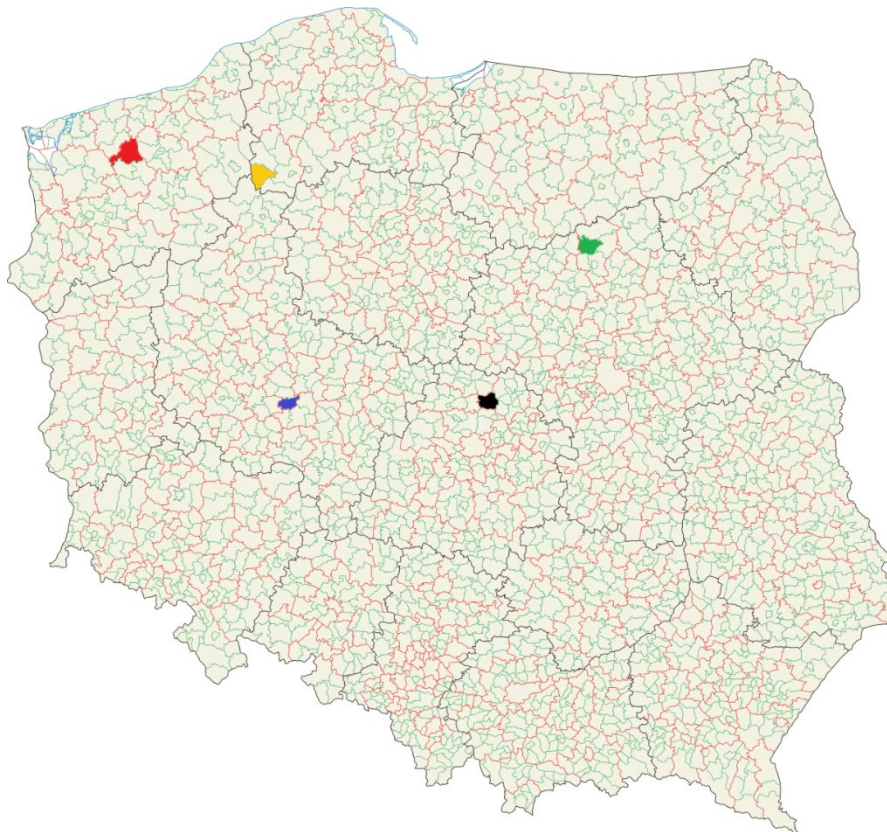
### 3. Conclusions

The occurrence of *Fusarium* mycotoxins (DON, NIV, 3ADON, MAS, DAS, T-2, HT-2, and ZEN), as well as OTA in 60 winter rye samples of four varieties (KWS Binntto, KWS Serafino, Dańkowskie Granat, and Farm Saved Seed) cultivated in three consecutive growing seasons in five different regions of Poland was determined using LC-MS/MS and LC-FLD. DON was determined in 90% of the samples, followed by T-2, HT-2, and ZEN (63%, 57%, and 45% positive results, respectively). The mean concentrations of these four analytes were: 28.8 µg/kg (maximum 354.1 µg/kg), 0.98 µg/kg (maximum 6.63 µg/kg), 2.98 µg/kg (maximum 29.8 µg/kg), and 0.69 µg/kg (maximum 10.2 µg/kg), respectively. OTA, a storage mycotoxin, was present in 3% of the samples, with a maximum concentration of 2.75 µg/kg. The mean concentrations for individual mycotoxins were highest in the 2016/2017 growing season, e.g., for DON 70.6 µg/kg, 9.62 µg/kg, and 6.21 µg/kg, respectively, in three consecutive vegetation seasons; for T-2 1.64 µg/kg, 0.96 µg/kg, and 0.36 µg/kg, respectively. Weather conditions (the lowest mean temperature and the highest total precipitation) in the first year of study were favorable for development of *Fusarium* fungi compared to the other two growing seasons. In the 2016/2017 growing season, 95% of the samples contained at least two mycotoxins and 70% of the samples contained four or more mycotoxins, while in the 2018/2019 growing season, 70% of the samples contained one or no mycotoxins, and four or more mycotoxins were found in only 10% of the rye samples. The frequencies of the mycotoxins' occurrence in different rye varieties were similar. In Marianowo three or more mycotoxins were present in 92% of the samples, while in other locations these values were around 50%. None of the analyzed rye samples exceeded the maximum acceptable mycotoxin level set by the European Commission. Although mycotoxins are one of the most important problems in crop and animal production worldwide, little is known so far about the possible existence of synergistic or additive effects regarding the interaction between them, making it difficult to assess the impact of such effects on the different parameters of animals' well-being. For this reason, it is very important to determine not only individual mycotoxins, but as many of them as possible in grain samples, which in the future may lead to a better understanding of the effects of combinations of mycotoxins on animal health.

### 4. Materials and Methods

#### 4.1. Samples

Four winter rye varieties, KWS Binntto (hybrid), KWS Serafino (hybrid), Dańkowskie Granat (population), and farm saved seed (FSS)—non certified seeds multiplied on a farm over five times (population)—were collected from trial fields in five regions of Poland (Figure 9). Field experiments were conducted in three consecutive seasons (2017–2019) using a randomized complete block method with four replications and a plot size of 10 m<sup>2</sup>. Rye was sown before the end of September in soil classes IVa, IVb, and V. The weather conditions (mean temperature and precipitation) during the growing seasons were collected from the Institute of Meteorology and Water Management [29]. Nitrogen fertilization was applied at levels of 100–140 kg N/ha, depending on the quality and richness of the soil. Herbicides and insecticides were used at appropriate frequencies and doses to provide adequate yields. Rye samples (500g per sample) were ground using a Retsch (Haan, Germany) ZM 200 laboratory mill, and stored in a cold, dry location until analysis.



**Figure 9.** Five locations in Poland where rye samples were cultivated and collected (Boguszyn—blue; Prusim—red; Walewice—yellow; Marianowo—green; Wyczechy—black).

#### 4.2. Chemicals

The mycotoxins DON, NIV, 3ADON, MAS, DAS, T2, HT2, ZEN, and OTA, as well as the internal standards 13C-DON, 13C-T2, 13C-HT2, and 13C-ZEN were bought from Romer Labs (Tulln, Austria). Acetonitrile (gradient grade), methanol (LC-MS grade), ammonium acetate (LC-MS grade), and acetic acid (LC-MS grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water for analysis was purified using Elix 3 and Simplicity UV systems from Merck (Darmstadt, Germany).

#### 4.3. Sample Preparation

##### 4.3.1. Trichothecenes and Zearalenone

Ground cereal grain samples (12.5 g) were extracted for 3 min using a homogenizer (Heidolph, Schwabach, Germany) with 50 mL acetonitrile/water (8/2, *v/v*). The extracts were then filtered with fluted filter paper (Vicom, Germany). 40  $\mu$ L of 13C-ZEN ( $c = 1.00 \mu\text{g/mL}$ ) was added to 4 mL of the extract, and after vortexing the mixture was applied to a BondElute Mycotoxin column (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Afterwards, 2 mL of the purified extracts were mixed with 50  $\mu$ L of the internal standard solution (13C-DON  $c = 2.50 \mu\text{g/mL}$ , 13C-T2  $c = 0.25 \mu\text{g/mL}$ , and 13C-HT2  $c = 0.25 \mu\text{g/mL}$ ) and evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen. The residues were reconstituted in 0.495 mL of methanol/water mixture (2/8, *v/v*) by vortexing for 1 min.

Trichothecenes and zearalenone were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometry MS/MS detection. The HPLC analyses were performed using a Shimadzu Nexera instrument with a Gemini-NX-C18 chromatographic column (150  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu$ m) from Phenomenex (Torrance, USA), at 25 °C using gradient elution. Both Mobile Phase A—1% acetic acid in water—and B—1% acetic acid in methanol—contained 5 mM ammonium acetate. Elution with 70% of Mobile Phase A was maintained for 0.5 min; subsequently a linear gradient was applied,

reaching 90% of Mobile Phase B after 5.5 min, being run isocratically for 4 min, and then being taken back to 70% of the Mobile Phase A, which was maintained till the end of the run at 15.0 min. The flow rate was set to 0.5 mL/min, and the injection volume was 7  $\mu$ L. Mass spectrometry was performed using an API 4000 (Sciex, Framingham, MA, USA). The electrospray ionization (ESI) interface was used in negative and positive ion modes at 500 °C with the following settings: curtain gas 25 psi, nebulizer gas 50 psi, auxiliary gas 50 psi, collision gas 6, ionization voltage  $-4000$  or  $+4500$  V. Optimized analyte-dependent MS/MS parameters are given in Table 5.

**Table 5.** Optimized electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI)-MS/MS conditions for analytical method.

		Precursor Ion [m/z]	Product Ions [m/z] *	Declustering Potential [V]	Collision Energy [V]	Cell Exit Potential [V]
NIV	[M+Ac] <sup>-</sup>	371.1	281.0/59.0	-40	-22/-40	-14/-5
DON	[M+Ac] <sup>-</sup>	355.1	264.8/58.9	-35	-20/-38	-17/-1
13C-DON	[M+Ac] <sup>-</sup>	370.2	310.0	-50	-14	-7
3ADON	[M+Ac] <sup>-</sup>	397.1	307.0/59.0	-50	-18/-42	-7/-1
MAS	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	342.1	265.0/107.1	46	13/19	18/6
DAS	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	384.1	307.0/247.0	51	17/19	20/16
HT2	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	442.2	215.0/263.0	51	19/17	14/18
13C-HT2	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	464.1	278.1	51	17	18
T2	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	484.1	215.0/185.0	61	25/29	14/12
13C-T2	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	508.3	322.1	61	19	8
ZEN	[M-H] <sup>-</sup>	317.1	130.8/174.9	-85	-40/-32	-7/-9
13C-ZEN	[M-H] <sup>-</sup>	335.1	139.9	-100	-42	-7

\* Values are given in the order quantifier/qualifier.

The concentrations of mycotoxins were calculated using external calibration. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) obtained for each mycotoxin using the analytical method are presented in Table 6. The LOD (signal-to-noise ratio of 3) and LOQ (signal-to-noise ratio of 10), respectively, were estimated using Analyst 1.6.2 software (Sciex, Framingham, USA) by spiking blank extract before extraction with low concentrations of analytes.

**Table 6.** Method performance parameters.

Mycotoxin	LOD ( $\mu$ g/kg)	LOQ ( $\mu$ g/kg)	Linearity ( $\mu$ g/kg)	Recovery (%) $\pm$ RSD ( $n = 3$ )
NIV	1.0	3.0	5–1000	75 $\pm$ 4
DON	1.0	3.0	5–2000	90 $\pm$ 2
3ADON	1.0	3.0	5–500	90 $\pm$ 7
MAS	0.50	1.5	5–500	85 $\pm$ 5
DAS	0.33	1.0	5–500	90 $\pm$ 3
HT2	0.67	2.0	5–1000	82 $\pm$ 4
T2	0.20	0.60	5–1000	88 $\pm$ 3
ZEN	0.07	0.20	5–500	110 $\pm$ 5

#### 4.3.2. Ochratoxin A

Ground cereal grain samples (12.5 g) were homogenized for 2 min with 50 mL of acetonitrile/water (6:4, *v/v*). The extracts were filtered with fluted filter paper (Vicom, Germany), and 5 mL aliquots were added to 55 mL of phosphate-buffered saline solution, and the mixtures were filtered again using microfiber filters (Vicom, Germany). Subsequently, 48 mL of the diluted extracts were applied to Ochrarep columns (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, UK). The columns were washed with 20 mL of water and dried with air. OTA was eluted using 1.5 mL of methanol/acetic acid (98/2, *v/v*). The eluates

were collected in 4 mL sample vials, 1.5 mL of water was passed through the columns, and the samples were vortexed.

Ochratoxin A was determined using HPLC with fluorescence detection. An HPLC system (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) comprising an L-2130 pump, L-2200 autosampler, L-2300 column oven, and L-2480 fluorescence detector was used. Chromatographic separation was achieved on a LiChrospher 100 RP-18 column (250 × 4.0 mm, 5 µm) from Merck (Darmstadt, Germany), equipped with a C-18 guard column, at 25 °C using isocratic elution. The mobile phase consisted of acetonitrile/2% acetic acid (7:3, v/v). The flow rate was 1 mL/min, and the injection volume was 50 µL. The excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set at 330 nm and 460 nm, respectively. The data was processed using EZChrom Elite version 3.1.1 software. The limits of detection and quantification were 0.13 µg/kg and 0.40 µg/kg, respectively, while the recovery value was 96%.

#### 4.4. Statistics

Descriptive statistics, including number of samples, percentage of positive results, mean, mean of positive samples, median and maximum concentrations, as well as Pearson's correlation coefficient and statistical significance (for a significance level  $\alpha = 0.001$ ), were calculated using MS Excel 2013 (Microsoft). A one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at  $\alpha = 0.05$  were used to assess the significance of the differences between mycotoxin concentrations (Statistica 13, StatSoft, Poland). For the calculation, the results below the LOD value were set as zero, whereas the results between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.K., M.T. and P.D.; methodology, R.K.; software, R.K.; validation, R.K.; formal analysis, R.K. and B.R.; investigation, R.K.; resources, R.K., M.T., P.D. and B.R.; data curation, R.K.; writing—original draft preparation, R.K.; writing—review and editing, M.T. and J.G.; visualization, R.K.; supervision, M.T. and J.G.; project administration, M.T. and J.G.; funding acquisition, M.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Center for Research and Development, as part of the BIOSTRATEG program, Environment, Agriculture and Forestry", contract number BIOSTRATEG2/297910/12/NCBR/2016 (ENERGYFEED project: "Development and assessment of the sustainable basis for economic, productive and biosafe livestock nutrition system utilizing the Poland's natural resources, and particularly the modern rye varieties").

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

#### Abbreviations

3ADON	3-acetyl-deoxynivalenol
DAS	diacetoxyscirpenol
DON	deoxynivalenol
FHB	<i>Fusarium</i> head blight
HT-2	HT-2 toxin
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
MAS	monoacetoxyscirpenol
NIV	nivalenol
OTA	ochratoxin A
T2	T-2 toxin
ZEN	zearalenone

#### References

1. Tarkowski, C. (Ed.) *Biologia żyta (Rye Biology)*; PWN: Warsaw, Poland, 1983.
2. Statistics Poland. *Statistical Yearbook of Agriculture*; Statistics Poland: Warsaw, Poland, 2018; ISSN 2080-8798.
3. Jasińska, I.; Kołodziejczyk, P.; Michniewicz, J. Rye seed as a potential source of pro-health compounds in diet. *Food Sci. Technol. Qual.* **2006**, *2*, 85–92.

4. Richard, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicosis—An overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 3–10. [[CrossRef](#)]
5. Richard, J.L.; Payne, G.A. Mycotoxins: Risk in plant, animal, and human systems. In *Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report No. 139*; Council for Agricultural: Ames, IA, USA, 2003.
6. Gaikpa, D.S.; Lieberherr, B.; Maurer, H.P.; Longin, C.F.H.; Miedaner, T. Comparison of rye, triticale, durum wheat and bread wheat genotypes for *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol contamination. *Plant Breed.* **2020**, *139*, 251–262. [[CrossRef](#)]
7. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**. L364/5–L364/24.
9. European Commission. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2013/165/EU). *Off. J. Eur. Union* **2013**. L91/12–L91/15.
10. European Commission. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). *Off. J. Eur. Union* **2006**. L229/7–L229/9.
11. Habschied, K.; Krška, R.; Sulyok, M.; Šarkanj, B.; Krstanović, V.; Lalić, A.; Šimić, G.; Mastanjević, K. Screening of various metabolites in six barley varieties grown under natural climatic conditions (2016–2018). *Microorganisms* **2019**, *7*, 532. [[CrossRef](#)]
12. Parikka, P.; Hakala, K.; Tiilikkala, K. Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change. *Food Addit. Contam. Part A* **2012**, *29*, 1543–1555. [[CrossRef](#)]
13. Bernhoft, A.; Torp, M.; Clasen, P.-E.; Løes, A.-K.; Kristoffersen, A.B. Influence of Agronomic and Climatic Factors on *Fusarium* Infestation and Mycotoxin Contamination of Cereals in Norway. *Food Addit. Contam. Part A* **2012**, *29*, 1129–1140. [[CrossRef](#)]
14. Klix, M.B.; Beyer, M.; Verreet, J.-A. Effects of cultivar, agronomic practices, geographic location, and meteorological conditions on the composition of selected *Fusarium* species on wheat heads. *Can. J. Plant Pathol.* **2008**, *30*, 46–57. [[CrossRef](#)]
15. Karlsson, I.; Friberg, H.; Kolseth, A.K.; Steinberg, C.; Persson, P. Agricultural factors affecting *Fusarium* communities in wheat kernels. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *252*, 53–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Eriksen, G.S.; Pettersson, H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2004**, *114*, 205–239. [[CrossRef](#)]
17. Błajet-Kosicka, A.; Twarużek, M.; Kosicki, R.; Sibiorowska, E.; Grajewski, J. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control* **2014**, *38*, 61–66. [[CrossRef](#)]
18. Mankevičienė, A.; Butkutė, B.; Gaurilčikienė, I.; Dabkevičius, Z.; Supronienė, S. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. *Food Control* **2011**, *22*, 970–976. [[CrossRef](#)]
19. Tutelyan, V.A.; Zakharova, L.P.; Sedova, I.B.; Perederyaev, O.I.; Aristarkhova, T.V.; Eller, K.I. Fusariotoxins in Russian Federation 2005–2010 grain harvests. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2013**, *6*, 139–145. [[CrossRef](#)]
20. Remža, J.; Lacko-Bartošová, M.; Kosík, T. *Fusarium* mycotoxin content of Slovakian organic and conventional cereals. *J. Cen. Eur. Agric.* **2016**, *17*, 164–175. [[CrossRef](#)]
21. Gottschalk, C.; Barthel, J.; Engelhardt, G.; Bauer, J.; Meyer, K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Addit. Contam. Part A* **2009**, *26*, 1273–1289. [[CrossRef](#)]
22. Pleadin, J.; Staver, M.M.; Markov, K.; Frece, J.; Zadavec, M.; Jaki, V.; Krupić, I.; Vahčić, N. Mycotoxins in organic and conventional cereals and cereal products grown and marketed in Croatia. *Mycotoxin Res.* **2017**, *33*, 219–227. [[CrossRef](#)]
23. Krysińska-Traczyk, E.; Perkowski, J.; Dutkiewicz, J. Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2007**, *14*, 159–167.
24. Hajok, I.; Kowalska, A.; Piekut, A.; Ćwieląg-Drabek, M. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population. *Food Chem.* **2019**, *284*, 264–269. [[CrossRef](#)]
25. Torović, L. Aflatoxins and ochratoxin A in flour: A survey of the Serbian retail market. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **2018**, *11*, 26–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Cardoso, R.V.C.; Fernandes, A.; Heleno, S.A.; Rodrigues, P.; González-Paramás, A.M.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours. *Food Chem.* **2019**, *280*, 123–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Grenier, B.; Oswald, I.P. Mycotoxin co-contamination of food and feed: Meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin J.* **2011**, *4*, 285–313. [[CrossRef](#)]
28. Mankevičienė, A.; Butkutė, B.; Dabkevičius, Z. Peculiarities of cereal grain co-contamination with *Fusarium* mycotoxins. *Zemdirb.Agric.* **2011**, *98*, 415–420.
29. Polish Institute of Meteorology and Water Management–National Research Institute. Available online: <https://dane.imgw.pl/> (accessed on 21 February 2020).



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## CONTAMINATION OF ACORNS OF PEDUNCULATE OAK (*QUERCUS ROBUR* L.), AS FEED MATERIAL, BY MOULDS AND MYCOTOXINS\*

Robert Kosicki<sup>1</sup>\*, Magdalena Twarużek<sup>1</sup>, Krystyna Kannenberg<sup>2</sup>, Jan Grajewski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Toxicology, Faculty of Biological Sciences, Kazimierz Wielki University, Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz, Poland

<sup>2</sup>High School of Environment Management, Poczтовая 13, 89-500 Tuchola, Poland

\*Corresponding author: robkos@ukw.edu.pl

### Abstract

In the past, pigs were commonly fed with acorns, and this was of remarkable economic importance. Currently this habit is continued in some areas, especially for production of prime-quality Iberian ham. Mature acorns, after shedding and during storage in unsuitable conditions, can be quickly infected with spores of many moulds, which cause mummification, blackening, dehydration, and nutrient loss. This study aimed to evaluate the quality of acorns of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). The samples were collected in 2017 in southern Wielkopolska (central part of Poland), as feed material. In mouldy acorns a very high number of fungi was found ( $2.6 \times 10^6$  cfu/g), and 97% of them represented pathogenic *Penicillium* spp. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis showed in mouldy acorns high concentrations of mycophenolic acid (14580 µg/kg) and patulin (50 µg/kg). The dominant mould species, *Penicillium expansum*, showed a high cytotoxicity of swine kidney cells using assay based on the conversion of the tetrazolium salt, 3-(4,5, dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyltetrazolium (MTT). This raises the question if the pathogenic metabolites of moulds present in acorns can be dangerous for livestock, especially pigs, and people, as acorns are beginning to be seen as an interesting and functional part of their diet.

**Key words:** acorns, *Quercus robur* L., moulds, mycotoxins, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, MTT assay

Oaks and their seeds (acorns) have always been of economic, aesthetic, and culture-forming importance. Krahl-Urban (1959) has discussed this issue in historical terms. In ancient Greece, oak trees were devoted to Zeus, whereas the Celtic god of thunder (Taranis) was the protector of oaks. Oak wood has been used by sculptors and oak trees have been common painting themes for ages. Oak forests were planted as hunting grounds. They provide wild animals with rich food reserves for autumn

---

\*This study was supported by the Polish Minister of Science and Higher Education, under the program “Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022 (Grant No.008/RID/2018/19).



and winter, especially in mast seeding years (i.e. when acorn crops are high). However, for a long time acorns were fed to the livestock, especially pigs. This habit is still continued in some European countries, e.g. Spain and Portugal.

Table 1. Nutrient content of stored unshelled acorns and grain of feed cereals

Nutrient (g/kg fresh weight)	Feed material				
	shelled acorns (DLG, 1982; Rakić et al., 2006)	rye (Feedinamics, 2020)	barley (Feedinamics, 2020)	wheat (Feedinamics, 2020)	maize (Feedinamics, 2020)
Dry matter	855	867	872	869	863
Crude protein	68	85	99	110	76
Crude fibre	101	20	47	24	23
Crude fat	40	12	16	14	36
Crude ash	22	18	22	15	12
Starch	603	537	523	600	638
Sugar	60	31	22	26	17
Lys	4.1	3.4	3.7	3.2	2.3
Met + Cys	0.9 (Met)	3.3	3.9	4.5	3.5
Trp	0.8	0.8	1.2	1.3	0.5
Ca	1.0	0.6	0.7	0.6	0.4
P	1.0	3.0	3.4	3.1	2.5
Na	0.3	0.03	0.1	0.05	0.03
Mg	0.4	1.1	1.1	1.0	1.0
K	8.3	4.5	4.8	3.9	3.1
Cl	0.4	0.6	1.0	0.8	0.5

Table 1 compares the nutrient content of acorns and major feed materials. Acorns are not suitable for fast-growing meat breeds, because of the lower total protein content, with a shortage of sulphur-containing amino acids. When using unshelled acorns in daily diets of pigs, it must be remembered that this feed material has a high raw fibre content, which may reduce daily weight gain and feed intake (Kamphues et al., 2004). The higher fat, starch, and sugar content of acorns and their high abundance in autumn and winter are utilized for production of prime-quality Iberian ham, known as *pata negra*. The dark pure Iberian pig breed is kept in large fenced areas with planted cork oaks (*Quercus suber* L.) or holm oaks (*Quercus ilex* L.). After shedding of acorns, their contribution to the daily diet increases. This period is called *montanera*, and is followed by slaughter at the age of more than 14 months (Ortiz et al., 2020). Thanks to the acorn-rich diet, the pork has a nut flavour, and the fat tissue is rich in omega-3 fatty acids and oleic acid. Simultaneously, when pigs are kept in open pastures, muscles produce much more myoglobin, which results in

their darker, more saturated in red, meat colour as well as significant meat marbling, similar to that of wild pigs. The fallen acorns in autumn and winter are an important component of the daily food intake for the Iberian pigs kept in pasture. In pig farms, it is necessary to provide appropriate amounts of nutrients. Acorns have an optimum calcium to phosphorus ratio. Their potassium content is excessive, in comparison to sodium, but the shortage of sodium can be easily supplemented with NaCl. Mature acorns contain high concentrations of group B vitamins (especially B<sub>6</sub> and B<sub>9</sub>), and no gluten (DLG, 1982).

In recent years, acorns have been gaining interest as potential component in human nutrition, e.g. as nuts (they resemble chestnuts), as flour (due to high starch contents), or as cooking oil (which presents high similarity with olive oil). Currently acorns are still used for coffee substitute production (Pignone and Laghetti, 2010) and quite popular as a flour for humans, especially those with celiac disease or other types of food intolerances. Mixing acorn and wheat flour can have beneficial rheological effects as adding small amounts of acorn flour will increase the volume of the bread and improve the properties of the crumb (Korus et al., 2015). Oil from acorns (oil content of white species of *Quercus* reaches 12%) has good nutritional properties and its taste is similar to olive oil (Özcan, 2007). Charef et al. (2008) also reported that the fatty acid composition of acorn oil from *Q. suber* and *Q. ilex* is similar to that of edible vegetable oils such as those obtained from sunflower, peanut, olive and avocado. Acorns contain aliphatic alcohols (e.g. tetracosanol), which can be used in industry as emulsifiers, emollients and thickeners in food and personal care products (Rabhi et al., 2016). Acorns also contain phenolic compounds (over 60 have been identified so far, e.g. ellagic acid, gallic acid derivatives and several flavonoids) which provide health benefits, which are mainly correlated to their high antioxidant activity. In addition, they play important roles in reducing the risk of cardiovascular and inflammatory diseases, diabetes, cancer, microbial infections, human immunodeficiency virus (HIV) infection, and other diseases (Jiang and Dusting, 2003; Lee et al., 2005; Ullah and Khan, 2008).

Little is known about the problem of acorn contamination with moulds and their secondary metabolites – mycotoxins – and their toxicity to animals that consume large amounts of acorns. The fungus *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald (Ascomycota, order Helotiales) causes acorn mummification, commonly known as black acorn rot (Schröder et al., 1999). Acorns are usually infected with spores of this fungus after shedding but occasionally infection takes place on the tree, from fruit bodies growing on mummified seeds. Kozłowska (1970) found that on dead seeds, also the fungus *Schizophyllum commune* FR develops, which causes brown rot and often spreads to live acorns, causing their death during storage. White rot is due to fungi of the genus *Cylindrocarpon* (Mańka, 1998). Acorns are often also infected with many other fungi, especially during longer storage in the forest litter or soil. Its symptoms include spots of mycelium on the surface of the seed coat or red aggregations of spores, mostly in spring. Before storage, acorns with symptoms of infection can be removed and destroyed, but we do not know the proportion of mouldy acorns eaten by wild animals. During acorn storage, some fungal species from field conditions are later dominated by storage moulds, and the latter are often able to produce

toxins (secondary metabolites). In particular, moulds of the genus *Penicillium* at higher temperatures and humidity are activated on seeds, forming greyish mould. Many fungi of this genus and their metabolites are characterized by high resistance, as they are not affected by high temperature (Przybył, 2006). Little attention has been paid so far to the toxicity of *Penicillium* spp. on acorns. Mould on acorns can be also formed by fungi of the genera *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Trichothecium* or *Mortierella*, especially at low temperatures, excessive moisture, and in weaker seeds. Additionally, it must be remembered that acorns are commonly colonized by other fungi, too, e.g. by *Fusarium* or *Rhizoctonia* spp., which can synthesize toxic metabolites, dangerous for animals (Przybył, 1999). When using acorns as animal feed, it must be remembered that they can contain natural toxins, e.g. phytotoxins and mycotoxins.

Many factors affect fungal development and mycotoxin production. One fungus can produce various mycotoxins and one mycotoxin can be produced by various moulds. Secondary metabolites of moulds have a broad range of mechanisms of activity and toxic effects (from chronic contamination to acute poisoning) and that is why feed materials are often contaminated with several mycotoxins, which is known as multicontamination. Toxicity varies between mycotoxins, and also sensitivity to mycotoxins depends on the time of exposure, dose, species, and phase of physiological development. Plant cells, similarly to moulds, have primary metabolism, which is life-sustaining. However, some plant species and moulds produce a given secondary metabolite in a process during which they produce numerous chemical substances. Many of them are strongly toxic, so they are also used pharmacologically. Major groups of secondary metabolites are e.g. mycotoxins in fungi and tannins in oaks.

In the food chain most of plant toxins are less stable and are subject to additional biotransformation (Dingermann et al., 2012). Their derivatives can be detected in some organs or body fluids (bile or milk). The aim of the presented study was to evaluate the quality of acorns of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) collected in southern Wielkopolska, after storage, in respect of composition and number of colony-forming units of moulds, their cytotoxicity level, and mycotoxin content.

## Material and methods

Acorns were collected in the autumn of 2017 in Czerniejewo Forest District (Poland). The collected acorns were washed with water, subjected to thermotherapy with humid air (41°C, 2h), dried and stored in plastic barrels with a ventilation chimney for 6 months at -3°C. Then, all samples were ground using a Retsch (Haan, Germany) ZM 200 laboratory mill, and stored in plastic bags at -20°C until analysis. On the basis of visual examination they were divided into 2 groups: mould-free (control) and visually infected with moulds (Figure 1). From each group, 15 samples were randomly selected.



Figure 1. Material used in this study: mouldy and visually mould-free acorns

### Mycological examination

Mould-free acorns (control) and mouldy ones were cut into small, about 5-mm pieces with a sterile scalpel under the laminar chamber. Acorn fragments were plated on YGC agar medium composed of yeast extract and glucose with 100 ppm chloramphenicol, pH 6.6. The dishes were incubated at 25°C for 5 days. Initial identification of moulds was carried out on the basis of colony morphology, sporulation type, and microscopic preparations in lactophenol according to Amann (dyes for testing according to PN-R-64791: 1994). Isolated strains were plated on identification agar media (Czapek yeast extract CYA/25°C, CYA/5°C, CYA/37°C, malt extract agar MEA/25°C, creatine agar CREA/25°C, yeast extract agar YES/25°C). After incubation for at least 7 days, the strains were identified using the keys by Fassatiouva (1983), Samson et al. (2010), Samson and Frisvad (2004 a), Pitt (2000), and Pitt and Hocking (1999).

Quantitative and qualitative assessment of filamentous fungi in acorn samples was performed by a culture method (Koch's decimal dilutions method) using the YGC medium: 100 µL were spread on agar medium in 90-mm Petri dishes in triplicate and incubated at 25°C for 5–7 days. The results are expressed as the number of colony-forming units (cfu) per gram of a sample.

### Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity of mould isolates on swine cells was evaluated using assay based on the ability of mitochondrial dehydrogenase to transform a yellow tetrazole soluble in water, namely 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), to insoluble formazan, which is purple. After dissolving the formazan crystals in dimethyl sulfoxide (DMSO), the resultant coloured solution is subjected to spectrometry at a wavelength of 510 nm. The amount of reduced coloured MTT is proportional to the number of metabolically active (live) cells in the population. Cytotoxicity of a given substance is measured as half-maximal inhibitory concentration (IC50), reflecting how much of the substance is needed to reduce cell growth and proliferation to 50%, as compared to control cells (Hanelt et al., 1994).

### Mycotoxicological analysis

Each sample (5 g) was homogenized with 20 ml of a mixture of acetonitrile: water: acetic acid (79:20:1) for 3 minutes. Raw extracts were diluted with the same amount of water, mixed, centrifuged, and injected into the liquid chromatography, tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system. Detection of mycotoxins was carried out using high-performance liquid chromatograph (HPLC) Nexera (Shimadzu, Tokyo, Japan) with a mass detector API 4000 (Sciex, Foster City, USA). Mycotoxins were separated on a chromatographic column Gemini NX-C18 (150×4.6 mm, 3 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The flow rate was 0.75 ml/min and the injection volume was 7 µl. Mobile phases were: A=1 % AcOH in water and B=1 % AcOH in methanol (both phases contained 5 mmol/L ammonium acetate) with the following gradient: 10% B up to 2.0 min, 97% B from 2.0 to 14.0 min, 97% B up to 16.0 min, then 10% B. Sample preparation and HPLC analysis of mycotoxins were performed by the technique described by Viegas et al. (2019).

## Results

### Mycological examination

The total number of fungi (cfu/g) was estimated at  $1.0 \times 10^4$  and  $2.6 \times 10^6$  in mould-free and mouldy acorns, respectively. The acorn samples were dominated by moulds of the genus *Penicillium* (97%). Table 2 presents the results of mycological analysis of randomly selected acorns on YGC medium. The most frequently isolated fungi from acorns were: *Penicillium paneum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Alternaria alternata*, and *Fusarium solani*.

Table 2. The main moulds of the genus *Penicillium* presented in contaminated acorns

Sample no.	Moulds
1	<i>Penicillium paneum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
2	<i>Penicillium crustosum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
3	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
4	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
5	<i>Penicillium crustosum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
6	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Trichoderma</i> sp.
7	<i>Penicillium paneum</i>
8	<i>Penicillium paneum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
9	<i>Penicillium paneum</i>
10	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor circinelloides</i>
11	<i>Penicillium paneum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
12	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
13	<i>Penicillium crustosum</i> , <i>Mucor hiemalis</i>
14	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Alternaria alternata</i>
15	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Trichoderma</i> sp.

### Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity of the most frequently isolated 3 mould species (*Penicillium* spp.) was evaluated using MTT assay with swine kidney cells (Figure 2), sensitive to a broad range of toxins. The control was Czapek medium. The MTT assay showed that the most cytotoxic species was *Penicillium expansum* (IC<sub>50</sub> 0.061 cm<sup>2</sup>/ml), followed by *P. crustosum* (IC<sub>50</sub> 7.813 cm<sup>2</sup>/ml), and *P. paneum* (IC<sub>50</sub> 7.813 cm<sup>2</sup>/ml).

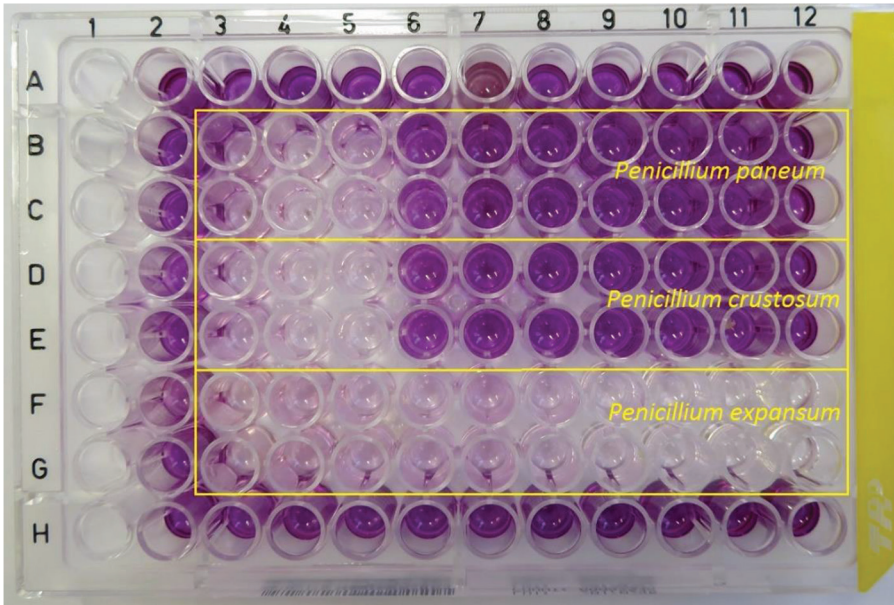


Figure 2. MTT plate for the most frequent fungal species found in mouldy acorns

### Mycotoxicological analysis

Among the determined mycotoxins, mycophenolic acid and patulin were present at the highest concentrations (Table 3). In mouldy acorns, the mycophenolic acid was detected at 14580 µg/kg and patulin at 50 µg/kg. In this sample, zearalenone, monoacetoxyscirpenol, diacetoxyscirpenol, T2 toxin, and ochratoxin A were detected at low levels. In the visually mould-free sample, mycophenolic acid was detected at 85.4 µg/kg. Many toxins were not found in any of the analysed acorn samples: AFM1, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, 3-ADON, HT-2, DON-3-G, FUSX, α-ZAL, β-ZAL, α-ZOL, β-ZOL, T2 tetraol, T2 triol, NEO, 15-ADON, NIV, DOM-1, FB1, FB2, FB3, ROQ C, GRIS, OTB, MEV (abbreviations explained in Table 3).

Table 3. Results of mycotoxin detection, with limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ)

Mycotoxins	Mould-free acorns ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Mouldy acorns ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON)	nd	nd	0.8	2.7
3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)	nd	nd	0.8	2.7
Aflatoxin B1 (AFB1)	nd	nd	0.1	0.2
Aflatoxin B2 (AFB2)	nd	nd	0.1	0.2
Aflatoxin G1 (AFG1)	nd	nd	0.1	0.1
Aflatoxin G2 (AFG2)	nd	nd	0.1	0.4
Aflatoxin M1 (AFM1)	nd	nd	0.1	0.2
Deepoxydeoxynivalenol (DOM-1)	nd	nd	4.2	14.0
Deoxynivalenol (DON)	nd	nd	2.7	9.0
Deoxynivalenol-3-glucoside (DON-3-G)	nd	nd	5.4	18.0
Diacetoxyscirpenol (DAS)	nd	< LOQ	0.3	1.0
Fumonisin B1 (FB1)	nd	nd	0.5	1.7
Fumonisin B2 (FB2)	nd	nd	0.4	1.2
Fumonisin B3 (FB3)	nd	nd	0.5	1.5
Fusarenon-X (FUSX)	nd	nd	4.8	16.0
Griseofulvin (GRIS)	nd	nd	0.1	0.3
HT-2 Toxin (HT2)	nd	nd	0.3	0.9
Mevinolin (MEV)	nd	nd	0.1	0.3
Monoacetoxyscirpenol (MAS)	nd	1.3	0.1	0.4
Mycophenolic acid (MPA)	85.4	14580	0.2	0.7
Neosolaniol (NEO)	nd	nd	0.1	0.3
Nivalenol (NIV)	nd	nd	4.5	15.0
Ochratoxin A (OTA)	nd	0.22	0.1	0.2
Ochratoxin B (OTB)	nd	nd	0.1	0.3
Patulin (PAT)	nd	50.0	1.1	3.5
Roquefortine C (ROQ C)	nd	nd	0.2	0.7
T-2 Toxin (T2)	nd	0.7	0.1	0.4
T-2 Tetraol (T2 tetraol)	nd	nd	5.4	18.0
T-2 Triol (T2 triol)	nd	nd	0.3	1.1
Zearalanone (ZAN)	nd	nd	0.5	1.5
Zearalenone (ZEN)	nd	4.9	0.2	0.6
$\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL)	nd	nd	2.0	6.6
$\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZOL)	nd	nd	1.0	3.4
$\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL)	nd	nd	1.0	3.1
$\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZOL)	nd	nd	1.4	4.8

nd – not detected.

## Discussion

Toxic properties of acorns have been studied for decades (Clarke and Cotchin, 1956) but little attention has been paid to metabolites of pathogenic moulds. The cytotoxicity of moulds colonizing acorns during storage was not assessed before. The major problems usually include a lack of suitable internal standards and absent or fragmentary optimization and validation of methods. Currently, analytical techniques based on spectroscopic methods, with measurements of the ratio of mass to the electric charge of the given ion, through mass spectrum imaging, make it possible to identify secondary metabolites (mycotoxins and their derivatives) in the analysed matrix. Progressing knowledge of mycotoxin toxicity improves the methods enabling complex identification of these compounds. For example, liquid chromatography-tandem mass spectrometry ensures a high level of selectivity, low detection limit, and simultaneous identification of several dozen toxins within one analysis. In this study, LC-MS/MS allowed us to assess the exposure of livestock and wild animals to mycotoxins contained in mould-free vs. mouldy acorns. There are no published reports on the toxin-forming potential of moulds colonizing acorns. Mycotoxin levels are monitored in human food and feed in many countries, but the monitoring does not include a broad range of controlled mycotoxins. In Poland, to control feed quality and safety in the food chain, an Official Feed Control Plan has been introduced, but it includes only the main 8 of about 300 known mycotoxins. Because of their high toxicity, for these compounds the European Commission set maximum levels, guidance values or indicative levels (EC, 2006, 2013; EP, 2002). Scientific literature more and more often emphasizes that for some feed materials the results of mycotoxin assays can be underestimated. This may apply also to acorns, as mycotoxins in them are biotransformed to toxic metabolites under the influence of bacteria, fungi, and plant substances. This happens if acorns lie in a wet substrate for a long time. Rychlik et al. (2014) proposed the term *modified mycotoxins*, which includes modified forms of mycotoxins, and some of them are identified thanks to new instrumental methods. However, the toxicity of modified mycotoxins is poorly studied and their assays are limited due to a lack of analytical standards. There is also a shortage of certified reference materials, necessary for assessment of the parameters of analytical methods. In 2014, the European Food Safety Authority (EFSA) published a scientific opinion concerning the presence of modified mycotoxins in food and feed, which recommended further research in this field (EFSA, 2014). Our research team, studying the broadest possible spectrum of toxins in acorns, used the available standards. Mouldy acorns were strongly contaminated with mycophenolic acid and patulin, which are secondary metabolites of *Penicillium* spp. We also detected small or trace amounts of monoacetoxyscirpenol, ochratoxin A, T-2 toxin, and zearalenone. Visually mould-free acorns contained only mycophenolic acid, at much lower concentrations.

A review of the available scientific literature indicates that mycophenolic acid is a fungal secondary metabolite and is produced by many *Penicillium* spp., its derivatives are commercially used as frontline immunosuppressive agents to prevent rejection of transplant organs. Mycophenolic acid is characterized by low toxicity



in ruminants. Mohr et al. (2007) did not report any adverse effect of this toxin on animal health and biochemical blood parameters of sheep treated with 300 mg of mycophenolic acid (5.4 mg/kg) daily for 44 days. According to Schneweis et al. (2000), mycophenolic acid is produced not only by *P. roquefortii* but also by *P. brevidocompactum* and *P. stoliniferum*. Under aerobic conditions, these mould species intensively produce this metabolite, especially in grass and maize silage. The cited authors reported that in their research, mycophenolic acid did not show neurotoxic, hepatotoxic, and nephrotoxic effects. They observed some symptoms of lower resistance of the organism, so it is necessary to monitor the animals that consume large amounts of this toxin in silage. Puel et al. (2005) found that a fungal species, *Byssoschlamys nivea*, can also produce mycophenolic acid, and its consumption by domesticated animals may substantially increase their susceptibility to infectious diseases. Sievers et al. (1997) noted that selective immunosuppressive activity of this acid is known, as it limits purine metabolism. Effects of mycophenolic acid in sheep were also presented by Džidić et al. (2004), but they found that its toxicity is low. Nevertheless, in silage it can accumulate, so it can be associated with increased infections in animals (Baum et al., 2005).

A new and undoubtedly interesting problem concerning mycotoxicological evaluation of acorns is the high level of patulin in mouldy acorns. Patulin is produced mainly by *Penicillium* and *Aspergillus* spp., but the most important among them is *P. expansum* (Weidenbörner, 2000). This toxin is most often detected in apples, apple juices, and processed products containing them. Patulin is less frequently found in other fruits, such as grapes or pears. Long-term exposure to patulin is accompanied with genotoxicity, cytotoxicity, immunotoxicity, neurotoxicity, and severe damage to mammalian organs, especially kidney and liver (Zhong et al., 2018). The permissible maximum content of this mycotoxin in juices and fruit nectars is 50 µg/kg, while in apple products (apple compote, apple puree) intended for direct consumption, it must not exceed 25 µg/kg (Commission Regulation (EC) No. 1425/2003).

Patulin was first isolated in 1941 from *P. griseofulvum*, when searching for new antibiotics. It showed antifungal and antibacterial activity (particularly against *Mycobacterium tuberculosis*). However, it is cytotoxic (Weidenbörner, 2000). Blood (1998) signalized that swine are the most sensitive to patulin. It was assumed that patulin toxicity to livestock is low, as it is produced mostly on apples and thus can be transmitted to food products, but if consumed by pigs, it can affect the nervous system by a cellular mechanism. Its symptoms include vomiting, salivation, poor appetite, but sometimes also leucocytosis and erythropenia. In ruminants, it may cause problems with fibre digestibility and lower production of volatile fatty acids as well as synthesis of microbiological proteins.

In mouldy acorns, we detected also trace amounts of ochratoxin A, which – like patulin – is produced by storage moulds: *Aspergillus* and *Penicillium* spp. We also found low concentrations of *Fusarium* metabolites: T-2 toxin, zearalenone, and monoacetoxyscirpenol, which are type A and B trichothecenes, showing a broad spectrum of activity and toxic effects: from chronic contamination to acute poisoning. They influence animals primarily through the digestive system, as cytotoxic compounds. This group of mycotoxins can bind glucose and form a masked mycotoxin.

On average, mouldy acorns contained  $2.6 \times 10^6$  cfu/g. Out of the 15 analysed samples of this material, 100% were contaminated with *Penicillium*, 12 samples with *Mucor*, 2 with *Trichoderma*, 1 with *Alternaria*, and 1 with *Fusarium*. Among *Penicillium* spp., 5 samples contained *P. paneum* (which can produce 1-octen-3-ol and penipanoid A), another 5 samples contained *P. expansum* (which produces patulin), while in 3 samples, *P. crustosum* was present (which produces neurotoxic toxin penitrem A), and in 2 samples, *P. aurantiogriseum* (forming penicillic acid). Those secondary metabolites are toxic, often cytotoxic. In most samples, we found also moulds *Mucor hiemalis* or *Mucor circinelloides*, which produce toxins (e.g. 3-nitropropionic acid). Those species of the order Mucorales, with *Rhizopus* and *Absidia*, can cause mucormycoses, i.e. fungal diseases of humans and animals (Weidenbörner, 2000).

In mouldy acorns, toxic effects of their secondary metabolites can be combined. The resultant mycotoxins can act synergistically, and the potential combined effects of such mixtures on animal health are poorly studied. Major interactions between toxins are: additivity, synergism, and antagonism (Grenier and Oswald, 2011). It is extremely difficult to interpret research results concerning the overall toxicity of groups of mycotoxins, especially of long-term exposure to low doses of mycotoxins. That is why, apart from instrumental analyses, various cell types are used for cytotoxicity tests, or various model animals, characterized by variation between individuals (Smith et al., 2016). In research on mycotoxins and assessment of their toxicity, it is very important to select suitable methods of qualitative and quantitative analysis. However, the use of chromatographic techniques with diode array detector (DAD) detector or fluorescence detector (FLD) or LC-MS/MS, depending on the matrix, sometimes is not sufficiently effective. That is why cytotoxicity of isolated fungi is assessed. The analysed acorns were dominated by pathogenic moulds of the genus *Penicillium*. MTT assay was performed for 3 dominant species. For swine kidney cells, the most cytotoxic species was *P. expansum* ( $IC_{50}$  0.061 cm<sup>2</sup>/ml). Such a high toxicity can be correlated with its ability to produce secondary metabolites, such as patulin, citrinin, roquefortine C. The fungus causes blue mould, which is economically the most important disease of harvested fruits and vegetables in cold stores (Weidenbörner, 2000). The other 2 assessed species were characterized by low cytotoxicity. However, Chitarra et al. (2004) noted that *P. paneum* often contaminates cereal grain and can produce mycotoxins roquefortine C and patulin, which are toxic to animals and people. Our study shows that on acorns of pedunculate oak during storage some moulds develop and synthesize specific mycotoxins. Because of the common occurrence of unmodified and modified metabolites of moulds, the European Commission is currently developing amendments to existing legislation concerning mycotoxin limits in feeds for various animal species. Our data on fungal toxicity and coexistence of toxins in acorns can help in correct and precise analysis of human and animal exposure to mycotoxins. The presence of moulds and mycotoxins in food and feeds is a health risk to humans and animals. They can cause acute poisoning (relatively rare) or chronic poisoning, due to long-term consumption of low doses of the toxins. Pathogenic moulds, as a result of infection from the environment, are responsible for systemic fungal infections. Mycotoxin levels are monitored in many countries but the studies do not cover a broad range of toxins.

## Conclusions

In this study, mycotoxin levels in acorns infected with moulds and in those showing no visual symptoms of infection were determined. Visually mould-free acorns contained only mycophenolic acid in a slight amount (85.4 µg/kg). In contrast, mouldy acorns contained a high level of mycophenolic acid (14580 µg/kg), patulin (50 µg/kg) and zearalenone (4.9 µg/kg). Additionally, trace amounts of monoacetoxyscirpenol, ochratoxin A, and T-2 toxin were detected. Among the detected toxins, especially patulin is subject to strict regulations as regards its toxicity as well as the teratogenic and carcinogenic effect. We did not detect any mycotoxins that potentially pose a serious threat to consumers of food products originated from animals fed with acorns, e.g. aflatoxin B1, while ochratoxin A was detected but at a very low level. In visually mould-free acorns, the average number of fungi (cfu/g) was about  $1 \times 10^4$ , compared to  $2.6 \times 10^6$  in mouldy ones. The dominant mould species were: *Penicillium expansum*, *P. paneum*, *P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *Mucor hiemalis*, and *M. circinelloides*.

The popularity of acorn products as a “super food” for humans and as a special feed additive for pigs improving meat quality, is growing nowadays. Our results confirmed that it is justified to discuss the possibility of acorn contamination with moulds and mycotoxins, as this feed material is commonly stored several months, from autumn till spring. The possibility of co-occurrence of several mycotoxins must be taken into account as in livestock and people consuming acorns they can cause chronic exposure.

## References

- Baum B., Mohr A., Pfaffl M., Bauer J., Hewicker-Trautwein M. (2005). Morphological findings in lymphatic tissues of sheep following oral application of the immunosuppressive mycotoxin mycophenolic acid. *Mycopathologia*, 160: 167–175.
- Blod D. (1998). Poradnik lekarza weterynarii (Pocket companion to veterinary medicine) (in Polish). PZWL, 1st ed. Warszawa, Poland.
- Charef M., Mohamed Y., Saidi M., Stocker P. (2008). Determination of the fatty acid composition of acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* seeds growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85: 921–924.
- Chitarra G.S., Abee T., Rombouts F.M., Posthumus M.A., Dijksterhuis J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2823–2829.
- Clarke E.G.C., Cotchin E. (1956). A note on the toxicity of the acorn. *Brit. Vet. J.*, 112: 135–139.
- Commission Regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union*, L203: 1–3.
- Dingermann T., Kreis W., Rimpler H., Zündorf I. (2012). *Biologia Farmaceutyczna*, Reinhard E. (ed.) (in Polish). MedPharm, Wrocław, Poland.
- DLG-Futterwerttabellen für Wiederkäuer (1982). 5. erweit. u. neu gestalt Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.
- Džidić A., Mohr A., Meyer K., Bauer J., Meyer H.H.D., Pfaffl M.W. (2004). Effects of mycophenolic acid (MPA) treatment on expression of Fc receptor (FcRn) and polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) mRNA in adult sheep tissues. *Croat. Med. J.*, 45: 130–135.
- European Commission (EC) (2006). Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union*, L229: 7–9.

- European Commission (EC) (2013). Commission Recommendation 2013/165/EC of 27 March on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. Off. J. Eur. Union., L91: 12–15.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2014). Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. EFSA J., 12: 3916.
- European Parliament (EP) and the Council of the EU (2002). Directive of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. Off. J. Eur. Communities, L0032: 1–15.
- Fassatiová O. (1983). Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej (in Polish). Wyd. Nauk. Techn., Warszawa, Poland, 255 pp.
- Feedinamics (2020). INRAE-CIRAD-AFZ Feed tables. Available online: <https://www.feedtables.com/content/feeds> (accessed on 1.12.2020).
- Frisvald J.C., Samson R.A. (1991). Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. In: Handbook of applied mycology, Arora D.K., Mukerji K.G., Marth E.H. (eds). Vol. 3. Foods and feeds. Marcel Dekker, New York, pp. 31–68.
- Grenier B., Oswald I. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. World Mycotoxin J., 4: 285–313.
- Hanelt M., Gareis M., Kollarczik B. (1994). Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. Mycopathologia, 128: 167–174.
- Jiang F., Dusting G.J. (2003). Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutic: potential role of their antiinflammatory effects. Curr Vasc Pharmacol, 1: 135–56.
- Kamphues J., Coenen M., Kienzle E., Pallauf J., Simon O., Zentek J. (2004). Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. Verlag M.&H. Schaper Alfeld-Hannover, Germany.
- Korus J., Witczak M., Ziobro R., Juszczyk L. (2015). The influence of acorn flour on rheological properties of gluten free dough and physical characteristics of the bread. Eur. Food Res. Technol., 6: 1135–1143.
- Kozłowska C. (1970). Investigations on fungi occurring on oak and birch fruits and on pine and larch seeds (in Polish). Pr. Inst. Bad. Leś., 386: 1–120.
- Krahl-Urban J. (1959). Die Eichen. Forstliche Monographie der Traubeneiche und der Stieleiche. Paul Parey Hamburg/ Berlin, Germany.
- Lee K.W., Hur H.J., Lee H.J., Lee C.Y. (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. J. Agric. Food Chem., 53: 1990–1995.
- Mańka K. (1998). Fitopatologia Leśna (in Polish). PWRiL, 5th ed., Warszawa, Poland.
- Mohr A.I., Lorenz I., Baum B., Hewicker-Trautwein M., Pfaffl M.W., Džidić A., Meyer H.H.D., Bauer J., Meyer K. (2007). Influence of oral application of mycophenolic acid on the clinical health status of sheep. J. Vet. Med. A., 54: 76–81.
- Ortiz A., Carrillo N., Elghannam A., Escribano M., Gaspar P. (2020). Views of farmers and industrial entrepreneurs on the Iberian pig quality standard: an in-depth interview research study. Animals (Basel), 10: 1772.
- Özcan T. (2007). Characterization of Turkish *Quercus* L. taxa based on fatty acid compositions of the acorns. J. Am. Oil Chem. Soc., 84: 653–662.
- Pignone D., Laghetti G. (2010). On sweet acorn (*Quercus* spp.) cake tradition in Italian cultural and ethnic islands. Genet. Resour. Crop Evol., 57: 1261–1266.
- Pitt J.I. (2000). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Food Sci. Aus., 197 pp.
- Pitt J.I., Hocking A.D. (1999). Fungi and Food Spoilage. Gaithersburg: Aspen Publication, 2nd ed., 593 pp.
- Przybył K. (1999). Diseased changes in roots dead and showing decay. Zesz. Nauk. AR, Kraków, 348: 143–152.
- Przybył K. (2006). More important infectious diseases. In: Dęby, Bugala W. (ed.). PAN, Kurnik, Poland, pp. 742–772.
- Puel O., Tadriss S., Galtier P., Oswald I.P., Delaforge M. (2005). *Byssochlamys nivea* as a source of mycophenolic acid. Appl. Environ. Microbiol., 71: 550–553.
- Rabhi F., Narváez-Rivas M., Tlili N., Boukhchina S., León-Camacho M. (2016). Sterol, aliphatic alcohol and tocopherol contents of *Quercus ilex* and *Quercus suber* from different regions. Ind. Crop. Prod., 83: 781–786.

- Rakić S., Povrenović D., Tešević V., Simić M., Maletića R. (2006). Oak acorn, polyphenols and antioxidant activity in functional food. *J. Food Eng.*, 74: 416–423.
- Rychlik M., Humpf H.U., Marko D., Dänicke S., Mally A., Berthiller F., Klaffke H., Lorenz N. (2014). Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Res.*, 30: 197–205.
- Samson R.A., Frisvald J.C. (2004). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Stud. Mycol.*, 49: 1–260.
- Samson R.A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J.C., Andersen B. (2010). Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2nd ed., 390 pp.
- Schneweis I., Meyer K., Hormansdorfer S., Bauer J. (2000). Mycophenolic acid in silage. *App. Environ. Microbiol.*, 66: 3639–3641.
- Schröder T., van Hörsten D., Kehr R. (1999). Thermotherapie von Traubeneicheln mit Mikrowellenenergie. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 365: 23–38.
- Sievers T.M., Rossi S.J., Ghobrial R.M., Arriola E., Nishimura P., Kawano M.K., Holt C.D. (1997). Mycophenolate Mofetil. *Pharmacotherapy*, 17: 1178–1197.
- Smith M.C., Madec S., Coton E., Hymery N. (2016). Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects. *Toxins (Basel)*, 8: 94.
- Ullah M.F., Khan M.W. (2008). Food as medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 9: 187–196.
- Viegas C., Faria T., Aranha Caetano L., Carolino E., Quintal-Gomes A., Twaruzek M., Kosicki R., Viegas S. (2019). Characterization of occupational exposure to fungal burden in Portuguese bakeries. *Microorganisms*, 7: 234.
- Weidenbörner M. (2000). *Lexikon der Lebensmittelmykologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Zhong L., Carere J., Lu Z., Lu F., Zhou T. (2018). Patulin in apples and apple-based food products: the burdens and the mitigation strategies. *Toxins*, 10: 475.

Received: 25 IX 2020

Accepted: 9 III 2021

Article

# Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption

Jan Grajewski , Robert Kosicki, Magdalena Twarużek  and Anna Błajet-Kosicka \*

Department of Physiology and Toxicology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Natural Sciences, Kazimierz Wielki University, Chodkiewicza 30, PL85064 Bydgoszcz, Poland; jangra@ukw.edu.pl (J.G.); robkos@ukw.edu.pl (R.K.); twarmag@ukw.edu.pl (M.T.)

\* Correspondence: abla@ukw.edu.pl

Received: 16 April 2019; Accepted: 2 May 2019; Published: 7 May 2019



**Abstract:** Poland is one of Europe's leading producers and exporters of beer. The study, herein, describes the measurement of ochratoxin A, deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and zearalenone levels in 69 Polish beers. Analytical methodologies based on high performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) and fluorescence detection were developed, validated, and used to perform the above determinations. The most prevalent mycotoxins were deoxynivalenol (96%), ochratoxin A (93%), and HT-2 toxin (74%), respectively. Three quarters of the samples contained at least three analytes. The mean ochratoxin A concentration was 0.057 (SD 0.065) ng/mL, and in four beer samples its level exceeded 0.2 ng/mL, a value postulated in the literature to be the maximum limit. Deoxynivalenol was found at a maximum level of 56.2 ng/mL, and its mean concentration was 17.1 (SD 9.0) ng/mL. An evaluation of the estimated daily intake (EDI) of mycotoxins from beer in different European populations was made using food-consumption data prepared by WHO. Based on the mean ochratoxin A concentration in beers, the EDI represented 0.8–1.1% of the tolerable daily intake (TDI), while in a worst-case scenario (maximum concentration) it reached 5.0–7.5% of TDI. For deoxynivalenol, the EDI was in the range of 4.1–6.0% of TDI, whereas, based on maximum values, it reached the level of 14–21% of TDI. There were no significant differences between “scenarios” in the HT-2 case (mean—5.0–7.5% of TDI; maximum—6.5–9.7% of TDI) due to the fact that its concentration was near the limit of quantification (LOQ) value taken for calculation. The significance of these results are discussed, herein.

**Keywords:** beer; mycotoxins; ochratoxin A; deoxynivalenol; HT-2 toxin; occurrence; risk assessment

**Key Contribution:** The study focuses on the co-occurrence of 7 mycotoxins in Polish beer, as well as the evaluation of their intake, taking into account a significant role of Poland in beer production and exportation.

## 1. Introduction

Beer is one of the most popular alcoholic beverages in the world, and it is consumed in large amounts in almost every country. It originates from prehistoric ages. Beer-like beverages were known in China, as long as 70 centuries before the current era. One of the beer precursor could be “braga” or “bosa”, relatively low alcoholic drinks, which were made over a large area of Europe, stretching from Poland to the Balkans [1]. Whatever its origins, the popularity of beer continues; it is one of the most consumed beverage in the world. Hence beer plays an important role in the human diet, and any foodstuff consumed in such large quantities is a potential path for ingestion of harmful substances.

Mycotoxins are a group of around 500 toxic secondary metabolites produced mainly by the fungi of the *Claviceps*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Aspergillus* genera. These fungi grow on a

variety of foodstuffs of both animal and plant origin. Maximum permitted levels of mycotoxins in food products are regulated by the EU [2–7] and other regional agencies. However, beer is one of a number of foodstuffs where maximum permitted levels of mycotoxins have yet to be firmly established. Poland is currently the third-ranking beer producer in Europe (Table 1) and so was the focus of this study. In 2016, Germany had the highest consumption of beer in Europe with 85.5 million hectoliters of beer consumed (104 L per person), followed by the United Kingdom with 43.7 million hectoliters (67 L per person), Spain with 38.6 million hectoliters (46 L per person), Poland with 37.9 million hectoliters (98 L per person), and France with 21.3 million hectoliters (33 L per person). The Czech Republic had the highest per capita consumption of beer in Europe, with 143 L of beer consumed, followed by Germany and Austria, with 103 L per person [8].

**Table 1.** Top beer producing countries in Europe [8].

Country	Beer Production (10 <sup>5</sup> L)				
	2012	2013	2014	2015	2016
Germany	94.6	94.4	95.3	95.6	95.0
United Kingdom	44.2	44.2	44.3	44.0	43.7
Poland	39.3	40.0	40.1	40.9	41.4
Spain	33.0	32.7	33.6	35.0	36.5
The Netherlands	24.3	23.6	23.7	24.0	24.6
France	17.6	18.3	19.9	20.3	20.7
Belgium	18.8	18.1	18.2	19.8	20.7
Czech Republic	18.7	18.7	19.1	19.5	20.5
Romania	18.0	16.1	14.8	16.0	15.8

The possibility of mycotoxins finding their way into beer was always considered likely; species of *Fusarium*, as well as *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* grow in poorly stored grain, and also contaminate growing cereal plants [9]. The latter two fungi produce ochratoxin A (OTA), which is nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic, and a possible neurotoxin. OTA is also suspected to be the cause of chronic diseases including, Balkan Endemic Nephropathy (BEN); Chronic Interstitial Nephropathy (in North Africa); and urinary tract tumors in humans. OTA was classified by The International Agency for Research on Cancer as a possible human carcinogen (group 2B) [10]. The possibility of OTA getting into beer from contaminated grains used in brewing has been pointed out in literature. On the other hand, it is considered that OTA can persist the fermentation processes, but normally it can be reduced (up to 89%) during the malting process used in beer production [11]. Other mycotoxins likely to be found in beer are the trichothecenes (mainly deoxynivalenol (DON)), and zearalenone (ZEN) produced by the *Fusarium* species. Levels of DON might decrease or increase, depending on the process stage and the parameters of beer production [12,13]. The main source of mycotoxins in beer seems to derive from contaminated barley and malt feedstocks. The presence of OTA and *Fusarium* toxins in raw materials intended for malting and brewing, has previously been examined worldwide [14–16]. Similarly, beer contamination with mycotoxins has been the subject of numerous studies. OTA levels in beer might vary from pg/mL [17,18] to µg/mL in traditional African beers [19]. *Fusarium* derived mycotoxins do not usually exceed a value of several dozen ng/mL [12,20–22]. Higher values for mycotoxins have been recorded for craft beer samples, where processing is less controlled [23].

The objective of this study was to determine ochratoxin A, as well as trichothecenes group B (deoxynivalenol and nivalenol) and group A (T-2 toxin, HT-2 toxin, and diacetoxyscirpenol), and zearalenone, in beer produced by the main Polish breweries, and to evaluate the exposure of European populations to those compounds, considering the high position of Poland in the beer export, and taking into account the European consumption data. For this purpose, two analytical methods based on HPLC were validated.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Method Validation

Six-point calibration curves were constructed, based on standard solutions, with the concentration ranges of: DON: 12.5–503 ng/mL; NIV: 13.1–525 ng/mL; T2: 4.7–188 ng/mL; HT-2: 4.7–188 ng/mL; DAS: 3.6–145 ng/mL; and ZEN: 1.3–55.6 ng/mL, containing fixed amounts of internal standards ((ISs); except for the OTA) analysis. The correlation coefficients ( $r$ ) of all analytes determined by the sum of least squares regression analyses, were higher than 0.995. To evaluate the experimental accuracy and precision, recovery experiments were carried out, using a blank lager beer (a sample with the concentration of the mycotoxins of interest lower than the detection limits) as a representative sample matrix. The recovery was calculated using the blank beer samples spiked with seven mycotoxins, at three different levels, with triplicate analyses conducted for each level. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were fixed at the mean concentration, at which the signal to noise ratio (S/N) equaled 3 and 10, respectively. For quality control, both a blank sample and positive samples ( $n = 3$ , ~every 20 samples) were applied in control spiking experiments, giving the recovery rate >70%. Validation data are summarized in Table 2.

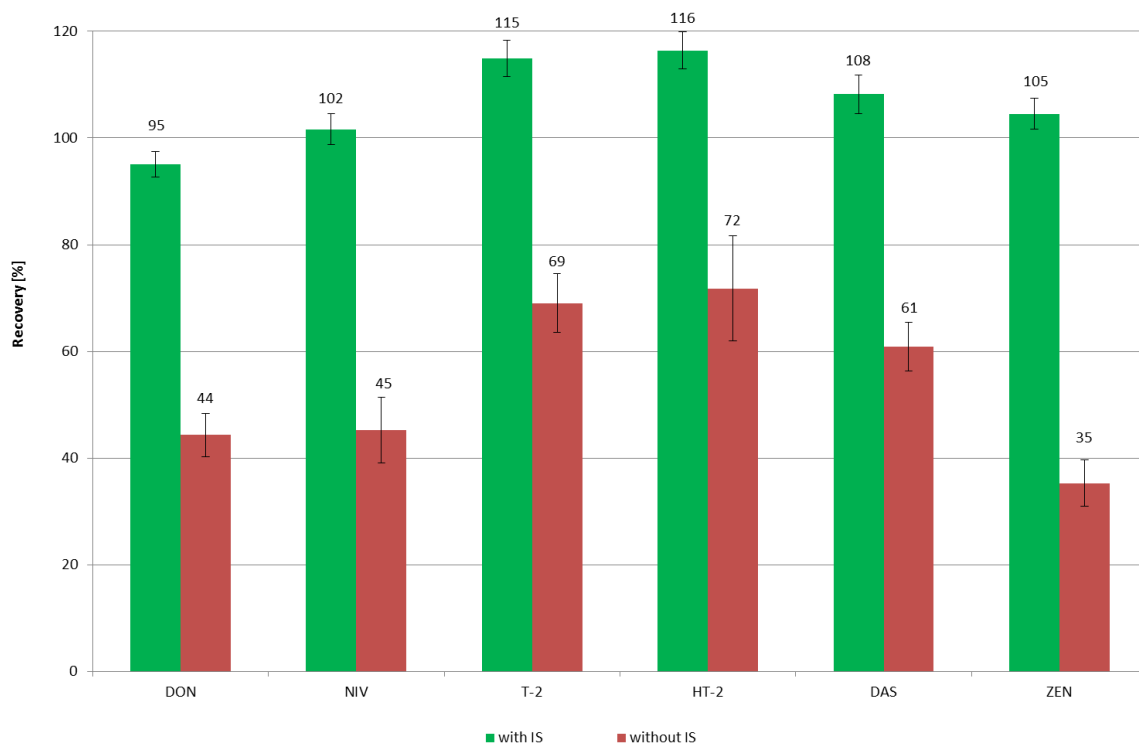
**Table 2.** Validation data of mycotoxins from artificially contaminated beer samples.

Mycotoxin	Spiking Level [ng/mL]	Calculated Concentration [ng/mL]	Recovery [%]	Precision [%]	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
OTA	0.05	0.0408	81.6	2.5	0.003	0.011
	0.25	0.199	79.6	6.1		
	1.0	0.858	85.8	4.2		
DON	40	38.16	95.4	2.9	3.50	11.6
	200	190.6	95.3	1.2		
	400	378.2	94.5	3.9		
NIV	40	40.84	102.1	5.2	4.30	14.3
	200	202.2	101.1	1.7		
	400	407.2	101.8	1.3		
T-2	8	9.36	117.0	3.9	0.31	1.03
	40	44.64	111.6	3.0		
	80	92.8	116.0	1.3		
HT-2	8	9.10	113.8	5.2	0.36	1.21
	40	47.64	119.1	3.0		
	80	93.04	116.3	1.2		
DAS	8	8.72	109.0	4.0	0.28	0.92
	40	43.92	109.8	2.6		
	80	84.64	105.8	4.1		
ZEN	4	4.14	103.5	3.4	0.07	0.23
	20	20.74	103.7	2.5		
	40	42.56	106.4	3.0		

For *Fusarium* mycotoxins, determined by the HPLC-MS/MS technique, the recovery experiments were performed both with and without the internal standards. The results showed significant differences in recovery values (Figure 1), so that only the samples with the added ISs, met the performance criteria for the analytical methods, laid down by the UE, for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs [24,25]. The recovery levels, therein, were given as follows: OTA 50–120%; DON 60–110%, T-2 60–130%, HT-2 60–130%, and ZEN 60–120%. The significant differences in the recovery values, with and without ISs, confirmed the complexity of the beer matrix, resulting in significant matrix effects, especially when the applied sample clean-up procedure was not of high selectivity. The acetonitrile-based extraction caused a precipitation of polar matrix components and might also have resulted in precipitation of polar analytes, and thus decreased the recovery.



Low recovery values observed in the case of ZEN, might be attributed to strong suppression caused by the co-eluting non-polar matrix [26].



**Figure 1.** Impact of addition of internal standard (IS) on mycotoxin recovery rates.

## 2.2. Mycotoxins Occurrence

The results of the analyses of 69 beer samples are summarized in Table 3. OTA was detected in 93% of the samples and 78% of them contained OTA at a concentration higher than the LOQ—with the highest value at 0.347 ng/mL. In 4 beer samples (1 lager, 1 unpasteurized, and 2 porters), OTA concentrations were higher than 0.2 ng/mL; the proposed maximum acceptable level for this toxin [11].

**Table 3.** Concentration of ochratoxin A (OTA) and *Fusarium* mycotoxins in the analyzed beer samples.

Toxin	Positive/Samples	Mean [ng/mL]	Median [ng/mL]	Positive Samples [ng/mL]		
				Min	Max	Mean; SD
OTA	64/69	0.053	0.032	<LOQ	0.347	0.057; 0.065
DON	66/69	16.3	<LOQ	<LOQ	56.2	17.1; 9.0
NIV	1/69	<LOD	<LOD	-	<LOQ	-
T-2	11/69	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
HT-2	51/69	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.57	1.23; 0.08
DAS	0/69	-	-	-	<LOD	-
ZEN	4/69	<LOD	<LOD	<LOQ	0.413	0.304; 0.073

The mean and median OTA concentrations were in the range of tens of pg/mL; these and the contamination rates are in accordance with previous European results [17,18,27–29]. In some traditional beers coming from Africa, however, the level of OTA might have exceeded values of 2 µg/mL [19]. DAS was not detected in any of the samples, but at least one of the *Fusarium* mycotoxins was present in 97% of samples. NIV was detected only in one sample (<LOQ), four of the samples contained ZEN (3 samples below LOQ value and 0.413 ng/mL) and the levels of T-2 and HT-2 were close to the LOQs. The mean and highest concentration of DON (detected in 96% of the samples and in 45% at the level

>LOQ) were 17.1 ng/mL and 56.2 ng/mL, respectively. OTA, DON, and HT-2 were the only compounds detected in more than 75% of the samples. The results sorted by beer type are presented in Table 4.

**Table 4.** Occurrence of OTA, DON, and HT-2 in different beer type samples.

	Beer Type	Positive/Samples	Mean [ng/mL]	Median [ng/mL]	Positive Samples [ng/mL]		
					Min	Max	Mean
OTA	Normal lager	23/23	0.051	0.034	<LOQ	0.347	0.051
	Strong lager	19/19	0.062	0.056	0.012	0.114	0.062
	Porter	5/5	0.111	0.068	<LOQ	0.262	0.112
	Unpasteurized	8/9	0.059	0.023	<LOQ	0.269	0.066
	Flavored	5/8	0.017	0.014	<LOQ	0.046	0.027
	Non-alcoholic	4/5	0.013	<LOQ	<LOQ	0.030	0.016
DON	Normal lager	22/23	17.9	<LOQ	<LOQ	56.2	18.7
	Strong lager	19/19	19.2	18.8	<LOQ	34.7	19.2
	Porter	4/5	16.5	<LOQ	<LOQ	33.8	20.7
	Unpasteurized	9/9	13.4	<LOQ	<LOQ	16.3	13.4
	Flavored	8/8	12.3	<LOQ	<LOQ	16.7	12.3
	Non-alcoholic	4/5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	12.7	11.9
HT-2	Normal lager	17/23	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.57	1.23
	Strong lager	19/19	1.23	<LOQ	<LOQ	1.52	1.23
	Porter	4/5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1.52	1.29
	Unpasteurized	6/9	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Flavored	3/8	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Non-alcoholic	2/5	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Widespread beer contamination with DON were found, herein; confirming the results of other studies conducted in Poland and Europe [22,30–32]. However, differences could be observed in the prevalence of DON in beer samples. Pascari et al. [33] analyzed 64 commercially available European beers but found DON only in 4 samples (6%), whereas ZEN was present in 65% of the samples they examined; with concentrations ranging between 8.24 and 62.98 ng/mL. This is in contrast to our study where ZEN was present in only 6% of the samples, and at levels below 0.5 ng/mL. Low ZEN levels (maximum 2.0 ng/mL), similar to those herein, were also reported by Bauer et al. [31]. However, the authors there detected mycotoxin in all their samples. A selected overview of mycotoxins surveys in beer is presented in Table 5.

**Table 5.** Overview of mycotoxin occurrence in beer samples.

Mycotoxin	Number of Analyzed Beer Samples	Number of Positive Samples	Mycotoxin Concentration Range (ng/mL)	Reference
OTA	69	69	0.008–0.498	[18]
	19	10	1.5–2340	[19]
	318	233	0.01–0.293	[27]
	88	73	0.007–0.204	[29]
	1000	6	<0.3–0.6	[34]
DON	154	60	24.5–47.7	[22]
	374	204	3.2–89.3	[30]
	44	33	2.2–20.0	[31]
	100	83	1.0–73.6	[32]
	64	4	20.97–46.74	[33]
	1000	64	<10–412	[34]
NIV	100	56	0.5–7.6	[32]
	1000	4	8–21	[34]
T-2	1000	3	<0.5–2.3	[34]

Table 5. Cont.

HT-2	154	14	24.2–38.2	[22]
	64	1	23.72	[33]
	1000	1	3.4	[34]
ZEN	35	7	2.6–426	[19]
	64	12	8.24–62.96	[33]
	44	44	0.35–2.0	[31]
	1000	6	<0.3–0.3	[34]

Grain and, thus, their products might be contaminated with various species of molds. Furthermore, each species can produce several mycotoxins, therefore, it is important to evaluate their co-occurrence. The association of mycotoxins might enhance the adverse health effects when compared to individual compounds [35]. More than 93% of the samples contained at least two mycotoxins, i.e., OTA and DON; and at least three compounds were present in 74% of the analyzed beers. The highest number of mycotoxins detected in one sample was 5 (3% of the samples). The distribution of mycotoxins in particular beer samples has revealed that the highest percentage, up to 60% of the samples of each group, contained 3 mycotoxins (Figure 2).

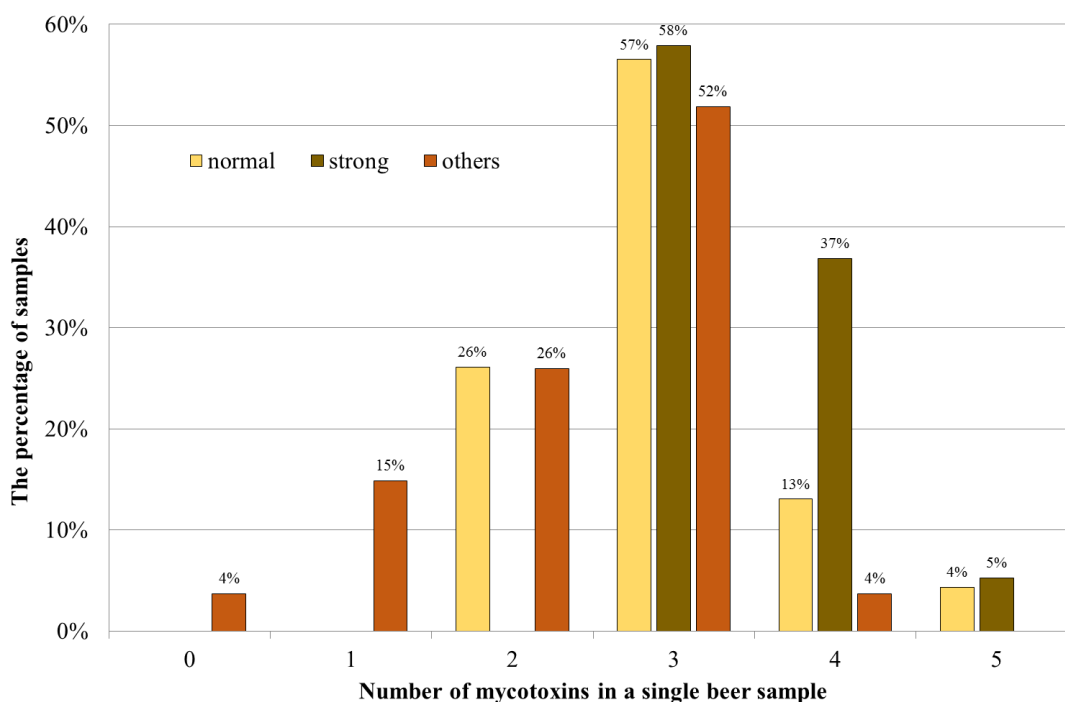


Figure 2. Distribution of mycotoxins in particular beer samples.

### 2.3. Dietary Exposure Assessment

Since very few of our samples were positive for mycotoxins, other than OTA, DON, and HT-2, the calculations below were only performed for those three compounds. Polish foreign trade data on beer export were used for these evaluations [36]. The Global Environmental Monitoring System (GEMS)/Food cluster diets data on mean beer consumption were as follows: Germany and Poland - 259.5mL/day; The Netherlands and Belgium—234.4; United Kingdom—180.2; USA, Canada, and Italy—174.3; Czech Republic, Hungary, Ireland, Romania, and Slovakia—225.2; and Cyprus—174.3. The mean body weight values of 70.8 kg for Europe, and 80.7 kg for Northern America were adopted for these calculations [37]. Estimated daily intake ((EDI): Table 5) was presented as a percentage of TDI (tolerable daily intake) namely: 17.14 ng/kg body-weight (b.w.) for OTA (derived from the tolerable weekly intake (TWI) = 120 ng/kg b.w.); [38], 1000 ng/kg b.w. for DON, and 60 ng/kg b.w. for HT-2 [2].

Using mean values for OTA in beer samples, the daily intake of OTA from beer approximates to 0.8–1.1% of TDI. Even a ‘worst-case’ scenario (i.e., using the maximum concentration observed, herein) only equates to 5.0–7.5% of TDI. These values are in general agreement with previous estimates from the SCOOP Task 3.2.7 [39], in which, the contribution of dietary beer to OTA intake was 0.01–0.14 ng/kg b.w. This ranks beer as a relatively small source of OTA; the contribution of other food groups was estimated as follows—cereals (44%); others (15%); wine (10%); coffee (9%); beer (7%); cocoa and derived products (5%); dried fruits (4%); meat (3%); and spices (3%). Similarly, previous studies of OTA in beer revealed that OTA intake does not exceed the TDI value [34,40].

In the case of HT-2, there were no significant differences between ‘scenarios’ (Table 6; mean—5.0–7.5% of TDI; maximum—6.5–9.7% of TDI). This was due to the fact that although HT-2 was present in 74% of the samples, its concentration was near the LOQ value of the method described herein. Rodríguez-Carrasco et al. [22] analyzed 154 beer samples for *Fusarium* mycotoxins and evaluated the average intake level of HT-2 toxin from beer to be ~7–12% of TDI, set by the Scientific Committee on Food in 2002 (0.1 µg/kg b.w.), which corresponded to ~11–20% of the TDI applied in this study.

**Table 6.** Estimated daily intake (EDI) of OTA, DON, and HT-2 derived from the determined mycotoxin level, beer consumption in various European countries [41], mean body weight [37], and tolerable daily intake (TDIs) [2,38].

Cluster	Country	Toxin Level	EDI [ng/kg b.w.]			% TDI		
			OTA	DON	HT-2	OTA	DON	HT-2
G07	UK	mean	0.14	42.0	3.11	0.80	4.20	5.19
		maximum	0.89	145	4.00	5.21	14.5	6.74
G08	Germany	mean	0.20	60.4	4.48	1.14	6.04	7.47
	Poland	maximum	1.28	208	5.80	7.50	20.8	9.69
G10	Canada	mean	0.13	40.6	3.01	0.77	4.06	5.02
	Italy	maximum	0.86	140	3.90	5.04	14.0	6.52
	USA							
G15	Czech Republic	mean	0.17	52.4	3.89	0.99	5.24	6.49
	Hungary							
	Ireland							
	Romania	maximum	1.12	181	5.10	6.51	18.1	8.42
	Slovakia							

If the mean concentration of DON from this study was used, the calculated daily exposure to this mycotoxin was in the range of 4.1–60% of TDI, whereas, based on maximum values, it reached the level of 14–21% of TDI (Table 6). This married well with previous reports, which estimated exposure to DON from beer at the level of a few percent of the TDI, for either DON [22,31] or DON with its conjugates [30,33]. Higher levels of possible exposure, close to 20% of TDI, have also been previously found [23].

### 3. Conclusions

Herein, a set of 69 beer samples was analyzed for seven mycotoxins using validated HPLC methods, relying on either fluorescence (OTA) or MS/MS (trichothecenes and ZEN) detection. Our results indicate that DON was the most frequently occurring mycotoxin, followed by the OTA and the HT-2 toxin. Moreover >93% of the beer samples examined, contained detectable levels of at least 2 analytes; and ~74% of the samples contained 3 or more mycotoxins.

Using the above data, the potential exposure of various European populations to mycotoxins from beer produced in Poland was calculated. The evidence from this analysis demonstrated that mycotoxin intake from beers made by major breweries was unlikely to exceed 20% of TDI, for any mycotoxin examined herein, and was more likely to be 5%. On one hand, we might conclude that beer did not seem to be a major source of the mycotoxins examined in this study. However, the occurrence

of multiple mycotoxins in many samples and the possibility of undocumented synergies between them suggests that a cumulative mycotoxin limit might be required for beer products in the EU. In addition, the generally higher levels of mycotoxins found in craft beers suggests that these types of products should be tested more often, to protect ‘beer enthusiasts’. We also share the opinion of Varga et al. [30] and Peters et al. [34], that the maximum levels of the most frequently occurring mycotoxins found in beers should be set by the EU, in order to ensure consumer safety.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Sampling

Sixty-nine beer samples (from four major Polish brewing companies) were purchased randomly between January and June 2018, from retail trade in Poland, as follows—42 lager (23 normal < 6.2 abv; 19 strong > 6.2 abv), 5 porter, 9 unpasteurized, 8 flavored, and 5 non-alcoholic beers. All samples were stored at 4 °C and degassed the day before analysis.

### 4.2. Standards and Chemicals

Ochratoxin A, deoxynivalenol, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol (DAS), zearalenone (ZEN), <sup>13</sup>C-DON, <sup>13</sup>C-T-2, <sup>13</sup>C-HT-2 toxins, and <sup>13</sup>C-ZEN were purchased from Biopure (Tulln, Austria). Ammonium acetate, Celite® 545, acetic acid, acetonitrile (ACN; gradient grade), and methanol (MeOH; MS grade) were supplied by Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). The Simplicity 185 (Millipore, Bedford, MA, USA) water purification system was used for the deionized water production.

### 4.3. Sample Preparation

Before the extraction, the pH of all samples was adjusted to 7.2, by addition of 1 M NaOH. OTA was isolated using immunoaffinity columns (IAC) Ochraprep® (R-Biopharm Rhône Ltd., Glasgow, UK)—30 mL of beer was passed through the column at a flow rate of 2–3 mL/min. The column was washed with 20 mL of H<sub>2</sub>O and dried by passing air, throughout. OTA was then eluted using 2.0 mL of MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (98:2). The eluate was evaporated to dryness under nitrogen and then dissolved in 1.0 mL of H<sub>2</sub>O:MeOH:CH<sub>3</sub>COOH (50:49:1).

To prepare the samples for trichothecene and ZEN determination, 4 mL of each beer was shaken with 16 mL of ACN, 0.5 g of Celite® 545, and 20 µL of <sup>13</sup>C-ZEN (an internal standard for ZEN) solution for 20 min. After centrifugation (4000× g, 10 min), 50 µL of isotopically labelled analogues (IS: <sup>13</sup>C-DON, <sup>13</sup>C-T-2, <sup>13</sup>C-HT-2) were added to 5 mL of the supernatant. Samples were then evaporated to dryness under nitrogen and dissolved in 0.5 mL of MeOH:H<sub>2</sub>O (1:4).

### 4.4. Instrumental Analysis

OTA evaluation was performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (Ex: 330 nm, Em: 460 nm), using the following materials, HPLC—LaChrom ELITE HPLC system (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany), chromatographic column—LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4.0 mm, 5 µm), oven temperature—25 °C, mobile phase—ACN:2%CH<sub>3</sub>COOH (70:30), flow rate—1 mL/min, injection volume—50 µL.

Trichothecenes and ZEN were determined using HPLC with MS/MS detection. Analytes were separated and determined using HPLC Shimadzu Nexera (Shimadzu, Tokyo, Japan), API 4000 mass spectrometer (Sciex, Foster City, CA, USA), the Gemini-NX C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) chromatographic column, and an oven temperature of 27 °C; mobile phase of A was H<sub>2</sub>O + 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + 1% CH<sub>3</sub>COOH, B: MeOH + 5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> + 1% CH<sub>3</sub>COOH, flow rate was 0.7 mL/min, and the injection volume was 20 µL. HPLC-MS/MS method was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode in negative and positive modes, with following conditions—collision gas 6 psi, curtain gas 25 psi, ion source gas1 50 psi, ion source gas2 50 psi,

ion spray voltage 5000 V (positive mode) and −4000 V (negative mode), and source temperature 500 °C. MRM analysis had two transitions per compound. Optimized analyte-dependent MS/MS parameters are given in Table 7.

**Table 7.** Optimized mass spectrometry conditions.

Compound	Precursor Ion (m/z)	Declustering Potential (V)	Product Ions (m/z) <sup>a</sup>	Collision Energy (V)	Cell Exit Potential (V)
Nivalenol	371.1 [M + CH <sub>3</sub> COO] <sup>−</sup>	−40	<b>281.0</b> /59.0	−22/−40	−14/−5
Deoxynivalenol	355.1 [M + CH <sub>3</sub> COO] <sup>−</sup>	−35	<b>264.8</b> /58.9	−20/−38	−17/−1
13C-Deoxynivalenol	370.2 [M + CH <sub>3</sub> COO] <sup>−</sup>	−50	310.0	−14	−7
Diacetoxyscirpenol	384.1 [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	51	<b>307.0</b> /247.0	17/19	20/16
T-2 toxin	484.1 [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	61	<b>215.0</b> /185.0	29/25	12/14
13C-T-2 toxin	508.3 [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	61	322.1	19	8
HT-2 toxin	442.2 [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	51	<b>215.0</b> /263.0	19/17	14/18
13C-HT-2 toxin	464.1 [M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	51	278.1	17	18
Zearalenone	317.1 [M − H] <sup>−</sup>	−85	<b>130.8</b> /174.9	−40/−32	−7/−9
13C-Zearalenone	355.1 [M − H] <sup>−</sup>	−100	139.9	−42	−7

<sup>a</sup> quantifier ions are given in bold.

The analyte identification was done, based on the retention time of the calibration solutions, as well as the spiked samples, and the signal value (area) increment, with reference to the spiking amount. For MS/MS detection, two characteristic MRM transitions for each analyte were applied as well (Table 7).

#### 4.5. Statistical Analysis

To evaluate the significant differences in mycotoxin concentration among the beer types, the Kruskal-Wallis ANOVA test was applied ( $\alpha = 0.05$ ). The average values of the analytes recovered were compared, using the *t*-Student test ( $\alpha = 0.05$ ). For the calculation, the results below the LOD value were set as 0.5 LOD, whereas the results comprising between the LOD and the LOQ were set as the LOQ value for each mycotoxin. A positive sample refers to a sample with a result above the limit of detection. All statistical analyses were applied using the Statistica 10.0 software package (StatSoft, Krakow, Poland).

#### 4.6. Dietary Exposure Assessment

Calculations of the estimated daily intake (EDI) of mycotoxins in different European populations were prepared, using food-consumption data derived from the GEMS/Food cluster diets 2012, prepared by WHO [41]. All contamination data (mean and median concentrations) were taken from the results of analyses conducted herein. Since beer is an alcoholic beverage, the calculation was performed for adults only; using mean body weight values adjusted for different world regions, as previously described [37]. The EDI was calculated as follows:

$$EDI = \frac{C * Cons}{b.w.}, \quad (1)$$

where C is the concentration of mycotoxin in contaminated beer; Cons stands for the average daily consumption of beer in the study region; and b.w. represents the body weight.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.G. and A.B.-K.; methodology, A.B.-K., R.K.; validation, A.B.-K., R.K.; formal analysis, R.K., A.B.-K.; investigation, R.K., A.B.-K.; resources, J.G., R.K., A.B.-K., M.T.; writing—original draft preparation, J.G., A.B.-K.; writing—review and editing, R.K., M.T.; supervision, J.G.; project administration, J.G.; funding acquisition, J.G., M.T., A.B.-K.

**Funding:** This study was supported by the Polish Minister of Science and Higher Education, under the program “Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022 (Grant No. 008/RID/2018/19).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

Abv	alcohol by volume
ACN	acetonitrile
b.w.	body-weight
DAS	diacetoxyscirpenol
DON	deoxynivalenol
EDI	estimated daily intake
HPLC	high performance liquid chromatography
ISs	internal standards
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
NIV	nivalenol
OTA	ochratoxin A
TDI	tolerable daily intake
ZEN	zearalenone

## References

1. Hornsey, I. *A History of Beer and Brewing*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2003.
2. European Commission. Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L364*, 5–24.
3. European Commission. Commission regulation (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) no 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union* **2007**, *L255*, 14–17.
4. European Commission. Commission regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending regulation (EC) no 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Off. J. Eur. Union* **2010**, *L35*, 7–8.
5. European Commission. Commission regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) no 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Off. J. Eur. Union* **2010**, *L50*, 8–12.
6. European Commission. Commission regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2012**, *L176*, 43–45.
7. European Commission. Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Off. J. Eur. Union* **2013**, *L91*, 12–15.
8. Beer Production 2010–2016. In *Beer Statistics 2017*; The Brewers of Europe: Brussels, Belgium, 2017.
9. Milićević, D.R.; Škrinjar, M.; Baltić, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. *Toxins* **2010**, *2*, 572–592. [[CrossRef](#)]
10. Bayman, P.; Baker, J.L. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* **2006**, *162*, 215–223. [[CrossRef](#)]
11. Anli, E.; Mert Alkis, I. Ochratoxin A and brewing technology: A review. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116*, 23–32. [[CrossRef](#)]
12. Lancova, K.; Hajslova, J.; Poustka, J.; Krplova, A.; Zachariasova, M.; Dostalek, P.; Sachambula, L. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and ‘masked’ deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Addit. Contam.* **2008**, *25*, 732–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kostelanska, M.; Zachariasova, M.; Lacina, O.; Fenclova, M.; Kollos, A.L.; Hajslova, J. The study of deoxynivalenol and its masked metabolites fate during the brewing process realised by UPLC-TOFMS method. *Food Chem.* **2011**, *126*, 1870–1876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wolf-Hall, C.E. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 89–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Habschied, K.; Šarkanj, B.; Klapec, T.; Krstanović, V. Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions. *Food Chem.* **2011**, *129*, 329–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

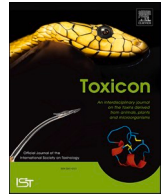
16. Běláková, S.; Benešová, K.; Čáslavský, J.; Svoboda, Z. The occurrence of the selected *Fusarium* mycotoxins in Czech malting barley. *Food Control*. **2014**, *37*, 93–99. [CrossRef]
17. Jørgensen, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* **1998**, *15*, 550–554. [CrossRef]
18. Medina, A.; Valle-Algarra, F.M.; Gimeno-Adelantado, J.V.; Mateo, R.; Mateo, F.; Jiménez, M. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121*, 178–183. [CrossRef] [PubMed]
19. Odhav, B.; Naicker, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 55–61. [CrossRef] [PubMed]
20. Zöllner, P.; Berner, D.; Jodlbauer, J.; Lindner, W. Determination of zearalenone and its metabolites alpha- and beta-zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *738*, 233–241. [CrossRef]
21. Schothorst, R.C.; Jekel, A.A. Determination of trichothecenes in beer by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chem.* **2003**, *82*, 475–479.
22. Rodríguez-Carrasco, Y.; Fattore, M.; Albrizio, S.; Berrada, H.; Mañes, J. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food Chem.* **2015**, *178*, 149–155. [CrossRef] [PubMed]
23. Piacentini, K.C.; Savi, G.D.; Olivo, G.; Scussel, V.M. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. *Food Control* **2015**, *50*, 925–929. [CrossRef]
24. European Commission. Commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, *L70*, 12–34.
25. European Commission. Commission regulation (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. *Off. J. Eur. Union* **2014**, *L147*, 29–43.
26. Habler, K.; Gotthardt, M.; Schüler, J.; Rychlik, M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in beer. *Food Chem.* **2017**, *218*, 447–454. [CrossRef]
27. Bresch, H.; Urbanek, M.; Hell, K. Ochratoxin A in coffee, tea and beer. *Arch. Fur Lebensm.* **2000**, *51*, 89–94.
28. Tangni, E.K.; Ponchaut, S.; Maudoux, M.; Rozenberg, R.; Larondelle, Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: Occurrence and exposure assessment. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19*, 1169–1179. [CrossRef]
29. Medina, A.; Jiménez, M.; Gimeno-Adelantado, J.V.; Valle-Algarra, F.M.; Mateo, R. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1083*, 7–13. [CrossRef]
30. Varga, E.; Malachowa, A.; Schwartz, H.; Krška, R.; Berthiller, F. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol on 374 beer samples. *Food Addit. Contam.* **2013**, *30*, 137–146. [CrossRef]
31. Bauer, J.I.; Gross, M.; Gottschalk, C.; Usleber, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. *Food Control* **2016**, *63*, 135–139. [CrossRef]
32. Bryła, M.; Ksieniewicz-Woźniak, E.; Waśkiewicz, A.; Szymczyk, K.; Jędrzejczak, R. Co-occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in beer samples. *Food Control*. **2018**, *92*, 319–324. [CrossRef]
33. Pascari, X.; Ortiz-Solá, J.; Marín, S.; Ramos, A.J.; Sanchis, V. Survey of mycotoxins in beer and exposure assessment through the consumption of commercially available beer in Lleida, Spain. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *92*, 87–91. [CrossRef]
34. Peters, J.; van Dam, R.; van Doorn, R.; Katerere, D.; Berthiller, F.; Haasnoot, W.; Nielen, M.W.F. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185887. [CrossRef]
35. Grenier, B.; Oswald, I.P. Mycotoxin co-contamination of food and feed: Meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin J.* **2011**, *4*, 285–313. [CrossRef]
36. The Yearbook of Foreign Trade Statistics of the Polish Central Statistical Office, Warsaw. 2017. Available online: <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-statystyczny-handlu-zagranicznego-2017,9,11.html> (accessed on 4 April 2019).
37. Walpole, S.C.; Prieto-Merino, D.; Edwards, P.; Cleland, J.; Stevens, G.; Roberts, I. The weight of nations: An estimation of adult human biomass. *BMC Public Health* **2012**, *12*, 439. [CrossRef] [PubMed]



38. EFSA (European Food Safety Authority). Statement on recent scientific information on the toxicity of Ochratoxin A. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1626. [[CrossRef](#)]
39. European Commission Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. 2002. Available online: [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical\\_safety/contaminants/catalogue/ochratoxin\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/catalogue/ochratoxin_en) (accessed on 4 April 2019).
40. Coronel, M.B.; Marín, S.; Cano-Sancho, G.; Ramos, A.J.; Sanchis, V. Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer. *Food Addit. Contam. Part A* **2012**, *29*, 979–993. [[CrossRef](#)]
41. GEMS/Food Consumption Cluster Diets. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme. Department of Food Safety and Zoonoses, World Health Organization: Geneva, 2012. Available online: [https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO\\_HQ\\_Reports/G7/PROD/EXT/GEMS\\_cluster\\_diets\\_2012&userid=G7\\_ro&password=inetsoft123](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G7/PROD/EXT/GEMS_cluster_diets_2012&userid=G7_ro&password=inetsoft123) (accessed on 4 April 2019).



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract

Magdalena Twarużek, Robert Kosicki, Justyna Kwiatkowska-Giżyńska, Jan Grajewski, Iwona Altny\*

Department of Physiology and Toxicology, Faculty of Biological Sciences, Kazimierz Wielki University, Chodkiewicza 30, 85-064, Bydgoszcz, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Molds  
Ochratoxin A  
Citrinin  
Dietary supplements  
Green coffee  
Green coffee extract

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the degree of mold contamination and mycotoxin levels in commercially available green coffee products and dietary supplements with green coffee extract. The study included 34 samples from green coffee products: raw beans ( $n = 16$ ), ground coffee ( $n = 15$ ) and instant coffee ( $n = 3$ ), as well as 22 samples from dietary supplements in form of capsules ( $n = 19$ ), tablets ( $n = 2$ ) and sachets ( $n = 1$ ). Total mold count was determined with spread-plate method. Anamorphic mold were identified based on their microscopic morphology and the type of sporulation. Concentrations of mycotoxins, ochratoxin A and citrinin, were quantified by means of HPLC-fluorescence detection. Molds, typically *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., were found in 94% of green coffee beans, 100% of ground and instant coffee samples, and 55% of dietary supplement samples. None of the samples contained detectable levels of citrinin. Ochratoxin A (0.4 ng/g) was detected in only one sample of raw green coffee beans, but in up to 40% and 67% of ground and instant coffee samples, respectively. Mean concentrations of ochratoxin A in ground and instant coffee samples were 3.28 ng/g and 4.09 ng/g, respectively, and maximum concentrations amounted to 6.65 ng/g and 7.44 ng/g, respectively. Ochratoxin A (mean concentration 9.60 ng/g, maximum level 31.4 ng/g) was also detected in up to 58% of the supplement capsules, but in none of tablets and sachets.

## 1. Introduction

Green coffee, i.e. raw coffee beans that have not been subjected to fermentation and thermal processing, gain a growing popularity worldwide. Several studies demonstrated that green coffee and its products may be beneficial for human health, primarily due to high content of antioxidants. The main positive health effect of green coffee is weight reduction; one of antioxidants contained in unprocessed coffee beans, chlorogenic acid, prevents gastrointestinal absorption of sugars (Cho et al., 2010; Thom, 2007; van Dijk et al., 2009). Moreover, available evidence suggests that ingestion of green coffee products may also improve vasoreactivity and thus, may play a supportive role in the control of arterial hypertension (Ochiai et al., 2004). All these observations were reflected by a growing demand for light or medium roast coffee which is not deprived of antioxidants due to less aggressive thermal treatment, as well as for unprocessed green coffee products, including dietary supplements with green coffee extract (Castellano-Onorio et al., 2011; Suárez-Quiroz et al., 2005).

However, aside from the beneficial effects, products made of unprocessed or mildly processed coffee beans may also pose some health threats. Similar to other materials of plant origin, green coffee beans are prone to contamination with fungi and their mycotoxins, in particular ochratoxin A (OTA). Contamination occurs primarily during coffee berry picking and storage of crops, but may be also associated with poor hygienic conditions during transport (Miraglia and Brera, 2002). Also the analysis of two cultivation systems (conventional vs. ecological) did not show considerable differences in the degree of coffee bean contamination with OTA (de Fátima Rezende et al., 2013). Presence of OTA cannot be detected solely based on organoleptic evaluation since not all visually altered beans are contaminated with this toxin and vice versa, not all macroscopically normal beans are mycotoxin-free (Heilmann et al., 1999). Research showed that each mold species has preferential conditions for mycotoxin production. Consequently, each attempt to control contamination of a given product with OTA should start from the identification of the causative organism, followed by appropriate modification of environmental conditions, primarily water

\* Corresponding author.

E-mail address: [iwonaalt@ukw.edu.pl](mailto:iwonaalt@ukw.edu.pl) (I. Altny).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.10.021>

Received 12 August 2020; Received in revised form 25 September 2020; Accepted 20 October 2020

Available online 20 October 2020

0041-0101/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

activity and temperature during storage (Gil-Serna et al., 2014). According to Heilmann et al. (1999), microorganisms found in coffee products are typically primary contaminants; this puts particular emphasis on implementation of good manufacturing practices, from the selection of appropriate quality beans to optimization of production processes and storage conditions. Equally important is determination of OTA levels at various stages of production, such as washing, fermentation and roasting (Vatinno et al., 2008), since some studies demonstrated that if conducted appropriately, those processes may contribute to lesser toxicity of final coffee product (Castellanos-Onorio et al., 2011; Suárez-Quiroz et al., 2005).

At present, maximum acceptable levels of OTA have been established solely for roasted, ground and instant coffee (EC, 2006), and no reference values exist for the products made of green coffee beans, including dietary supplements with green coffee extract. Some evidence suggests that the latter products, generally considered as a component of healthy diet, may be in fact heavily contaminated with mycotoxins (Vaclavik et al., 2013). Consequently, the aim of this study was to determine the degree of molds contamination and mycotoxin levels in commercially available green coffee products and dietary supplements with green coffee extract.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

The study included 56 samples from commercially available green coffee products and dietary supplements based on green coffee extract. The source materials were purchased at grocery stores, herbal stores and pharmacies. The study material included 34 samples from green coffee products: raw beans ( $n = 16$ ), ground coffee ( $n = 15$ ) and instant coffee ( $n = 3$ ), as well as 22 samples from dietary supplements in form of capsules ( $n = 19$ ), tablets ( $n = 2$ ) and sachets ( $n = 1$ ).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Total mold count

The study material was thoroughly mixed and homogenized under sterile conditions; in the case of capsules, only the active ingredient was processed, without the outer shell. The samples of appropriate weight (5 g) were placed in sterile bags in a Stomacher-type homogenizer (Bag-Mixer 400, Interscience, France). Then, 45 ml of sterile diluting fluid prepared according to the Polish Standard PN EN ISO 6887-1:2000 (2000) (ingredients: enzymatic hydrolysate of casein – 1 g, sodium chloride – 8.5 g, distilled water – 1000 ml, pH  $7.0 \pm 0.2$ ) were added, and the material was homogenized for 90 s.

Total mold count was determined according to the Polish Standard PN ISO 7954:1999 (1999) with a slight modification (spread-plate inoculation with 1 ml and 0.1 ml of the study material, in triplicate). Upon preparing serial decimal dilutions from the homogenized basic suspension (the study material diluted 1:10), the inoculum was spread on YGC (yeast extract glucose chloramphenicol) agar. The plates were incubated at  $25 \pm 1$  °C for 5–7 days. Then, all plates with 10–100 colonies were counted. Anamorphic molds were distinguished from yeasts based on their microscopic morphology and the type of sporulation. The results were expressed as the number of colony forming units (CFU) per 1 g of the sample (CFU/g).

#### 2.2.2. Species identification in anamorphic fungi

Direct microscopic examination of colonies recovered from YGC agar was performed using Amman's lactophenol wet mounts, according to the Polish Standard PN R-64791:1994 (1994) (Amman's lactophenol: crystalline phenol – 10 g, lactic acid – 10 g, glycerin – 20 g, distilled water – 10 ml, methylene blue – 0.5 g per 100 ml of lactophenol).

### 2.2.3. Chemicals

The following reagents were used: HPLC-grade acetonitrile (Merck), HPLC-grade methanol (Merck), HPLC-grade ethyl acetate (POCH), 85% orthophosphoric acid, pure (POCH), sodium hydroxide, pure (POCH), glacial acetic acid, pure (POCH), phosphate-buffered saline (PBS, Oxoid), water purified with Simplicity-UV system (Merck-Millipore), Ochraprep® immunoaffinity columns (R-Biopharm), CitriTest (Vicam), ochratoxin A and citrinin standards (Biopure).

### 2.2.4. Extraction of OTA

12.5 g of the sample were placed in a 100-ml conical flask, homogenized with 50 ml of acetonitrile:water (60:40) for 2 min (shaft 18F, DIAX 900, Heidolph), and filtered. A 5-ml aliquot of filtered supernatant was added to 55 ml of PBS solution, and the mixture was filtered; 48 ml of diluted extract (corresponding to 1 g of the sample) were applied to an Ochraprep® column at a flow rate of 1–2 drops/second. Then, the column was dried with air, washed with 20 ml of purified water and again dried with air. To remove all residues of the washing solution, inner walls of the column were dried with a blotting paper and with 40 ml of air. OTA was eluted using 1.5 ml of methanol:CH<sub>3</sub>COOH solution (98:2) and then 1.5 ml of purified water were passed through the column, the sample was vortexed. The eluate with purified water was collected in a sample vial.

### 2.2.5. Extraction of CIT

To obtain 0.01 M phosphoric acid, 0.674 ml of 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with density  $d = 1.71$  g/cm<sup>3</sup> were placed in a calibrated flask, and HPLC-grade water was added up to 1 L. Under the control of a pH meter (Crison GLP 21) equipped with pH electrode (Crison pH 5010T), pH of the solution was adjusted to 2.5 with 2 M and 1 M sodium hydroxide solutions. Then, 750 ml of the solution were removed from the flask, and pH of the remaining volume was adjusted to 7.5. A 10-g sample was placed in a 100-ml conical flask, homogenized with 50 ml of methanol:water (70:30) for 1 min (shaft 18F, DIAX 900, Heidolph), and filtered. A 1-ml aliquot of filtered supernatant was added to 49 ml of 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with pH = 7.5, and the mixture was filtered; 10 ml of diluted extract (corresponding to 0.04 g of the sample) were applied to a CitriTest HPLC column at a flow rate of 1–2 drops/second. Then, the column was dried with air, washed with 5 ml of 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> with pH = 7.5 and again dried with air. To remove all residues of the washing solution, inner walls of the column were dried with a blotting paper and with 40 ml of air. Citrinin was eluted using 1 ml of methanol:0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution with pH = 2.5 (70:30) and then 1.5 ml of purified water were passed through the column and the sample was vortexed. The eluate was collected in a sample vial.

### 2.2.6. Chromatographic analysis

Ochratoxin A and citrinin were quantified by means of HPLC-fluorescence detection. The HPLC system (Merck Hitachi) consisted of an L-2130 pump, L-2300 column oven, L-2200 autosampler, L-2480 fluorescence detector, and LiChrospher® 100 RP-18 column (250 × 4 mm, 5 μm) with precolumn (4 × 4 mm, 5 μm). Injection volume was 50 μl. Isocratic mobile phase included acetonitrile (70%) and 2% CH<sub>3</sub>COOH (30%) for OTA, and methanol (55%), ethyl acetate (10%) and 0.6 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (35%) for citrinin. Concentrations of both mycotoxins were determined at a flow rate of 1 ml/min. Excitation and emission wavelengths for the fluorescence detector equaled 330 nm and 460 nm, respectively, for OTA, and 340 nm and 495 nm, respectively, for citrinin. The retention times for OTA and citrinin were 3.5 min and 4.3 min, respectively (Figs. 1 and 2). Validation parameters are presented in Table 1.

### 2.2.7. Statistical analysis

Descriptive statistics (the number of samples, mean and maximum mycotoxin concentrations) as well as Pearson's correlation coefficient and statistical significance (for the significance level  $\alpha = 0.05$ ) were

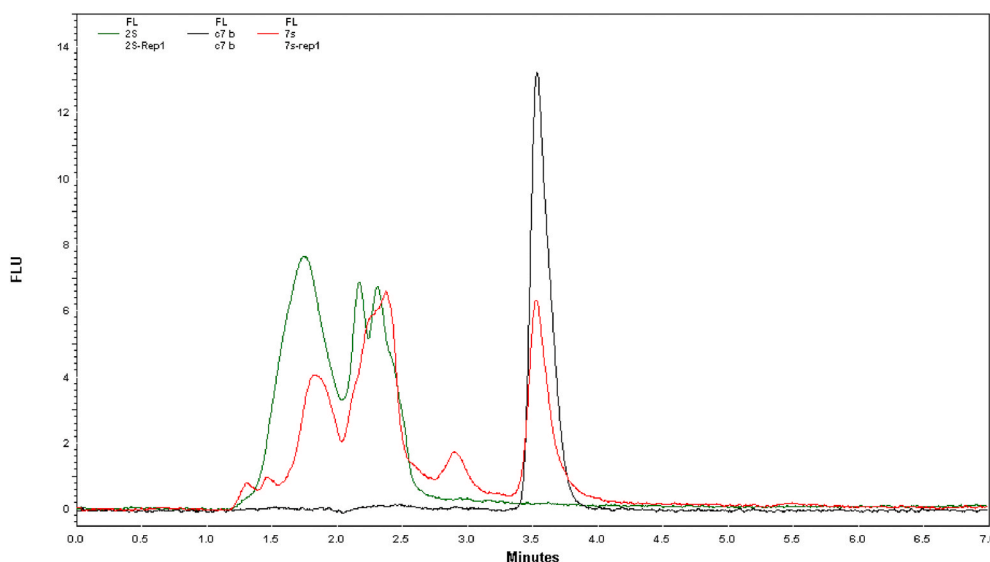


Fig. 1. Chromatogram of Ochratoxin A (black – OTA standard; red - sample with OTA; green - sample without OTA). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

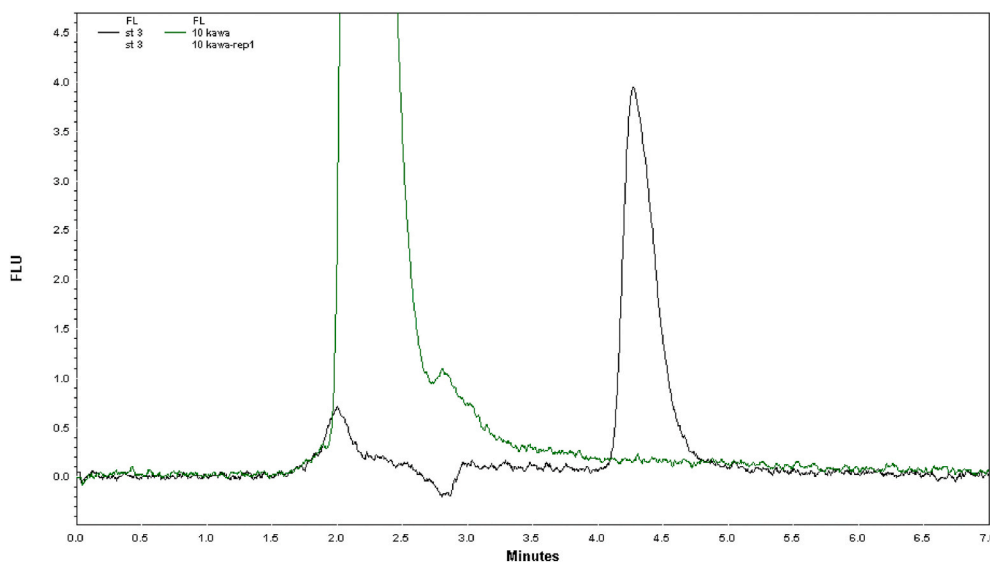


Fig. 2. Chromatogram of Citrinine (black– CIT standard; green - sample without CIT). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1

Parameters of validation of OTA and CIT.

	Recovery (%) n =	RSD (%)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
	3			
<b>Ochratoxin A</b>			0.11	0.36
spiking level - 1 ng/g	83.6	5.2		
spiking level - 3 ng/g	85.1	2.1		
<b>Citrinin</b>			0.6	2.0
spiking level - 5 ng/g	74.2	4.6		
spiking level - 15 ng/g	77.3	3.9		

n – number of replicates.

calculated using MS Excel 2013 for Windows (Microsoft).

### 3. Results

#### 3.1. Mycological analysis of green coffee

Molds, typically *Aspergillus* spp., were found in 94% and 100% of green coffee bean and ground coffee samples, respectively. Also 100% of instant coffee samples tested positive for molds, usually *Penicillium* spp. The highest mean mold counts, both for yeast and molds overall, or for each of these groups separately, were found in ground coffee, and the lowest in instant coffee (Table 2).

#### 3.2. Mycological analysis of dietary supplements

Molds, primarily *Penicillium* spp., and less often *Aspergillus* spp., were found in 55% of the samples. The highest proportion of positive samples was observed in the case of capsules (57%); although molds were found

**Table 2**

Occurrence of fungi in green coffee and dietary supplements with green coffee extract.

Material	Positive/ examined samples (n)	Mean mold and yeast count (CFU/g)	Mean mold count (CFU/ g)	Mean yeast count (CFU/ g)
Coffee beans	15/16	$5.2 \times 10^3$ 5 203, C	$3.6 \times 10^3$ 3 605, C	$1.6 \times 10^3$ 1 598, C
Ground coffee	15/15	$9.3 \times 10^3$ 9 332, C	$5.0 \times 10^3$ 5 036, C	$4.3 \times 10^3$ 4 296, C
Instant coffee	3/3	$2.6 \times 10^2$ 264, C	$2.2 \times 10^2$ 219, C	<50, K 45, C
Capsules	11/19	$2.3 \times 10^3$ 2 284, C	$5.9 \times 10^2$ 590, C	$1.7 \times 10^3$ 1 694, C
Tablets	1/2	$3.7 \times 10^3$ 3 743, C	$3.6 \times 10^3$ 3 576, C	$1.7 \times 10^2$ 167, C
Sachets	0/1	n.d	n.d	n.d

CFU – colony-forming unit; C – colony; n.d. – not detected.

in 50% of supplement tablets and in none of the sachets, these findings should be interpreted carefully, considering that the total number of examined samples for these two supplement types was two and one, respectively (Table 2). While mean mold counts in dietary supplements were generally lower than in raw and processed green coffee beans, maximum mold counts in some tablets were markedly higher (up to  $9.7 \times 10^3$  CFU/g).

### 3.3. Mycotoxicological analysis of green coffee

None of the samples contained detectable levels of citrinin. Concentrations of OTA in processed green coffee were higher than in raw beans. This mycotoxin (0.4 ng/g) was detected in only one sample of raw green coffee beans, but in up to 40% and 67% of ground and instant coffee samples, respectively (Fig. 3). Mean concentrations of OTA in ground and instant coffee samples were 3.28 ng/g and 4.09 ng/g, respectively, and maximum concentrations amounted to 6.65 ng/g and 7.44 ng/g, respectively.

### 3.4. Mycotoxicological analysis of dietary supplements

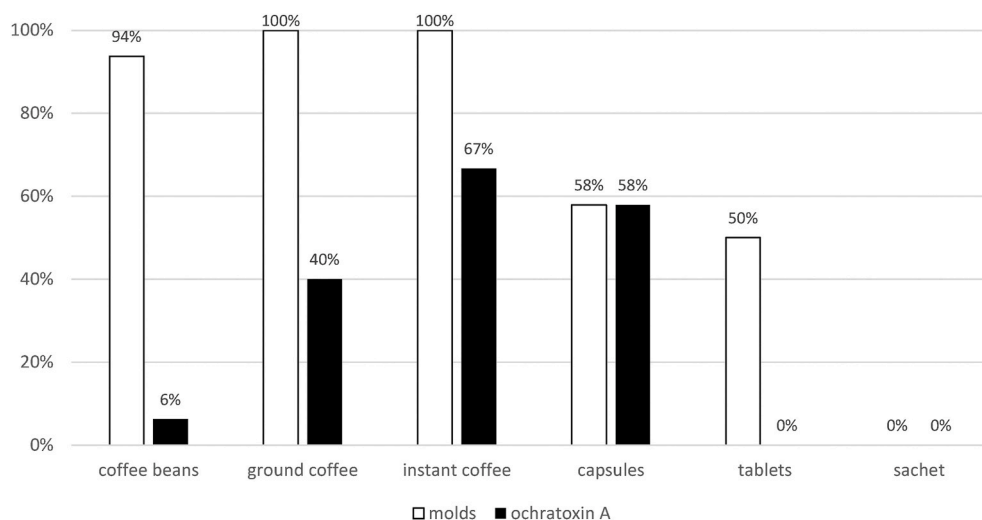
OTA (mean concentration 9.60 ng/g, maximum level 31.4 ng/g) was detected in up to 58% of the supplement capsules, but in none of the tablets and sachets. None of the dietary supplement samples tested positive for citrinin.

## 4. Discussion

This study demonstrated that a considerable proportion (94–100%) of green coffee beans, either raw or processed, were contaminated with potentially toxigenic fungi. In 6–67% of the samples, the positive result of mycological testing co-existed with presence of a mycotoxin, OTA. The most frequently isolated molds were *Penicillium* spp. (61%) and *Aspergillus* spp. (46%). This taxonomic distribution differed slightly from the results of another study, in which the most common molds contaminant of Vietnamese coffee (Robusta) was *Aspergillus niger*, present in 89% of the samples (Leong et al., 2007). In presented research, very weak correlations between OTA and *Penicillium* were observed in the case of both coffee and supplements ( $r = 0,135$  and  $r = 0,044$ , respectively). These correlations were not statistically significant ( $p = 0,447$  and  $p = 0,845$ , respectively). There was also a very weak not statistically significant correlation between OTA and *Aspergillus* ( $r = 0,078$  and  $0,081$  for coffee and supplements, respectively). Similar statistically insignificant results were obtained by determining the correlation between OTA and the total number of molds ( $r = 0,109$  and  $r = 0,067$  in coffee and in supplements, respectively).

Presence of OTA in green coffee beans has been first reported in 1974 (Levi et al., 1974), and then confirmed by other authors (Alvinda and de Guzman, 2016; Broissin-Vargas et al., 2017; de Fátima Rezende et al., 2013; Jeszka-Skowron et al., 2017). However, most of the previous studies centered around the contamination of raw material (i.e. green coffee beans), rather than analyzed the presence of mycotoxins in processed products. Notably, our findings suggest that such products may contain OTA more often and at higher concentrations than their raw materials. We found OTA in only 6% of unprocessed green coffee beans, but in up to 40% and 67% of ground and instant coffee samples, respectively. Also mean concentration of OTA in green coffee beans (0.4 ng/g) was markedly lower than in ground and instant coffee (3.28 ng/g and 4.09 ng/g, respectively).

Microbiological quality of a final food product reflects microbial load in its raw materials, environmental conditions during processing and storage, and exposure to secondary contaminants at various stages of the production process. Some authors verified whether certain properties of raw green coffee beans may determine their susceptibility to fungal contamination. Leong et al. (2007) showed that Robusta beans were more prone to contamination with molds than Arabica. Another study documented lesser contamination of roasted coffee with larger beans as compared to smaller-bean varieties (Oliveira et al., 2013). Surprisingly, presence of defective beans (up to 38%) was reflected by neither heavier contamination of green coffee samples with potentially toxigenic molds

**Fig. 3.** Percentages of green coffee products and dietary supplements testing positive for the presence of molds and Ochratoxin A.

nor higher concentrations of OTA (Taniwaki et al., 2014).

Adequate water activity within environment is crucial for survival and growth of mold. Thus, some authors suggested that high moisture content in green coffee beans and/or high air humidity may create favorable conditions for the growth of toxigenic fungi (Palacios-Cabrera et al., 2007; Pardo et al., 2005a, 2005b); however, other researchers found no correlation between the moisture content in the beans and their contamination with OTA (Heilmann et al., 1999). Also the effect of technological processes on the concentration of this mycotoxin in processed green coffee is still unclear. Some studies demonstrated that mycotoxin content in green coffee products may be reduced during washing and polishing (Blanc et al., 1998; Heilmann et al., 1999), but these findings were not verified by other authors. Relatively more is known about the effects of roasting on the mycological properties of coffee beans. Experiments conducted in 1980s showed that up to 70–80% of mycotoxins present in coffee beans are degraded during roasting (Levi, 1980). However, in a more recent study using more sophisticated chromatographic techniques, roasting resulted in only a slight decrease in the OTA content in green coffee beans; this mycotoxin was found in more than 50% of raw green coffee samples and in up to 45% of beverages prepared from roasted ground beans (Studer-Rohr et al., 1995). The discrepancies in the post-roasting concentrations of OTA were documented in a systematic review conducted by Amézqueta et al. (2009); according to those authors, the degree of reduction in mycotoxin content during roasting may vary considerably, from 0% to 100%. The information about the effect of coffee roasting on the reduction of mycotoxin level in the product relates to Ochratoxin A, Aflatoxin and Sterigmatocystin, which show that the process reduces their levels by 80%, 50–60% and 70%, respectively (Mujahid et al., 2020). Munyendo et al. (2017) reported in their work that in all coffee samples ochratoxin A was not detected. Molds counts of coffee samples from Factories and Estates were found to be between  $1 \times 10^3$  cfu/ml to  $6.0 \times 10^1$  cfu/ml.

Furthermore, available evidence suggests that even after roasting, green coffee products may contain toxic levels of OTA (Suárez-Quiroz et al., 2005). In the study conducted by Lerda et al. (2013), green coffee beans artificially contaminated with this mycotoxin to a final concentration of 12 ng/g were roasted at 230 °C for 5, 8 and 12 min; the treatment contributed to a decrease in the baseline OTA level, down to 9, 5 and 2.2 ng/g, respectively. However, further toxicity study in *Allium cepa* showed that this residual OTA still retained its clastogenic and mutagenic potential (Lerda et al., 2013). Bessaire et al. (2019) in their study found at highest levels Ochratoxin A, Fumonisin B<sub>2</sub>, Sterigmatocystin, Beauvericin and Enniatin A with maximum levels at 12.2, 76.3, 19.8, 4.4 and 1.7 µg/kg, respectively. Mujahid et al. (2020) in their research showed that, the contamination of *Alternaria* toxins in green coffee samples, was at the level of 9%.

Another problem identified in this study was frequent occurrence of OTA in dietary supplements with green coffee extract. Up to 50% of the supplement samples examined in our study tested positive for OTA, and mean level of this mycotoxin was markedly higher than in coffee products (9.60 ng/g, range 0.46–31.4 ng/g). Our findings are consistent with the results of another study of 50 dietary supplements based on green coffee bean extract; in that study, ochratoxin A was detected in 36% of the samples subjected to UHPLC-MS/MS, at concentrations between less than 1.0 ng/g and 136.9 ng/g (Vaclavik et al., 2013). Also dietary supplements based on other components, such as brewer's yeast, ginger capsules and grape wine derivatives, were shown to be heavily contaminated with mycotoxins (Gottschalk et al., 2016; Solfrizzo et al., 2015; Trucksess et al., 2009). These data are alarming, taking into account that dietary supplements are generally considered as healthy products, and as such, ingested regularly for longer periods of time. Furthermore, such supplements usually contain concentrated green coffee extract; in contrast coffee is consumed diluted with water, after the process of brewing which also was shown to reduce the mycotoxin content (Blanc et al., 1998; Heilmann et al., 1999). Consequently,

ingestion of contaminated dietary supplements with green coffee extract seems to predispose to a chronic mycotoxicosis.

We are well aware of potential limitations of this study. First, the number of examined samples was relatively small, especially for instant coffee and some types of dietary supplements. Further, we did not verify which of the mold species found in the study material were in fact toxigenic. Finally, we did not analyze the toxicity of OTA in the context of human health.

## 5. Conclusions

Green coffee products and dietary supplements with green coffee extract were frequently contaminated with toxigenic molds and ochratoxin A. The latter was present at higher concentrations in processed green coffee products than in raw coffee beans, which implies that contamination might have occurred during the production process. These findings justify implementation of adequate mycological control measures, especially with regards to the production of dietary supplements, generally considered as healthy foods.

## Ethical statement

This manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. Publication of this manuscript is approved by all authors.

## Funding

The study was supported from statutory funds related to the project entitled 'Research on the occurrence and toxicity of secondary metabolites of molds and identification of organisms by molecular biology methods' (Ministry of Science and Higher Education, Republic of Poland).

## CRedit authorship contribution statement

**Magdalena Twarużek:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Project administration, Writing - original draft, Supervision. **Robert Kosicki:** Methodology, Formal analysis, Resources. **Justyna Kwiatkowska-Giżyńska:** Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing - review & editing. **Jan Grajewski:** Conceptualization, Writing - original draft. **Iwona Ałtyn:** Data curation, Visualization, Writing - review & editing.

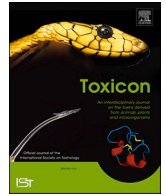
## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- Alvandia, D.G., de Guzman, M.F., 2016. Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Res.* 32, 61–67. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0240-3>.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A., 2009. Ochratoxin A determination: a review. *Food Contr.* 20, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.017>.
- Bessaire, T., Perrin, I., Tarres, A., Bebius, A., Reding, F., Theurillat, V., 2019. Mycotoxins in green coffee: occurrence and risk assessment. *Food Contr.* 96, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.033>.
- Blanc, M., Pittet, A., Muñoz-Box, R., Viani, R., 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *J. Agric. Food Chem.* 46, 673–675. <https://doi.org/10.1021/jf9707703>.
- Broissin-Vargas, L.M., Snell-Castro, R., Godon, J.J., González-Ríos, O., Suárez-Quiroz, M. L., 2017. Impact of storage conditions on fungal community composition of green coffee beans *Coffea arabica* L. stored in jute sacks during one year. *J. Appl. Microbiol.* 124, 547–558. <https://doi.org/10.1111/jam.13656>.
- Castellanos-Onorio, O., Gonzalez-Rios, O., Guyot, B., Fontana, T.A., Guiraud, J.P., Schorr-Galindo, S., Durand, N., Suárez-Quiroza, M., 2011. Effect of two different

- roasting techniques on the ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea Arabica*). *Food Contr.* 22, 1184–1188. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.014>.
- Cho, A.S., Jeon, S.M., Kim, M.J., Yeo, J., Seo, K.I., Choi, M.S., Lee, M.K., 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem. Toxicol.* 48, 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.003>.
- de Fátima Rezende, E., Borges, J.G., Cirillo, M.Á., Prado, G., Paiva, L.C., Batista, L.R., 2013. Ochratoxigenic fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L.) in conventional and organic cultivation in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 44, 377–385. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200006>.
- European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available online: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881>. (Accessed 10 January 2018).
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sandino, F.G., Valle, A.M., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2014. Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. *Food Res. Int.* 61, 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.058>.
- Gottschalk, C., Biermaier, B., Gross, M., Schwaige, K., Gareis, M., 2016. Ochratoxin A in brewer's yeast used as food supplement. *Mycotoxin Res.* 32, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0230-x>.
- Heilmann, W., Rehfeldt, A.G., Rotzoll, F., 1999. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *Fur Food Res Technol* 209, 297–300. <https://doi.org/10.1007/s002170050497>.
- Jeszka-Skowron, M., Zgola-Grzeżkowiak, A., Waśkiewicz, A., Stępień, Ł., Stanisław, E., 2017. Positive and negative aspects of green coffee consumption - antioxidant activity versus mycotoxins. *J. Sci. Food Agric.* 97, 4022–4028. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8269>.
- Leong, S.L., Hien, L.T., An, T.V., Trang, N.T., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2007. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02189.x>.
- Lerda, D., Pelliccioni, P., Biagi, M., Scalone, G., Vallejos, R., Stout, M., Mezzano, J., Flanagan, C., Litterio, N., 2013. Roasting coffee beans (*Coffea arabica*) artificially contaminated with ochratoxin A strongly reduces the analytical ochratoxin A content but not the genotoxic effects. *Curr. Top. Toxicol.* 9, 75–80.
- Levi, C., 1980. Mycotoxins in coffee. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63, 1282–1285.
- Levi, C.P., Trenk, H.L., Mohr, H.K., 1974. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57, 866–870.
- Miraglia, M., Brera, C., 2002. Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States. Report of SCOOP Task 3.2.7. Available online: [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/task\\_3-2-7\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/task_3-2-7_en.pdf). (Accessed 10 January 2018).
- Mujahid, C., Savoy, M.C., Baslé, Q., Woo, P.M., Ee, E.C.Y., Mottier, P., Bessaire, T., 2020. Levels of *Alternaria* toxins in selected food commodities including green coffee. *Toxins* 12 (9), 595. <https://doi.org/10.3390/toxins12090595>.
- Munyendo, L.M., Koskei, R., Mburu, M., 2017. Molds and ochratoxin A associated with green coffee (*coffea arabica*) beans processed by dry and wet methods in nyeri county. *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* 11 (6), 66–72. <https://doi.org/10.9790/2402-1106016672>.
- Ochiai, R., Jokura, H., Suzuki, A., Tokimitsu, I., Ihishi, M., Komai, N., Rakugi, H., Ogihara, T., 2004. Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertens. Res.* 27, 731–737. <https://doi.org/10.1291/hyres.27.731>.
- Oliveira, G., da Silva, D.M., Pereira, R.G.F.A., Paiva, L.C., Prado, G., Batista, L.R., 2013. Effect of different roasting levels and particle sizes on ochratoxin A concentration in coffee beans. *Food Contr.* 34, 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.014>.
- Palacios-Cabrera, H.A., Menezes, H.C., Iamanaka, B.T., Canepa, F., Teixeira, A.A., Carvalhaes, N., Santi, D., Leme, P.T., Yotsuyanagi, K., Taniwaki, M.H., 2007. Effect of temperature and relative humidity during transportation on green coffee bean moisture content and ochratoxin A production. *J. Food Protect.* 70, 164–171. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.1.164>.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2005a. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. *J. Food Protect.* 68, 133–138. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35888.40965>.
- Pardo, E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2005b. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.003>.
- Polish Committee for Standardization, 1994. Polish Standard PN R-64791:1994. Animal Feeding Stuffs. Requirements and Microbiological Examinations. Polish Committee for Standardization, Warsaw.
- Polish Committee for Standardization, 1999. Polish Standard PN ISO 7954:1999. Microbiology. General Guidance for Enumeration of Yeasts and Molds. Colony Count Technique at 25 Degrees C. Polish Committee for Standardization, Warsaw.
- Polish Committee for Standardization, 2000. Polish Standard PN EN ISO 6887-1:2000. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination. Part 1. General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions. Polish Committee for Standardization, Warsaw.
- Solfrizzo, M., Piemontese, L., Gambacorta, L., Zivoli, R., Longobardi, F., 2015. Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3609–3614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00326>.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, C., 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxicol.* 33, 341–355. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)00150-M](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)00150-M).
- Suárez-Quiroz, M., De Louise, B., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., 2005. The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40, 605–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00958.x>.
- Taniwaki, M.H., Teixeira, A.A., Teixeira, A.R.R., Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., 2014. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Res. Int.* 61, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.032>.
- Thom, E., 2007. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *J. Int. Med. Res.* 35, 900–908. <https://doi.org/10.1177/147323000703500620>.
- Trucksess, M.W., Whitaker, T.B., Weaver, C.M., Slate, A., Giesbrecht, F.G., Rader, J.I., Betz, J.M., 2009. Sampling and analytical variability associated with the determination of total aflatoxins and ochratoxin A in powdered ginger sold as a dietary supplement in capsules. *J. Agric. Food Chem.* 57, 321–325. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2880-z>.
- Vaclavik, L., Vaclavikova, M., Begley, T.H., Krynsky, A.J., Rader, J.I., 2013. Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 61, 4822–4830. <https://doi.org/10.1021/jf401139u>.
- van Dijk, A.E., Olthof, M.R., Meuse, J.C., Seebus, E., Heine, R.J., van Dam, R.M., 2009. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care* 32, 1023–1025. <https://doi.org/10.2337/dc09-0207>.
- Vatinno, R., Aresta, A., Zamboni, C.G., Palmisano, F., 2008. Determination of ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1187, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.020>.



# Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure

Robert Kosicki<sup>a,\*</sup>, Joanna Buharowska-Donten<sup>b</sup>, Magdalena Twarużek<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Toxicology, Faculty of Biological Sciences, Kazimierz Wielki University, Chodkiewicza 30, Bydgoszcz, 85-064, Poland

<sup>b</sup> Medical Analysis Laboratory "ALCO", Magnuszewska 5, Bydgoszcz, 85-861, Poland

## ARTICLE INFO

Handling Editor: Raymond Norton

### Keywords:

Ochratoxin A  
Serum  
Dialysis patients  
Chronic renal failure  
HPLC

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by the fungi *Aspergillus* and *Penicillium*. It occurs naturally in many products of plant origin and in animals because of the carry-over from feed to meat or milk. Ochratoxin A has nephrotoxic, carcinogenic, hepatotoxic, neurotoxic, and genotoxic properties. Data on ochratoxin concentrations in blood or serum from patients with different kidney disorders are available for several European countries, as well as for Africa and Asia. In this study, we determined OTA concentrations in serum samples from chronic renal failure patients receiving dialysis and from healthy controls, collected in central Poland. Ochratoxin A was analyzed after extraction and purification using immunoaffinity columns by liquid chromatography with fluorescence detection (limit of quantification: 0.1 ng/mL) in 88 patients and 16 healthy volunteers. The dialysis group consisted of 40 women and 48 men aged between 23 and 85 years. The mean OTA concentrations were 0.75 ng/mL (maximum 2.78 ng/mL) in dialysis patients and 0.70 ng/mL (maximum 1.44 ng/mL) in healthy controls. The mean concentrations in patients treated by dialysis were 0.76 and 0.74 ng/ml for women and men, respectively (maximum 2.53 ng/ml for women and 2.78 ng/ml for men). Statistical analysis using Student's t-test showed no statistically significant differences between the control group (non-dialysis patients) and all dialysis patients.

## Abstract

### 1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. It was first detected in 1965 in maize infected with *Aspergillus ochraceus*. In 1969, OTA was isolated from *Penicillium verrucosum* (Malir et al., 2016).

OTA naturally occurs in various plant-based foods such as grains, corn, coffee, spices (e.g., pepper, dried paprika, ginger, coriander), and dried fruits (e.g., raisins, figs). It has also been detected in beer, wine, and grape juice (Jørgensen, 2005; Skarkova et al., 2013). In addition, OTA is present in foods of animal origin such as meat, milk, and eggs due to the consumption of contaminated feed by animals (Duarte et al., 2012). The European Union has established maximum allowable levels of OTA in food commodities, such as unprocessed cereals 5 µg/kg, all products derived from unprocessed cereals 3 µg/kg, dried vine fruits 10 µg/kg, roasted coffee beans and ground roasted coffee 5 µg/kg, soluble

coffee 10 µg/kg, wine and grape juice 2 µg/kg, pepper, nutmeg, ginger, turmeric 15 µg/kg, chili powder, cayenne, paprika 20 µg/kg, liquorice, liquorice root 20 µg/kg, cereal-based foods and foods for infants and young children 0.5 µg/kg (European Commission 2006, 2010, 2015).

OTA is a mycotoxin with nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic, hepatotoxic, embryotoxic, neurotoxic, immunotoxic, and genotoxic properties (Malir et al., 2013a) and has been classified as possibly carcinogenic (group 2 B carcinogen) in humans by The International Agency for Research on Cancer (IARC, 1993). It is absorbed relatively quickly in the upper part of the small intestine. In the body, OTA strongly binds to serum albumin, leading to a high serum half-life, and promotes bioaccumulation in the organs (Hagelberg et al., 1989; Grajewski et al., 2008). Only a small part of OTA remains unbound in rats and humans. In pigs, rats, and chickens, OTA is mainly transferred to the kidneys, and lower concentrations have been found in liver, muscle, and fat (Walker and Larsen, 2005). In a previous study, serum half-lives after oral administration of OTA were 72–120 h in pigs, 55–120 h in rats, and 24–39 h in mice; in one human volunteer, the half-life was about 35 days. Ochratoxin A is excreted into the bile and urine. In all tested

\* Corresponding author.

E-mail address: [robkos@ukw.edu.pl](mailto:robkos@ukw.edu.pl) (R. Kosicki).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2021.08.002>

Received 22 March 2021; Received in revised form 3 August 2021; Accepted 4 August 2021

Available online 8 August 2021

0041-0101/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



species, OTA undergoes hydrolysis (detoxification) to ochratoxin  $\alpha$ , mainly by the intestinal bacterial microflora (Walker and Larsen, 2005). In addition, OTA causes endemic nephropathy in pigs and is also suspected as one of the likely factors in the pathogenesis of Balkan endemic nephropathy (BEN) in humans (Krogh et al., 1977; Walker and Larsen, 2005). Kidney disease associated with the consumption of OTA-containing feed has also been observed in numerous other species, e.g., dogs, birds, rodents, and young ruminants (Reddy and Bhoola, 2010; Meucci et al., 2017).

There are numerous reports from many countries in the world describing high frequencies of human blood contamination by OTA, albeit at low levels, indicating widespread human exposure to this mycotoxin in Europe (Goliński and Grabarkiewicz-Szczęśna, 1985, 1989; Breitholz-Emmanuelson et al., 1994; Malir et al., 2001; Ozçelik et al., 2001; Thuvander et al., 2001; Dinis et al., 2007; Medina et al., 2010), Africa (Filali et al., 2002; Abid et al., 2003; Sangare-Tigori et al., 2006; Hmaissia Khelifa et al., 2012), and Asia (Aslam et al., 2005).

The determination of ochratoxin A in serum samples consists of three main steps: extraction, purification of the extract, and instrumental analysis. There are various extraction and purification procedures for the determination of ochratoxin A in serum; however, the most common ones are liquid-liquid extraction with chloroform, followed by purification on immunoaffinity columns and final determination by liquid chromatography with fluorescence detection (Petkova-Bocharova et al., 2003; Dinis et al., 2007; Medina et al., 2010; Muñoz et al., 2010; Zaied et al., 2011). The use of a sensitive HPLC method, coupled with tandem mass spectrometry, allows to simplify the extraction procedure (chloroform is replaced with acidified acetonitrile) and skip the extract purification step (which requires the use of expensive immunoaffinity columns) (Fan et al., 2019). A simple and efficient determination method of OTA and its thermal degradation product, 2'R-OTA, in human blood samples, based on the analysis of a dried blood spot, has been developed by Cramer et al. (2015). Compared to other currently used sample preparation methods for OTA determination in blood, the described one allows for the simultaneous and fast extraction of 40 or more samples; only a small amount of waste is generated, and halogenated solvents are omitted. Additionally, the use of the dried blood spot technique enables easy storage and shipment of the material for blood collection, facilitating the easy transport of samples from the blood donor to the analytical laboratory.

In the present work, to add new data to the previous studies conducted in Poland (Goliński and Grabarkiewicz-Szczęśna, 1985, 1989), series of human sera were collected from patients treated by dialysis and analyzed for their OTA content using a reliable and validated method combining an immunoaffinity clean-up procedure before high-performance liquid chromatography (HPLC) determination.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

The OTA standard was provided by Biopure (Tulln, Austria). All chemicals (acetonitrile, methanol, chloroform, acetic acid, and magnesium chloride) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water for analysis was purified by a Simplicity UV system from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Sample collection

In total, 104 samples were collected from 88 chronic renal failure patients receiving dialysis at a dialysis center in the central part of Poland. All patients had both kidneys, and renal replacement therapy lasted at least 5 years. The dialysis type was classic bicarbonate hemodialysis (i.e., the dialysis fluid is a bicarbonate solution); 16 healthy volunteers constituted the control group. All participants provided written informed consent prior to participation. Patient characteristics

such as age and sex were registered. The dialysis group consisted of 40 women and 48 men aged between 23 and 85 years. The patients were divided into three age groups: 23–44, 45–64, and 65–85 years. Blood samples (5 ml) were taken into heparinized tubes and centrifuged; the plasma separated and stored at  $-24^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. Data were also collected from a healthy population (16 subjects: 8 women and 8 men) aged between 24 and 73 years.

### 2.3. Extraction procedure

The measurements of OTA in plasma samples were based on the method by Bekker and Radić (1991). Briefly, 1 ml of serum was added to 5 ml of a mixture of 0.2 M magnesium chloride and 0.1 M hydrochloric acid (1:1) and mixed for 1 min. Subsequently, 3 ml of chloroform was added, and the mixture was shaken for 30 min and centrifuged at  $2500\times g$  for 20 min. The organic phase was evaporated to dryness at  $40^{\circ}\text{C}$ , and the dry extract was dissolved in 0.25 ml of methanol. Finally, the extract was cleaned in an immunoaffinity column prior to HPLC analysis.

### 2.4. Clean-up with the immunoaffinity column

To 0.25 ml of reconstituted extract, 2 ml of phosphate buffer were added. The whole extract was passed through the immunoaffinity column (IAC OchraPrep®, R-Biopharm Rhône Ltd., UK) at a flow rate of 1–2 drops/s. The column was then washed with 20 ml distilled water, and OTA was slowly eluted from the column with 1 ml of 2 % acetic acid in methanol and 1 ml of distilled water.

### 2.5. HPLC OTA quantification

For the quantitation of OTA, we used the LaChrom ELITE (Merck-Hitachi) HPLC system (pump: L-2130, autosampler: L-2200, column oven: L-2300, FLD: L-2480).

Separation was carried out using LiChroCART 250-4, LiChospher 100 RP-18 ( $5\ \mu\text{m}$ ) columns. For this,  $50\ \mu\text{l}$  of the extract was injected into the column at a flow rate of 1 ml/min. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile/2 % acetic acid (70:30, v/v), and OTA was detected at 330 and 460 nm wavelengths for excitation and emission, respectively. The retention time of OTA under these conditions was approximately 3.5 min (Fig. 1). The analytical method was validated according to European Medicines Agency guideline (EMA, 2011). The OTA quantification was performed by comparing the sample peak areas to the calibration curve containing six points in the working range (Table 1). Standard solutions were prepared freshly before each measurement day. Recovery rates and precision of the method, expressed as repeatability (% RSD), were determined by analyzing OTA-free serum samples spiked with three levels of analyte concentrations. Three independent replicates were prepared and analyzed for each concentration. The detection and quantification limits were calculated as the signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively.

### 2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 13.3 software program (StatSoft, Poland). The differences in OTA levels among the different groups were verified with Student's t-test and Fisher's NIR test at the  $p \leq 0.05$  level of significance.

## 3. Results

The mean concentration of OTA in the blood serum of a healthy person was 0.72 ng/ml for women and 0.69 ng/ml for men (Table 2). The mean concentration in patients treated by dialysis was 0.76 and 0.74 ng/ml for women and men, respectively (with a range  $< 0.1$ –2.53 ng/ml for women and  $< 0.1$ –2.78 ng/ml for men).

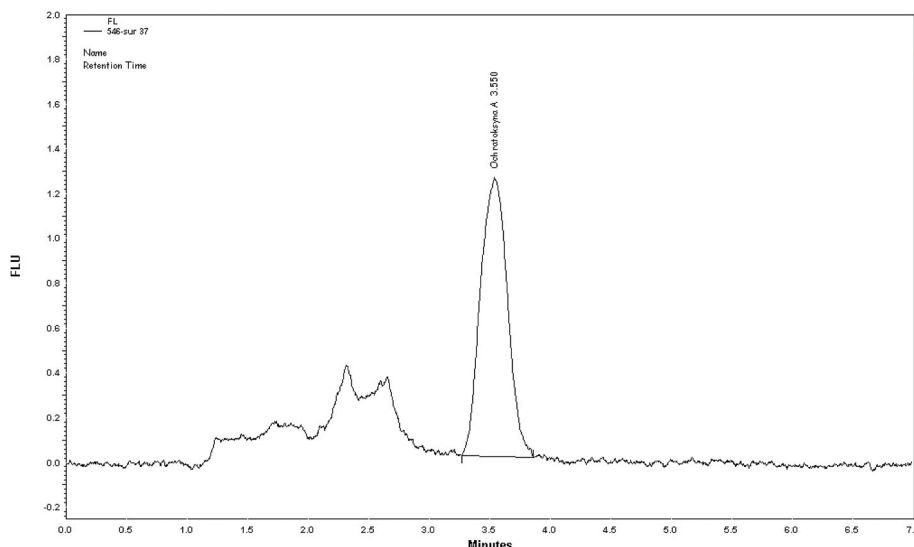


Fig. 1. HPLC-FLD chromatogram of a serum sample containing OTA at a concentration of 2.3 ng/ml.

**Table 1**  
Validation parameters for HPLC-FLD method of OTA in serum samples.

Parameters	
LOD (ng/ml)	0.03
LOQ (ng/ml)	0.10
Regression coefficient ( $r^2$ )	0.997
Working range (ng/ml)	0.10–5.0
Recovery (%), n = 3	
0.2 ng/ml	93.3 ± 2.7
0.5 ng/ml	95.2 ± 1.1
2.0 ng/ml	96.5 ± 1.4
Average recovery (%), n = 9	95.0 ± 2.2

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; results of recovery rate are reported with their calculated RSD values.

**Table 2**  
Mean OTA levels in serum samples.

	Mean (±SEM)				
	Control group	All patients	65–85 years	45–64 years	23–44 years
Women	0.72 ± 0.13	0.76 ± 0.10	0.89 ± 0.16	0.64 ± 0.12	0.80 ± 0.32
Men	0.69 ± 0.16	0.74 ± 0.11	0.59 ± 0.18	0.86 ± 0.21	0.69 ± 0.16

**Table 3**  
Percentage of dialyzed patients according to the OTA ranges found in serum samples.

	OTA ranges ng/ml	Control group		All patients		65–85 years		45–64 years		23–44 years	
		n	%	N	%	n	%	n	%	n	%
Women	<LOQ	0	0.0	4	10.0	0	0.0	2	11.1	2	25.0
	0.11–0.50	4	50.0	16	40.0	6	42.9	8	44.4	2	25.0
	0.51–1.00	2	25.0	10	25.0	3	21.4	5	27.8	2	25.0
	>1.01	2	25.0	10	25.0	5	35.7	3	16.7	2	25.0
Men	<LOQ	2	25.0	9	18.7	1	12.5	4	21.1	4	19.0
	0.11–0.50	0	0.0	20	41.7	4	50.0	6	31.5	10	47.6
	0.51–1.00	4	50.0	8	16.7	2	25.0	4	21.1	2	9.6
	>1.01	2	25.0	11	22.9	1	12.5	5	26.3	5	23.8

LOQ, limit of quantification: 0.10 ng/ml.

The highest mean concentrations of OTA were recorded in the age ranges of 65–85 years for women (0.89 ng/ml) and of 45–64 years for men (0.86 ng/ml).

Statistical analysis using Student’s t-test showed no statistically significant differences between the control group (non-dialysis patients) and all dialysis patients, both for women ( $p = 0.87$ ) and for men ( $p = 0.84$ ). There were no statistically significant differences using Fisher’s NIR test, also when comparing the control group and individual age groups, with  $p = 0.70$  and  $p = 0.82$  for women and for men, respectively. In most of the analyzed samples in all age groups, the level of OTA ranged from 0.11 to 0.5 ng/ml (Table 3).

#### 4. Discussion

In the fields of toxicology and mycology, the recent years have brought a series of studies on the levels of OTA not only in products of plant origin, but also in the organs of animals and humans as well as their serum, milk, and urine.

Studies conducted in various regions of the world prove that OTA is present in the majority of serum samples collected for analysis. In Poland, Goliński and Grabarkiewicz-Szczęśna (1989) analyzed 1065 serum samples for OTA and detected it in 7 % of the samples, with mean and maximum concentrations of 0.27 and 40.0 ng/ml, respectively. Similarly, Filali et al. (2002) analyzed serum samples collected from 309 healthy individuals (213 men and 96 women) and obtained nearly 60 % positive results for the presence of OTA. In their study, 61 % of men and 56 % of women had a mean OTA level of 0.29 ng/ml in the serum, and the highest concentration was 6.59 ng/ml. Similar studies have been conducted in Scandinavia, where Thuvander et al. (2001) tested 406

healthy volunteers and detected a mean OTA plasma level of 0.19 ng/ml. However, the authors found no correlation between plasma OTA levels and the total amount of food consumed and between OTA levels and the estimated total dietary intake of OTA (however, a strong correlation was noticed for women in relation to the consumption of beer or medium-brown bread). In Spain, [Medina et al. \(2010\)](#) determined OTA levels in 168 blood donors from the Valencian Community; OTA was found in all samples at a mean concentration of 1.09 ng/ml (maximum value 5.71 ng/ml). In 2013, [Malir et al. \(2013b\)](#) analyzed blood serum samples of pregnant women in the Czech Republic; OTA was present in 96 serum samples out of 100 analyzed, with a mean value of 0.15 ng/ml and a maximum value of 0.35 ng/ml. These results confirm the common presence of OTA in human blood serum. In this study, the contamination levels of OTA in serum samples were higher than those reported by other researchers ([Thuvander et al., 2001](#); [Filali et al., 2002](#); [Malir et al., 2013b](#)) and lower than the results obtained by [Medina et al. \(2010\)](#).

OTA is suspected as one of the factors that lead to various kidney diseases, such as chronic renal failure and Balkan endemic nephropathy. In numerous studies, OTA in blood serum has been used as a biomarker of exposure to OTA. For example, [Breitholtz-Emanuelsson et al. \(1994\)](#) analyzed 65 serum samples of healthy people and 68 serum samples from people with different kidney disorders (transplant patients, patients with chronic glomerulonephritis, patients with renal calculus, or cyst patients with chronic renal failure and patients treated by dialysis) in southern Italy. The mean concentration of OTA in healthy people was 0.53 ng/ml (with a maximum of 2.0 ng/ml), and the mean OTA level in patients treated by dialysis was 1.4 ng/ml (maximum value of 14.0 ng/ml). The mean concentrations of OTA in the serum of patients with different kidney disorders were similar to those of healthy peoples (0.47–0.60 ng/ml). In another study in Isparta, Turkey, serum OTA levels in patients suffering from different urinary disorders were analyzed ([Ozçelik et al., 2001](#)). The authors detected OTA in serum samples of 40 healthy people and of 93 patients with different kinds of urinary disorders (chronic renal failure treated by hemodialysis, chronic renal failure treated by peritoneal dialysis, patients with bladder cancer, and patients with renal stones). The mean concentrations of OTA in the serum of patients treated by hemodialysis (2.1 ng/ml) were higher compared to those of the control group (0.44 ng/ml). The authors also found significant differences in the mean concentrations among the groups of patients treated by dialysis and those with renal stones or bladder cancer. A higher OTA concentration in dialysis patients compared to the control and other groups with kidney diseases might be connected with the reduced glomerular filtration rate of patients under dialysis treatment. In the Czech Republic, OTA levels in the serum from five dialyzed patients were analyzed. Before and after dialysis, the OTA concentration ranges were similar (0.5–3.6 ng/ml). It is worth noting that the authors did not find OTA in the dialysate ([Malir et al., 2001](#)). In Portugal, [Dinis et al. \(2007\)](#) analyzed OTA levels in the serum of 95 patients undergoing hemodialysis in the cities of Coimbra and Aveiro; OTA was found in all serum samples, with mean and maximum values of 0.50 and 1.52 ng/ml, respectively. The authors found no significant differences between Coimbra and Aveiro populations and between the sexes of patients ([Dinis et al., 2007](#)). In Poland, [Grajewski et al. \(2007\)](#) analyzed OTA in the serum from 20 patients after nephrectomy and from 6 healthy volunteers. The mean OTA concentrations were 0.94 ng/ml (maximum 2.27 ng/ml) and 1.06 ng/ml (maximum 3.77 ng/ml) for women and men subjected to nephrectomy, respectively. The mean OTA concentration in the healthy volunteer group was 0.37 ng/ml.

In 2003, [Abid et al.](#) presented the results of a four-part 10-year study on the levels of OTA in the blood of healthy people and people suffering from various kidney diseases in Tunisia. In the first part of the research, blood samples from 25 healthy people and from 244 patients with different kidney diseases (chronic interstitial nephropathy, chronic glomerular nephropathy, and chronic vascular nephropathy) were analyzed. Ochratoxin A was found in 95 % of the samples from people suffering from chronic interstitial nephropathy (mean 52.7 ng/ml,

maximum 62.8 ng/ml) and in 87 % of the samples from patients suffering from other nephropathies (mean 6.75 ng/ml, maximum 8.3 ng/ml). The mean OTA level in the healthy control group (3.35 ng/ml) was lower compared to that of patients suffering from nephropathies. In the second part of the research in 1994, OTA was determined in blood samples of the healthy control group (140 subjects) and in hemodialysis patients with different etiologies (610 subjects). Statistically significant differences were found in the mean OTA concentration between people suffering from chronic interstitial nephropathy (mean 55.6 ng/ml, maximum 62.0 ng/ml) and people diagnosed with other kinds of nephropathy (mean 12.6 ng/ml, maximum 18.0 ng/ml). In the control group, OTA concentrations were significantly lower compared to those in people suffering from nephropathies (mean and maximum levels of 2.25 and 2.8 ng/ml, respectively). In the third part of the research, OTA was analyzed in blood samples from 20 patients with chronic interstitial nephropathy, in 40 patients with other kidney diseases, and in 20 healthy people. The highest mean OTA concentration was obtained in the group of patients with chronic interstitial nephropathy (44.4 ng/ml). In the group of people with other kidney diseases and in the control group, the mean blood OTA level was lower (8.11 and 2.6 ng/ml, respectively). In the last part of the research in 2000, 20 blood samples each from patients with chronic interstitial nephropathy of unknown etiology, patients with chronic interstitial nephropathy of known etiology, and healthy people were analyzed. In the control group, the mean OTA concentration was 1.22 ng/ml (62 % positive samples), whereas in the nephropathy group, the mean levels were 50.4 ng/ml (100 % positive samples) and 8.2 ng/ml (78 % positive samples), respectively, for chronic interstitial nephropathy of unknown etiology and chronic interstitial nephropathy of known etiology. The authors concluded that ochratoxin-related nephropathy in Tunisia shows characteristics similar to BEN and may be endemic (OTA has regularly been detected in Tunisia since 1983; the climatic and geographic, social, and economic conditions are favorable; diet is the main source of human contamination by OTA).

In another study in Tunisia, [Hmaissia Khelifa et al. \(2012\)](#) analyzed 68 serum samples (44 from healthy subjects and 24 from patients with chronic interstitial nephropathy of unknown etiology). Serum OTA in patients was found in 87 % of the samples, with mean and maximum values of 9.28 and 33.8 ng/ml, respectively. In the case of healthy people, OTA was present in 52 % of the samples, with mean and maximum values of 0.77 and 6.1 ng/ml, respectively. In another study from Abidjan, Ivory Coast, [Sangare-Tigori et al. \(2006\)](#) analyzed blood samples from 63 healthy volunteers and 39 patients suffering from renal disease and undergoing dialysis. The authors found OTA in 35 % of the samples from healthy people, with mean and maximum concentrations of 0.83 and 5.81 ng/ml, respectively, whereas among patients suffering renal disease and undergoing dialysis, OTA was detected in 21 % of the samples, with mean and maximum concentrations of 1.05 and 2.42 ng/ml, respectively. Statistical analysis of the total population (with  $p = 0.05$ ) showed no connection between the presence of OTA and factors such as dialysis, sex, or age. Considering only the positive results, the authors found that dialysis or age were connected with the blood OTA level.

In 2005, [Aslam et al.](#) examined the blood of 96 patients with bladder cancer and 31 controls from Karachi, Pakistan. The mean OTA concentrations were 0.33 ng/ml (maximum 3.41 ng/ml) in bladder cancer patients and 0.31 ng/ml (maximum 1.24 ng/ml) in healthy people. According to the authors, OTA is unlikely to play a significant role in the etiology of bladder cancer in the Karachi region.

In this study, we found no significant differences in serum OTA concentration between females and males. The results are consistent with those carried out in Sweden and Norway ([Thuvander et al., 2001](#)), Marocco ([Filali et al., 2002](#)), Portugal ([Dinis et al., 2007](#)), and Spain ([Medina et al., 2010](#)). Based on these studies, when the OTA levels in serum were sex-related, in most cases, slightly higher values were observed in the male population, which may have been caused by the

consumption of more OTA-containing products (e.g., alcoholic beverages). Similar to our findings, no correlation was found between age and OTA levels in serum in studies carried out by Medina et al. (2010). Statistically significant differences were found between the concentration of OTA in serum and different kidney diseases, such as nephropathy of unknown etiology, chronic glomerular nephropathy, or chronic vascular nephropathy, as observed by Abid et al. (2003), Sangare-Tigori et al. (2006), and Hmaissia Khelifa et al. (2012). In some African countries, OTA-related nephropathy, due to climatic, social, and economic conditions, as well as diet, bears characteristics similar to those of the BEN. More ambiguous results concern OTA in serum and patients on dialysis. The lack of significant differences between concentrations of OTA in serum in dialysis patients and in healthy patients is in accordance with the results obtained in Portugal by Dinis et al. (2007). The stable levels of OTA in the serum of patients may be due to the fact that OTA is dialyzed from the plasma to the dialysis solution. This indicates that hemodialysis patients were exposed to contaminated food before sampling or were frequently exposed to OTA because of specific diets due to their nephropathy; alternatively, normal renal elimination of glucuronidated metabolites might have been blocked. In other studies, performed by Breitholtz-Emanuelsson et al. (1994) and Ozçelik et al. (2001), the authors observed differences in OTA serum levels between dialysis patients and healthy persons, which was explained by the reduced glomerular filtration rate.

The results presented by the authors concerning the occurrence of OTA are closely related to the methods of sample preparation and subsequent analysis, which affect the values of the limits of detection and quantification. Some of the presented articles do not contain any threshold values (Goliński and Grabarkiewicz-Szczęśna, 1989; Abid et al., 2003; Sangare-Tigori et al., 2006). The LOD values varied between 0.2 ng/ml, using the measurement of fluorescence spectra obtained by Ozçelik et al. (2001), and 0.01 ng/ml, using HPLC-FLD methods described by Thuvander et al. (2001) and Medina et al. (2010). Because of this broad range of detection limits, comparisons cannot be made in terms of the percentage of positives (higher rate of % positives for methods with low LOD values and lower rate of % positives for methods with higher LOD values), and a better approach seems to be the use of concentration ranges.

The results obtained here confirm exposure of the Polish population to OTA. The mean OTA levels in the investigated chronic renal failure patients receiving dialysis as well as in the healthy volunteers were comparable to those observed in other European countries (except the Balkan countries, where BAN occurs). We found no statistically significant differences between the control group (non-dialysis patients) and all dialysis patients, both for women and for men. There were also no statistically significant differences when comparing the control group and individual age groups.

Our mean OTA concentrations were slightly higher than those presented earlier by Goliński and Grabarkiewicz-Szczęśna (1989) for the Polish population. In the presented study, the samples show only human exposure to OTA over a limited period, even though the expected half-life of OTA in humans is relatively long, and it cannot be determined whether OTA is involved in the development of kidney disease. Kidney disease develops over a long period, and therefore, the OTA concentration in serum samples must be monitored in the long term to assess the role of OTA in human renal pathology.

#### Credit author statement

Robert Kosicki: Conceptualisation, Writing—original draft preparation, Methodology, Performing the analysis, Resources, Data curation, Visualisation. Joanna Buharowska-Donten: Performing the analysis, Resources. Magdalena Twarużek: Conceptualisation, Writing—review and editing, Funding Acquisition, Project administration, Supervision.

#### Ethical statement

This manuscript has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere. Publication of this manuscript is approved by all authors.

#### Funding

This study was supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, under the program “Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022 (Grant No. 008/RID/2018/19).

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### References

- Abid, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maaroufi, K., Ellouz, F., Creppy, E., Bacha, H., 2003. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Hum. Exp. Toxicol.* 22 (2), 77–84.
- Aslam, M., Beg, A.E., Blaszkevicz, M., Degen, G.H., Golka, K., 2005. Ochratoxin A blood concentration in healthy subjects and bladder cancer cases from Pakistan. *Mycotoxin Res.* 21 (3), 164–167.
- Beker, D., Radić, B., 1991. Fast determination of ochratoxin A in serum by liquid chromatography: comparison with enzymic spectrofluorimetric method. *J. Chromatogr.* 570 (2), 441–445.
- Breitholtz-Emanuelsson, A., Minervini, F., Hult, K., Visconti, A., 1994. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Nat. Toxins* 2, 366–370.
- Cramer, B., Osteresch, B., Muñoz, K., Hillmann, H., Sibrowski, W., Humpf, H.U., 2015. Biomonitoring using dried blood spots: detection of ochratoxin A and its degradation product 2'R-ochratoxin A in blood from coffee drinkers. *Mol. Nutr. Food Res.* 59 (9), 1837–1843.
- Dinis, A.M.P., Lino, C.M., Pena, A.S., 2007. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 44 (2), 553–557.
- Duarte, S.C., Lino, C.M., Pena, A., 2012. Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *Vet. J.* 192, 286–292.
- EMA, 2011. European Medicines Agency - Guideline on Bioanalytical Method Validation (London).
- European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *O J Eur Union.* L364/5-L364/24.
- European Commission, 2015. Commission regulation (eu) 2015/1137 of 13 July 2015 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum level of ochratoxin A in capsicum spp. spices. *O J Eur Union.* L185/11-L185/12.
- European Commission, 2010. Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *O J Eur Union.* L35/7-L35/8.
- Fan, K., Xu, J.J., Jiang, K.Q., Liu, X., Meng, J.J., Di Mavungu, J.D., Guo, W.B., Zhang, Z. Q., Jing, J., Li, H.R., Yao, B., Li, H., Zhao, Z.H., Han, Z., 2019. Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China. *Environ. Pollut.* 248, 865–873.
- Filali, A., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Benayada, A., Souleymani, R., Creppy, E.E., 2002. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 241–245.
- Goliński, P., Grabarkiewicz-Szczęśna, J., 1985. The first in Poland cases of detection of ochratoxin A residues in human blood. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 36, 378–381 ([in Polish]).
- Goliński, P., Grabarkiewicz-Szczęśna, J., 1989. A trial of determination of the daily dose of ochratoxin A consumed by humans in Poland. *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 40, 50–52 ([in Polish]).
- Grajewski, J., Jarzemeski, P., Twarużek, M., Kuźmińska, K., Trępała, M., 2007. The level of ochratoxin A in patients after nephrectomy. *Mycotoxin Res.* 23 (1), 22–26.
- Grajewski, J., Moraczewska, J., Fogt, K., Twarużek, M., 2008. Capacity of blood albumins to bind ochratoxin A and roridin A. *Med. Weter.* 64 (5), 650–653.
- Hagelberg, S., Hult, K., Fuchs, R., 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appl. Toxicol.* 9, 91–96.
- Hmaissia Khelifa, K., Ghali, R., Mazigh, C., Aouni, Z., Machgoul, S., A Hedhili, A., 2012. Ochratoxin A levels in human serum and foods from nephropathy patients in Tunisia: where are you now? *Exp. Toxicol. Pathol.* 64 (5), 509–512.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Int Agen Res Cancer, Lyon, France* 56, 489.
- Jørgensen, K., 2005. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food—a review of EU occurrence data. *Food Addit. Contam.* 51, 26–30.

- Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceović, S., 1977. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B* 85 (3), 238–240.
- Malir, F., Ostry, V., Dofkova, M., Roubal, T., Dvorak, V., Dohnal, V., 2013b. Ochratoxin A levels in blood serum of Czech women in the first trimester of pregnancy and its correspondence with dietary intake of the mycotoxin contaminant. *Biomarkers* 18, 673–678.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., Toman, J., 2016. Ochratoxin A: 50 Years of research. *Toxins* 8 (7), 191.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Novotna, E., 2013a. Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity-An overview. *Birth Defects Res B* 98, 493–502.
- Malir, F., Severa, J., Roubal, T., Kacerovsky, J., Fixa, P., Moucka, P., Zahradnik, J., Knizek, J., Österreicher, J., Brndiar, M., Cerna, M., 2001. The dialysis of Ochratoxin A (OTA). *Mycotoxin Res.* 17, 129–131.
- Medina, Á., Mateo, E., Roig, R., Blanquer, A., Jiménez, M., 2010. Ochratoxin A levels in the plasma of healthy blood donors from Valencia and estimation of exposure degree: comparison with previous national Spanish data. *Food Addit. Contam.* 27, 1273–1284.
- Meucci, V., Luci, G., Vanni, M., Guidi, G., Perondi, F., Intorre, L., 2017. Serum levels of ochratoxin A in dogs with chronic kidney disease (CKD): a retrospective study. *J. Vet. Med. Sci.* 79 (2), 440–447.
- Muñoz, K., Blaszkewicz, M., Degen, G., 2010. Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878 (27), 2623–2629.
- Özçelik, N., Koşar, A., Soysal, D., 2001. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy Individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol. Lett.* 121, 9–13.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Garren, L., Grosso, F., Nikolov, I., Vrabcheva, T., Dragacci, S., Chernozemsky, I.N., 2003. Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan Endemic Nephropathy: a one month follow up study. *Med. Biol.* 10 (2), 62–68.
- Reddy, L., Bhoola, K., 2010. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. *Toxins* 2 (4), 771–779.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J.H., Dano, D.S., Betbeder, A.M., Achour, A., Creppy, E.E., 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Toxicol* 47 (8), 894–900.
- Skarkova, J., Ostry, V., Malir, F., Roubal, T., 2013. The determination of ultra-trace amounts of ochratoxin A in foodstuffs by HPLC method. *Anal. Lett.* 1–26.
- Thuvander, A., Paulsen, J.E., Axberg, K., Johansson, N., Videnes, A., Enghardt-Barbieri, H., Tryg, K., Lund-Larsen, K., Jahrl, S., Widenfalk, A., Bosnes, V., Alexander, J., Hult, K., Olsen, M., 2001. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1145–1151.
- Walker, R., Larsen, J.C., 2005. Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Addit. Contam.* 22 (Suppl. 1), 6–9.
- Zaied, C., Bouaziz, C., Azizi, I., Bensassi, F., Chour, A., Bacha, H., Abid, S., 2011. Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (7–8), 613–618.

## Oświadczenia współautorów prac naukowych wchodzących w skład cyklu

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Robert Kosicki

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. Anim Feed Sci Technol. 2016; 215:165-180.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 60 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, dokonaniu przeglądu literaturowego, walidacji metody analitycznej, przygotowaniu próbek do analizy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej z detekcją tandemowej spektrometrii mas i fluorescencyjną, zaplanowaniu i wykonaniu interpretacji uzyskanych danych, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, korespondowaniu z redaktorem czasopisma oraz recenzentami, redakcji całości pracy.



Mgr Robert Kosicki

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr Anna Błajet-Kosicka

Katedra Kosmetologii

Akademia Nauk Stosowanych im. Stanisława Staszica w Pile

### OŚWIADCZENIE

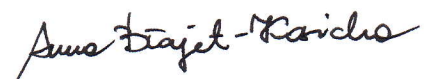
W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. Anim Feed Sci Technol. 2016; 215:165-180.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 20 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, zaplanowanie i wykonanie analiz instrumentalnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

Dr Anna Błajet-Kosicka





Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

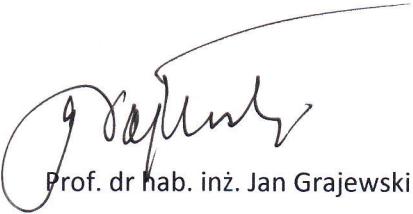
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. Anim Feed Sci Technol. 2016; 215:165-180.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

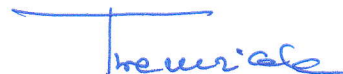
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Błajet-Kosicka A, Grajewski J, Twarużek M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. Anim Feed Sci Technol. 2016; 215:165-180.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, zdobyciu środków finansowych i administrowaniu projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Robert Kosicki

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Dopierała P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). *Toxins (Basel)*. 2020; 12(6):423.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 50 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, dokonaniu przeglądu literaturowego, walidacji metody analitycznej, przygotowaniu próbek do analizy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej z detekcją tandemowej spektrometrii mas i fluorescencyjną, zaplanowaniu i wykonaniu interpretacji uzyskanych danych, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, korespondowaniu z redaktorem czasopisma oraz recenzentami, redakcji całości pracy.



Mgr Robert Kosicki

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

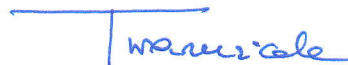
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Dopierała P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). *Toxins (Basel)*. 2020; 12(6):423.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 20 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, zdobyciu środków finansowych i administrowaniu projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr inż. Paweł Dopierała  
Dyrektor Hodowli Roślin  
KWS Lochow Polska Sp. z o.o.

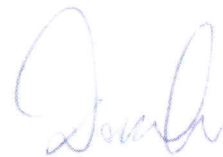
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Dopierała P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). Toxins (Basel). 2020; 12(6):423.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia i zebraniu próbek.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr inż. Paweł Dopierała

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Bartosz Rudzki  
Product Manager Żyto Hybrydowe  
KWS Lochow Polska Sp. z o.o.

### OŚWIADCZENIE

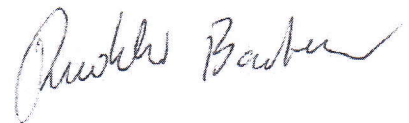
W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Dopierala P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). Toxins (Basel). 2020; 12(6):423.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: administrowaniu projektem i zebraniu próbek.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

mgr Bartosz Rudzki



Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

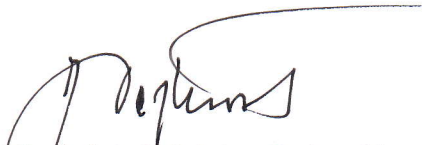
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Dopierała P, Rudzki B, Grajewski J. Occurrence of Mycotoxins in Winter Rye Varieties Cultivated in Poland (2017-2019). *Toxins (Basel)*. 2020; 12(6):423.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: redakcji pracy, nadzorze i administrowaniu projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Robert Kosicki

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Kannenberg K, Grajewski J. Contamination of Acorns of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.), as Feed Material, by Moulds and Mycotoxins. *Ann Anim Sci.* 2021; 21(3):977-990.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 70 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, dokonaniu przeglądu literaturowego, walidacji metody analitycznej, przygotowaniu próbek do analizy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej z detekcją tandemowej spektrometrii mas, zaplanowaniu i wykonaniu interpretacji uzyskanych danych, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, korespondowaniu z redaktorem czasopisma oraz recenzentami, redakcji całości pracy.

  
Mgr Robert Kosicki



Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Kannenberg K, Grajewski J. Contamination of Acorns of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.), as Feed Material, by Moulds and Mycotoxins. *Ann Anim Sci.* 2021; 21(3):977-990.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, wykonaniu analiz mikologicznych oraz testu MTT, zdobyciu środków finansowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Krystyna Kannenberg

Wyższa Szkoła Zarządzania Środowiskiem w Tucholi

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Kannenberg K, Grajewski J. Contamination of Acorns of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.), as Feed Material, by Moulds and Mycotoxins. *Ann Anim Sci.* 2021; 21(3):977-990.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia i zebraniu próbek.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

Mgr Krystyna Kannenberg



Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

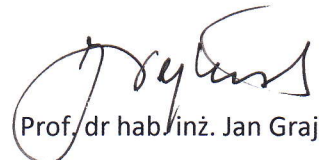
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Twarużek M, Kannenberg K, Grajewski J. Contamination of Acorns of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.), as Feed Material, by Moulds and Mycotoxins. *Ann Anim Sci.* 2021; 21(3):977-990.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, nadzorem nad projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

  
Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

Bydgoszcz, 16.05.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

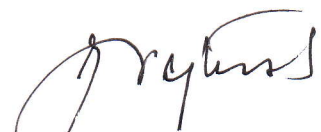
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Grajewski J, Kosicki R, Twarużek M, Błajet-Kosicka A. Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(5):254.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 20 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, zdobyciu środków finansowych i nadzorem nad projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Robert Kosicki

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Grajewski J, Kosicki R, Twarużek M, Błajet-Kosicka A. Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(5):254.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 50 % i polegał na: dokonaniu przeglądu literaturowego, walidacji metody analitycznej, zebraniu i przygotowaniu próbek do analizy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej z detekcją tandemowej spektrometrii mas i fluorescencyjną, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji.



Mgr Robert Kosicki

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Grajewski J, Kosicki R, Twarużek M, Błajet-Kosicka A. Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(5):254.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: zebraniu próbek, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji i zdobyciu środków finansowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr Anna Błajet-Kosicka

Katedra Kosmetologii

Akademia Nauk Stosowanych im. Stanisława Staszica w Pile

### OŚWIADCZENIE


W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Grajewski J, Kosicki R, Twarużek M, Błajet-Kosicka A. Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins through Polish Beer Consumption. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(5):254.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 20 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, zdobyciu środków finansowych, zebraniu próbek, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji i korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

Dr Anna Błajet-Kosicka



Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Twarużek M, Kosicki R, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Ałtyn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon*. 2020; 188:172-177.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 20 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, zdobyciu środków finansowych i administrowaniu projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni



Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Robert Kosicki

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Twarużek M, Kosicki R, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Ałtyn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicol.* 2020; 188:172-177.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 50 % i polegał na: dokonaniu przeglądu literaturowego, walidacji metody analitycznej, zebraniu i przygotowaniu próbek do analizy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji.



Mgr Robert Kosicki

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Justyna Kwiatkowska-Giżyńska  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Twarużek M, Kosicki R, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Altn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon*. 2020; 188:172-177.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: wykonaniu analiz mikologicznych i uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

*Kwiatkowska - Giżyńska J.*

Mgr Justyna Kwiatkowska-Giżyńska

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

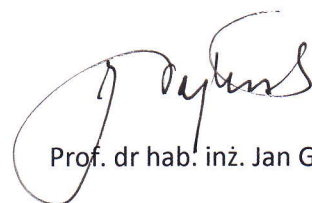
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Twarużek M, Kosicki R, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Ałtyn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon*. 2020; 188:172-177.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia i uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Iwona Ałtyn

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Twarużek M, Kosicki R, Kwiatkowska-Giżyńska J, Grajewski J, Ałtyn I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. *Toxicon*. 2020; 188:172-177.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: zestawieniu wyników, przygotowaniu rysunków i uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Mgr Iwona Ałtyn

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Robert Kosicki

Katedra Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Buharowska-Donten J, Twarużek M. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. *Toxicon*. 2021; 200:183-188.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 70 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, dokonaniu przeglądu literaturowego, walidacji metody analitycznej, przygotowaniu próbek do analizy, zaplanowaniu i wykonaniu analiz instrumentalnych przy wykorzystaniu techniki chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną, zaplanowaniu i wykonaniu interpretacji uzyskanych danych, napisaniu wstępnej wersji publikacji, korespondowaniu z redaktorem czasopisma oraz recenzentami, redakcji całości pracy.



Mgr Robert Kosicki

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Mgr Joanna Buharowska-Donten

Laboratorium Analiz Lekarskich "ALCO" Bydgoszcz

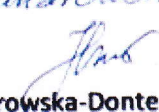
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Buharowska-Donten J, Twarużek M. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. *Toxicon*. 2021; 200:183-188.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 20 % i polegał na: zebraniu i przygotowaniu próbek do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.

*Joanna Buharowska-Donten*  


Mgr Joanna Buharowska-Donten

Bydgoszcz, 6.06.2022 r.

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni  
Katedra Fizjologii i Toksykologii  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

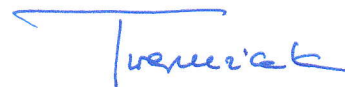
### OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr Roberta Kosickiego o stopień doktora nauk biologicznych oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

Kosicki R, Buharowska-Donten J, Twarużek M. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. *Toxicon*. 2021; 200:183-188.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 10 % i polegał na: opracowaniu koncepcji doświadczenia, uczestniczeniu w przygotowaniu publikacji, zdobyciu środków finansowych i administrowaniu projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę, aby wymieniona praca została wykorzystana w przewodzie doktorskim mgr Roberta Kosickiego.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni