



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV)

Effekten av toxinbindare i syfte att minska upptag och metabolism av deoxynivalenol

Elina Toss Ekmyr

Examensarbete för kandidatexamen, 15 hp

Agronomprogrammet – Husdjur

Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens utfodring och vård, 636

Uppsala 2018

Effekten av toxinbindare i syfte att minska upptag och metabolism av deoxynivalenol

The effect of toxin binders in order to reduce absorption and metabolism of deoxynivalenol

Elina Toss Ekmyr

Handledare: Erik Nordkvist, SVA, Avdelningen för kemi, miljö och fodersäkerhet

Examinator: Torbjörn Lundh, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård (HUV)

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Agronomprogrammet - Husdjur

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn, delnr: Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Institutionen för Husdjurens utfodring och vård, 636

Nyckelord: deoxynivalenol, DON, mykotoxinbindare, adsorberande, biotransformerande, toxinbindare, fodertillsats

Keywords: deoxynivalenol, DON, mycotoxin binder, adsorbing, biotransforming, toxin binder, feed additive

Sammanfattning

Mykotoxiner är sekundära metaboliter som produceras av mögelsvampar. Deoxynivalenol (DON) är ett vanligt förekommande mykotoxin i spannmål. Grisar kan visa symptom på kronisk toxikos vid nivåer under rekommenderade maxvärden. Bra odlingsrutiner i förebyggande syfte är inte alltid tillräckligt för att förhindra tillväxten av DON.

DON tillhör gruppen trichotecener, vilka karaktäriseras av en epoxigrupp på C-12,13. Reduktion av epoxi-gruppen har visat sig ge en metabolit med betydligt lägre toxicitet. Olika djurarter metaboliserar DON på olika sätt.

År 2009 godkändes en ny grupp av fodertillsatser i EU som omfattar ”Ämnen avsedda att minska mykotoxinkontaminationen i foder...”. Effekten av dessa preparat är omdiskuterad. Syftet med denna litteraturstudie är att studera effekten av toxinbindare med avseende på DON.

Det finns två grupper av toxinbindare; adsorberande och biotransformerande. Adsorberande ämnen har visat sig ineffektiva med avseende på DON. Biotransformerande ämnen innebär att mikroorganismers förmåga att bryta ner mykotoxiner utnyttjas. Bakterier med denna förmåga har isolerats ur våmvätska, tarmflora från höns och ur jord. I dagsläget finns bara en kommersiell fodertillsats som med hjälp av en bakteriekultur metaboliserar DON innan det absorberas i tunntarmen. Studier där produkten har testats visar på motsägelsefulla resultat, men inget försök har med hög säkerhet kunna visa att produkten har effekt.

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites that are produced by filamentous fungi. Deoxynivalenol (DON) is a toxin that is frequently detected in cereal crops. Pigs can show symptoms of chronic toxicosis at levels below maximum recommendations. Strategies for prevention in the field are important, but contamination cannot be fully avoided.

DON belongs to the group trichothecenes, which are characterized by an epoxy ring at C-12,13. Reduction of the epoxy ring gives a metabolite that is considerably less toxic. Different species metabolize DON in different ways.

In 2009, a new group of technological feed additives was officially allowed in the EU, that is defined ”Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins...”. The efficacy of these products has often been questioned. The purpose of this literature study is to examine the effect of toxin binders regarding DON.

There are two main categories of mycotoxin-detoxifying agents; adsorbing and biotransforming. Adsorbing agents have proven to be inefficient as to adsorbing DON. Biotransforming agents are using microbes' ability to degrade mycotoxins in to non-toxic metabolites. Bacterial strains with this ability have been isolated from rumen fluid, chicken digesta and farmland soils. Currently, there is only one commercial feed additive on the market that claims to degrade DON by enzymatic reduction of the epoxy-group. Results of trials in order to evaluate the product has been contradictory, but no study with high credibility has been able to prove its efficacy.

1 Introduktion

Mykotoxiner är sekundära metaboliter som produceras av mögelsvampar. De vanligaste släktena som producerar toxiner i foder är *Fusarium*, *Aspergillus* och *Penicillium* och de kategoriseras ofta som fält- eller lagringsflora, beroende på var de vanligast förekommer (Santin, 2005). *Fusarium* är det släkte som dominerar i fältfloran och de olika arterna producerar bland annat toxinerna trichotecener, fumonisiner och zearalenon (Marin *et al.*, 2013). Trichotecener är i sin tur en grupp toxiner som kan orsaka stora ekonomiska förluster och påverka djurvälståndet negativt i tempererade områden jorden runt. Förekomsten av trichotecener tenderar att öka i världen, vilket delvis kan förklaras av pågående klimatförändringar (Chakraborty & Newton, 2011).

Deoxynivalenol (DON) är den vanligaste trichotecenen som förekommer i spannmål (Karlovska, 2011) och grisar är det djurslag som är känsligast (Eriksen & Pettersson, 2004). Symptom vid akut förgiftning är kräkningar och inflammation i mag- och tarmkanalen, medan kronisk toxikos vid en längre tids exponering av lägre koncentrationer yttrar sig mer diffust genom minskat foderintag och tillväxt, samt immunosuppression (Pestka, 2007).

I en omfattande internationell undersökning påträffades DON i 65% av alla spannmålsprover som analyserades (Rodrigues & Naehrer, 2012). Generellt sett är mykotoxiner ett större problem i länder med ett varmare klimat, men även i Sverige förekommer problematiska angrepp av *Fusarium* spp. Mellan år 2011 och 2012 påträffades DON i 89% av alla prover från halm och spannmål i Sverige (Nordkvist & Häggblom, 2014).

EU har fastställt rekommenderade riktvärden för DON i foder (EC, 2006). Halten DON i spannmål som foderråvara bör inte överstiga 8 mg/kg och tillskottsfoder eller helfoder till gris bör inte innehålla mer än 0,9 mg/kg. DON ackumuleras inte i vävnader, och innebär därför inte någon livsmedelsrisk via djurfoder (EFSA, 2009), men kan orsaka försämrad djurvälståndet och stora ekonomiska förluster om foder måste kasseras eller grisarna får en sämre tillväxt av det kontaminerade fodret.

År 2009 antogs en förordning av Europeiska Kommissionen, i vilken det godkändes en ny funktionell grupp av fodertillsatser (EC, 2009). Denna grupp omfattar ”Ämnen avsedda att minska mykotoxinkontaminationen i foder: ämnen som kan hindra eller minska absorptionen av mykotoxiner, främja utsöndringen av mykotoxiner eller ändra deras verkningsätt”.

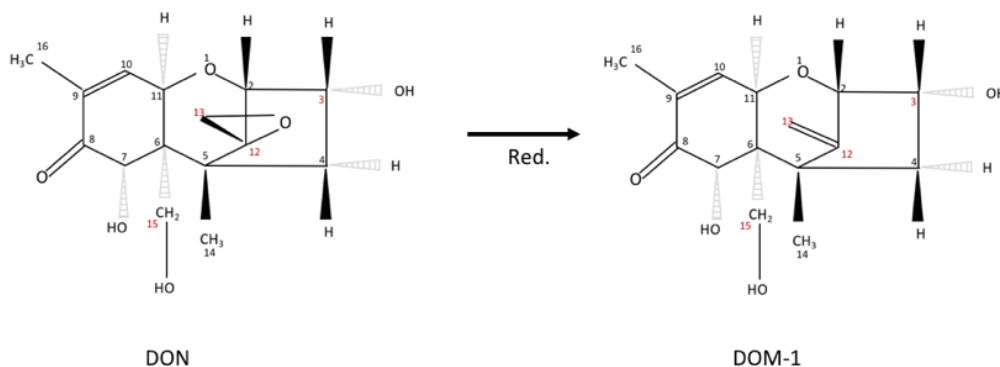
Syftet med denna litteraturstudie är att studera effekten av toxinbindare i foder, med avseende på upptag och metabolism av DON.

2 Trichotecener

Trichotecener är en grupp mykotoxiner som produceras av *Fusarium*-arterna. Dessa är cykliska seskviterpener med en liknande kemisk struktur och karakteriseras av en dubbelbindning vid C-9,10, en epoxi-ring vid C-12,13 och olika antal acetyl- och hydroxylgrupper på olika positioner (Savard & Blackwell, 1997).

Många *Fusarium* spp. kan producera flera olika mykotoxiner (Kabak *et al.*, 2006). Detta gör att kontaminerade grödor ofta innehåller flera toxiner (Cano-Sancho *et al.*, 2010), vilket kan ha additiva toxikologiska effekter (EFSA, 2009).

De trichotecener som är av störst intresse inom EU när det gäller fodersäkerhet är T-2, HT-2, nivalenol (NIV) och DON (EU SCAN, 2003). Toxiciteten varierar beroende på de olika funktionella grupperna (Zhou *et al.*, 2008), och framför allt epoxigruppen har visat sig vara av stor betydelse. Reduktion av epoxigruppen på DON (Figur 1) ger en metabolit med avsevärt mycket lägre toxicitet (Eriksen *et al.*, 2004).



Figur 1. Molekylär struktur av deoxynivalenol (DON) och metaboliten de-epoxi-deoxynivalenol (DOM-1).

Även den funktionella gruppen på C-3 har stor påverkan (Karlovsky, 2011). När trichotecener syntetiseras acetyleras C-3 tillfälligt för att inte mögelsvampen ska ta skada. DON förekommer ofta tillsammans med derivaten 3-acetyldeoxynivalenol (3-AcDON) och 15-acetyldeoxynivalenol (15-AcDON), vilka har en acetylgrupp på C-3 respektive C-15 (Zhou *et al.*, 2008). Vid försök på fibroblaster (bindvävsceller) från möss visade sig 3-AcDON vara mindre toxisk än DON, medan 15-AcDON var likvärdig DON (Eriksen *et al.*, 2004). Andra studier har visat att även en ketongrupp på C-3 verkar ha en lägre immunosuppressiv effekt (Shima *et al.*, 1997).

2.1 Metabolism av DON

Kroppens celler använder sig av olika enzymatiska system för att metabolisera toxiska substanser (Lidman, 2008). Processen, som framförallt sker i hepatocyterna (levercellerna), brukar delas in i två faser, där fas 1 bildar en konjugerbar grupp, till vilken ett hydrofilt ämne kopplas på i fas 2. De båda faserna leder till att substratets polaritet ökar och därmed kan utsöndras, vilket vanligtvis sker via levern och njurarna. En konjugerad grupp kan till exempel vara glukuronsyra. Metaboliter av DON med konjugerade glukoronider hittas i galla och serum hos djur som ätit DON-kontaminerat foder (Gareis *et al.*, 1987; Eriksen *et al.*, 2003). Denna metabolism är dock densamma hos alla arter (Williams, 1959). Trots detta är grisar mest

känsliga för DON, medan både höns och kor är relativt toleranta (Prelusky *et al.*, 1994). Grisar kan visa symptom på toxikos vid 1–2 mg/kg i foder, medan idisslare har visat sig tolerera doser på 20 mg/kg utan att visa symptom (Pestka, 2007). Detta tyder på andra artspecifika skillnader i nedbrytningen av DON före utsöndring.

Den främsta metaboliten av DON som påträffas i träck och urin hos idisslare och höns är de-epoxi DON (DOM-1) (Yoshizawa *et al.*, 1983), medan det hos grisar är konjugerade metaboliter (Eriksen *et al.*, 2003). Mikroorganismer med förmågan att de-epoxidera DON har påträffats i tarmfloran hos höns (He *et al.*, 1992; Young *et al.*, 2007) och i våmmen hos kor (King *et al.*, 1984), vilket antas förklara den olika känsligheten mellan arterna.

2.2 Toxicitet

DON absorberas mycket snabbt i tunntarmen via passiv diffusion (Pestka, 2007). Intracellulärt binder DON till ribosomerna, vilket orsakar en ”ribotoxisk stressrespons”. Det innebär att proteinsyntesen inhiberas och MAP-kinaser aktiveras (Pestka, 2007). MAP-kinaser påverkar olika transkriptionsfaktorer som i sin tur reglerar processer som till exempel apoptos, celldifferentiering (Cobb, 1999) och produktionen av cytokiner i lymfocyter som reglerar immunförsvaret (Yang *et al.*, 2000).

Epitelet i tunntarmen fungerar som en skyddande barriär mot skadliga organismer genom små proteinkomplex i cellmembranet, så kallade tight-junctions, som håller ihop enterocyterna (Payros *et al.*, 2016). Aktiveringen av MAP-kinaser hämmar syntesen av dessa proteiner, vilket ökar genomsläppligheten av patogener (Pinton & Osvald, 2014). Detta, i kombination med en försämrad immunförsvarsreaktion, medför en förhöjd infektionskänslighet (Payros *et al.*, 2016).

En ökad apoptos och minskad celldifferentiering av enterocyter minskar dessutom höjden på villi i tunntarmen (Pinton & Osvald, 2014). Det ger en minskad absorptionsyta och försämrar näringsupptaget och därmed också tillväxten.

DON orsakar alltså histologiska förändringar i tunntarmen och har en immunosuppressiv effekt.

3 Toxinbindare

3.1 Bakgrund

Bra odlingsrutiner i förebyggande syfte är viktigt för att reducera tillväxten av mögelsvampar (Awad *et al.*, 2010). Riktlinjer för en säker foder- och livsmedelsproduktion finns beskrivna i *Codex Alimentarius* och Europakommissionens rekommendationer (EC, 2006). Dock finns en naturlig begränsning i hur mycket det går att påverka angrepp av mögelsvampar ute i fält, eftersom klimatfaktorer som vattenaktivitet och temperatur inte går att kontrollera (Awad *et al.*, 2010).

En strategi för att detoxifiera kontaminerat foder är att separera det mekaniskt (Awad *et al.*, 2010). Det innebär till exempel att fodret sorteras med hjälp av olika densitet hos angripna och friska kärnor, eller att det tvättas med vatten under tryck eller i olika organiska lösningsmedel. Även metoder där fodret behandlas med olika kemikalier har testats. Dessa metoder kan vara effektiva, men har som nackdel att de ofta är kostsamma och kan vara praktiskt svåra att utföra på den egna gården. Det kan dessutom påverka näringsvärdet negativt och bildar skadliga restprodukter. I EU är det inte tillåtet att använda kemikalier för att detoxifiera spannmål som innehåller toxinnivåer som överskrider gränsvärdena (Kolossova & Stroka, 2011).

Toxinbindare är en godkänd grupp tillsatser vars syfte är att minska toxiciteten av det kontaminerade fodret i mag- och tarmkanalen. Dessa tillsatser innebär inte att foder där halten mykotoxiner överstiger de rekommenderade gränsvärdena får användas (Kolossova & Stroka, 2011). Däremot är det vanligt att DON påträffas i nivåer under de rekommenderade nivåerna och grisar har visat symptom på toxikos redan vid 1 mg/kg (Dänicke *et al.*, 2001). Detta ger ett utrymme för fodertillsatser som kan förbättra kvaliteten på fodret.

Beroende på tillsatsmedlens funktion kan de delas in i två huvudgrupper; adsorberande eller biotransformerande (EFSA, 2009). De omnämns dock ofta som ”toxinbindare”, trots att de fungerar på olika sätt (Kolossova & Stroka, 2011).

3.2 Adsorberande

Principen med adsorberande toxinbindare är att interaktioner som elektrostatiske krafter, vätebindningar, och van der Waal-krafter skapar bindningar mellan toxinet och det adsorberande materialet (EFSA, 2009). Detta gör att till exempel form, struktur och total yta hos både toxinet och det adsorberande ämnet påverkar styrkan och stabiliteten i interaktionen. (Zhu *et al.*, 2015). Bindningarna mellan toxinet och materialet måste vara tillräckligt stabila för att kunna passera genom mag- och tarmkanalen utan att dissociera (Jard *et al.*, 2011).

Många av de adsorberande ämnena som har undersökts är oorganiska leror av kiseldioxid-mineraler, men även organiskt material används som toxinbindare. Jästcellväggar och avdödade mjölksyrabakterier har visat sig kunna adsorbera många mykotoxiner, inklusive DON, in vitro (El-Nezami *et al.*, 2002; Yiannikouris *et al.*, 2004). Toxinet binder till de polysackarider, proteiner och lipider som bygger upp cellväggarna (Zhu *et al.*, 2015). Organiska toxinbindare används ofta i kommersiella preparat (Jard *et al.*, 2011). Vid försök när dessa har undersökts in vivo, eller in vitro i modeller som simulerar gastrointestinala förhållanden, har de dock inte adsorberat DON effektivt (Kolossova & Stroka, 2012; Avantaggiato *et al.*, 2004; Döll *et al.*, 2004).

Ett ämne som generellt sett är ett effektivt adsorberande material är aktivt kol (Jard *et al.*, 2011). Det bildas vid förbränning av kolföreningar och har en porös struktur med en stor adsorptionsyta. Aktivt kol kan påverka biotillgängligheten av DON (Avantaggiato *et al.*, 2004), men verkar inte förhindra mykotoxikos in vivo (Avantaggiato *et al.*, 2005).

DON har en låg polaritet och en ”bulkgig” struktur i och med epoxi-gruppen, och har därför svårt att binda till adsorbenter (EFSA, 2009).

3.3 Biotransformerande

Biotransformerande preparat utnyttjar mikroorganismers förmåga att modifiera kemiska grupper, vilken bildar metaboliter med lägre toxicitet. (EFSA, 2009)

3.3.1 Bakterier

Den fermentation som sker av mikrober i våmmen ger ett visst skydd mot skadliga ämnen och idisslare har visat sig vara relativt okänsliga mot DON (Prelusky *et al.*, 1994). Detta fick King *et al.* (1984) att inkubera DON i våmvätska in vitro, vilket resulterade i att 100% av all DON, vid en koncentration på 10 mg/kg, hade omvandlats till en de-epoxiderad metabolit efter 24 h. De-epoxideringen sker i mag- och tarmkanalen där mikroorganismer med ett specifikt epoxidreduktas transformerar DON till ett ämne med en dienstruktur istället för en epoxigrupp (dvs ett omättat dubbelbundet kolväte istället för ett cykliskt bundet syre) (King *et al.*, 1984). Ungefär samtidigt isolerade även Yoshizawa *et al.* (1983) samma ämne i träck och urin från råttor och den döptes till DOM-1. Sedan dess har olika miljöer screenats efter mikrober med förmågan att de-epoxidera DON.

De mikrober som har visat sig kunna transformera DON till olika metaboliter in vitro härstammar från olika miljöer där DON regelbundet förekommer (*e.g.* He *et al.*, 1992). Orsaken antas vara att DON skapar ett selektivt tryck, där mikrober med anlag för resistens eller förmågan att kunna utnyttja kolet i DON som energikälla gynnas (Zhu *et al.*, 2016). Detta kan vara förklaringen till att tarmfloran hos vissa grisar har visat på biotransformerande aktivitet (Eriksen *et al.*, 2002), medan det i andra försök inte har observerats någon omvandling alls (He *et al.*, 1992). Även stora variationer mellan individer av kycklingar förekommer (He *et al.*, 1992).

Det har också konstaterats att mängden DON som metaboliseras in vitro påverkas både av koncentrationen toxin och inkubationstiden. Vid 100 mg DON/kg omvandlades 37% på 24 h i våmvätska, jämfört med 100% transformation på 24 h vid en koncentration på 10 mg DON/kg (King *et al.*, 1984). He *et al.* (1992) uppmätte att 35% DON metaboliserades i våmvätska på 96 h där koncentrationen var 1000 mg DON/kg. En förklaring kan vara att de essentiella näringsämnen i odlingsmediet förbrukats av mikroberna. (He *et al.*, 1992). Vissa bakterier använder sig enbart av kolet i DON som energikälla, medan andra kräver en berikad odlingsmiljö (He *et al.*, 2016). En annan miljöfaktor som kraftigt påverkar bakteriernas aktivitet är pH-värdet (He *et al.*, 1992). Vid pH 5,2 inhiberades bakteriernas metabolism och ingen DON omvandlades. Mellan pH 5,72-6,91 omvandlades däremot 90-98%.

Binder *et al.* (1997) var först med att lyckas isolera en enskild bakteristam med de-epoxidasproduktion. Den härstammade ur våmmen på en ko och tillhör släktet *Eubacterium*, vilka är grampositiva, anaeroba och icke sporulerande stavformiga bakterier. Denna bakterie, *Eubacterium* DSM 11798, är i dagsläget den enda mikroorganism som används kommersiellt

Toxiciteten hos 3-keto-DON och 3-epi-DON har visat sig vara avsevärt mycket lägre jämfört med DON (He *et al.*, 2015). In vitro-försök visade att DNA-syntesen inte inhiberades på samma sätt som av DON. IC₅₀¹ var 357 gånger högre, jämfört med DON, när DNA-syntesen mättes i fibroblaster från möss. Även in vivo-försök på möss bekräftade en lägre toxicitet, då inga histologiska förändringar eller påverkan på kroppsvikt eller blodprover syntes (He *et al.*, 2015). En hypotes är att den isomera strukturen hindrar 3-epi-DON från att binda in till ribosomen (He *et al.*, 2016).

Det är dock inte alla bakterier som utför båda stegen i epimeriseringen (Hassan *et al.*, 2017). Vissa stammar kan enbart reducera 3-keto-DON till 3-epi-DON. Det antas därför att det är en enzymatisk två-stepsprocess. Det finns dock en isolerad stam, *Devosia mutans*, som omvandlar DON till 3-epi-DON via 3-keto-DON. Exakt vilka enzym som är inblandade är ännu okänt.

3.3.2 In vivo med mikrobiellt detoxifierat foder

In vivo-studier med utfodring av mikrobiellt detoxifierat foder har visat på positiva effekter (He *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2011). I ett försök blandades DON kontaminerad majs med tarmflora från höns (förhållande 1:1) (He *et al.*, 1993). Efter fermentation i 37°C under 96 h, uppmättes halten DON till 2,5 mg/kg, vilket innebar att det minskat med 50%. Både foderintag och tillväxt var högre (19% resp. 54%) hos de kulingar som utfodrades med det mikrobiellt fermenterade fodret, jämfört med gruppen som fick kontaminerat foder (5 mg/kg). I försöket användes även en kontrollgrupp där rent foder blandades med tarmflora, och det var ingen skillnad jämfört med gruppen som enbart fick rent foder.

Ett liknande försök med *Bacillus* sp. LS100, isolerad från höns, visade på en tydligt försämrad viktökning och foderintag hos kulingar som utfodrades med kontaminerat foder (5 mg/kg) jämfört med kulingar som fick mikrobiellt behandlat foder där all DON omvandlats till DOM-1 (Li *et al.*, 2011). En analys av det kontaminerade fodret visade att det enbart var förorenat med DON (det fanns alltså inga derivat av DON i fodret) och efter fermentation i 37°C under 72 h hade 100% omvandlats till DOM-1. Foderintag och viktökning låg 45% resp. 82% högre hos kulingarna som åt det detoxifierade fodret jämfört med kulingarna som fick kontaminerat foder, vilket inte skilde sig signifikant mot kontrollgrupperna som fick rent foder eller foder med enbart mikrober (fritt från DON). I detta försök togs även blodprover, där en ökning i urea, minskning i GLDH (glutamatdehydrogenas) och inga konjugerade bilirubiner (jämfört med rent foder där konjugerade bilirubiner förekom) dock tydde på en förändrad proteinmetabolism och eventuell leverpåverkan. Övriga serum-metaboliter var dock oförändrade.

¹ IC₅₀ = Inhibitory Concentration, 50% (Den koncentration då celltillväxten in vitro är 50%)

3.3.3 BBSH 797 - en kommersiell produkt

Resultaten av in vivo-studier där djuren har utfodrats med ett kontaminerat foder, samtidigt som de fått ett tillskott av en DON-fermenterande bakteriekultur, *Eubacterium* sp. DSM 11798 (BBSH 797), har varit motsägelsefulla. Petr Karlovsky (2011) skriver i en litteraturstudie om ett försök på grisar som har visat på positiva effekter av tillsatsen BBSH 797, både vad gäller tillväxt och histologiska förändringar, men påpekar samtidigt att den studien är utförd av en forskargrupp som är associerad till företaget som tillverkar produkten.

Även försök av oberoende parter stöder antagandet att produkten kan ha effekt. När höns utfodrades med ett foder som var kontaminerat med DON (10 mg/kg) samtidigt som de gavs BBSH 797 ($2,5 \times 10^8$ CFU/kg) märktes ingen signifikant skillnad i foderintag eller tillväxt jämfört med kontrollgrupperna (Awad *et al.*, 2006). Dock skilde sig inte kontrollgrupperna (med eller utan DON) åt heller. Höns har visat sig relativt toleranta mot DON och 10 mg/kg har inte alltid orsakat toxikos (Pestka, 2007). Däremot syntes vissa olikheter vid dissektion. De höns som fått en diet med DON tillsammans med BBSH 797 hade normala villi, till skillnad mot de som enbart fick DON i fodret. Resultatet kan alltså tolkas som att ett tillskott av BBSH 797 inte påverkade prestationen ur ett kortsiktigt perspektiv, men att det antagligen påverkade tarmepitelet positivt, då villi var jämförbara med kontrollgruppen som fick ett rent foder.

EFSA (2005) utvärderade BBSH 797 med fokus på eventuella risker med produkten, men det utfördes även in vivo-försök där foderomvandlingsförmågan (viktökning i förhållande till foderintag) mättes. BBSH 797 gavs i olika doser, allt från rekommenderad giva till 11 ggr den rekommenderade givan, och det gavs både till grisar som fick DON-kontaminerat foder och till kontrollgrupper som fick rent foder. Tarmfloran undersöktes för att se om *Eubacterium* DSM 11798 etablerade sig och i så fall påverkade sammansättningen bakterier i mag- och tarmkanalen. Inget försök visade någon påverkan på fördelningen av olika mikroorganismer, oavsett mängden som givits. Grisarna, var indelade i fem grupper. Foderomvandlingsförmågan var signifikant högre hos två av tre grupper med kultingar. I båda grupperna med tillväxtgrisar syntes en trend att ju högre giva av BBSH 797, desto bättre foderomvandlingsförmåga, men det var ingen signifikant skillnad. Det naturligt kontaminerade fodret innehöll 1–2,6 mg trichotecener/kg.

Andra studier är inte förenliga med ovanstående resultat. Både in vitro- och in vivo-försök har kommit till slutsatsen att Mycofix+ (en kommersiell produkt som innehåller BBSH 797) inte har någon effekt på varken förmågan att metabolisera DON eller påverka tillväxten (Dänicke *et al.*, 2004; Döll *et al.*, 2004; Avantaggiato *et al.*, 2004). Vid ~2,6 mg DON/kg till grisar under en längre period, från ca 23 kg till slaktmognad, var viktuppgången ca 10% sämre både hos gruppen som fick DON och den grupp som fick DON med fodertillsatsen Mycofix+ (Dänicke *et al.*, 2004). Vid blodprov var det ingen skillnad i koncentrationen DON i serum och det var inte heller någon skillnad i mängden DON som utsöndrades via urin, jämfört med gruppen som fick enbart DON. När produkten testades in vitro, i ett försök som tog hänsyn till pH, temperatur och tid för att simulera verkliga förhållanden i mag- och tarmkanalen, minskade halten DON med enbart 1% (Döll *et al.*, 2004). Avantaggiato *et al.* (2004) testade samma produkt i ett

dynamiskt in vitro-system, gjort för att efterlikna miljön i mag- och tarmkanalen. DON minskade med ca 9%, både vid en koncentration på 2 mg/kg och 10 mg/kg.

4 Diskussion

Preventiva metoder är inte alltid tillräckligt för att undvika angrepp av mögelsvampar. Det tillvägagångssätt som föredras inom EU är mekanisk sortering där kontaminerat och rent foder separeras (Kolossova & Stroka, 2011). Det är dock inte ovanligt att spannmål innehåller låga nivåer av mykotoxiner, under rekommenderade maxvärden, och användandet av toxinbindande preparat ökar i Europa (EFSA, 2009).

Adsorberande mineralämnen och leror har visat sig vara ineffektiva vad gäller att adsorbera DON. Däremot har organiska material visat sig binda DON i relativt hög utsträckning i in vitro-försök (El-Nezami *et al.*, 2002), men det har inte bekräftats i in vivo-försök med kommersiella produkter (Avantaggiato *et al.*, 2004; Döll *et al.*, 2004; Kolossova & Stroka, 2012). Samtliga av de tre studierna visade att kommersiella preparat i syfte att adsorbera *Fusarium*-toxiner var ineffektiva. Det enda material som verkar binda till DON i högre utsträckning är aktivt kol (Avantaggiato *et al.*, 2004). Det är dock inte möjligt att blanda in aktivt kol i fodret under någon längre period, eftersom det är ett ospecifikt adsorberande ämne, vilket innebär att det även binder till mikronäringsämnen och påverkar fodrets näringsvärde.

Det är ingen tvekan om att vissa mikroorganismer kan metabolisera DON effektivt, vilket öppnar för möjligheter att använda denna process för att behandla kontaminerat foder. En förutsättning är dock att de metaboliter som bildas har avsevärt mycket lägre toxicitet (EFSA, 2009). När ren DON behandlades med *Bacillus* sp. LS100 omvandlades 100% till DOM-1 (Li *et al.*, 2011). När däremot foder kontaminerat med olika trichotecener, vilket är ett vanligt scenario i verkligheten, fermenterades med *Eubacterium* sp. DSM 11798 de-acetylerades vissa derivat medan andra de-epoxiderades, vilket skapade en blandning av olika metaboliter (Fuchs *et al.*, 2002). En förklaring till detta kan vara att näringsämnena hade förbrukats i odlingsmiljön, men det visar ändå att det är svårt att förutsäga resultatet av biotransformation i en naturlig miljö och det anses viktigt att utvärdera detta in vivo (Li *et al.*, 2011). Dock har det varit en signifikant skillnad i foderintag och tillväxt, jämfört med obehandlat foder i in vivo-försök med mikrobiellt behandlat foder, vilket tyder på att metaboliterna ändå har en lägre toxicitet (He *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2011).

Det är många svårigheter som måste överkommas för att en fodertillsats ska ha effekt när den ges tillsammans med ett kontaminerat foder, med tanke på att mag- och tarmkanalen är en komplex miljö och bakterierna måste metabolisera DON innan det absorberas i tunntarmen. *Eubacterium* sp. DSM 11798, som har isolerats ur våmmen, är strikt anaerob vilket komplicerar tillverkningsprocessen och hanteringen av den kommersiella produkten. Det är omdiskuterat huruvida BBSH 797 har någon positiv effekt eller inte. När EFSA utvärderade produkten såg de enbart en signifikant skillnad i 2 av 5 försöksgrupper (EFSA, 2005). *Bacillus* LS100 är däremot till 99% genetiskt lik en fakultativ bakterieart. Skulle det visa sig att LS100 är fakultativt anaerob, innebär det sannolikt att den kan utvecklas till en produkt med större chans

att överleva fodertillverkningen. Däremot är det fortfarande en utmaning att få bakterierna att passera magsäcken utan att ta skada av den sura miljön. LS100 härstammar från en mer neutral miljö i tarmen, och ingen aktivitet märktes hos LS100 vid pH 5,2 (He *et al.*, 1992). Dessutom måste DON metaboliseras på mycket kort tid, eftersom det absorberas snabbt i tunntarmen. Tiden för fermentation har haft stor betydelse i många försök där andelen DON som metaboliseras över ett dygn har mätts (King *et al.*, 1984; He *et al.*, 1992). Ett realistiskt tidsperspektiv för att inte DON ska hinna absorberas är snarare 30 min (Pestka, 2007).

EFSA (2009) har framfört kritik mot att försöksuppläggen vid studier av toxinbindare är bristfälliga och att det finns behov av standardiserade metoder. Det är svårt att jämföra olika försök och deras resultat när både upplägg och de parametrar som studeras varierar. Med tanke på att resultatet påverkas av många faktorer som koncentration, tid, temperatur och pH, är det nödvändigt att utföra försök där man tydligt kan se linjära samband mellan koncentration och respons. I många försök har toxinkoncentrationer långt över de naturligt förekommande använts. Det kan vara en användbar strategi för att screena efter bakterier med hög förmåga att metabolisera DON (Kolosova & Stroka, 2011), men speglar inte resultatet under naturliga förhållanden.

Vid *in vivo*-försök har ofta ospecifika parametrar jämförts, som foderintag, kroppsvikt, histologiska förändringar i tunntarmen, vikt av olika organ eller nivåer av olika proteiner i serum (e.g. He *et al.*, 1993; EFSA, 2005; Li *et al.*, 2011; Awad *et al.*, 2006). Enligt EFSA (2009) bör det även inkluderas toxikokinetiska parametrar, där hänsyn tas till olika djurslags metabolism. Hur DON absorberas och omsätts i kroppen, samt vilka metaboliter som bildas i olika nivåer i blod, urin eller träck, speglar mer specifikt hur toxinbindaren påverkar biotillgängligheten av toxinet. När Dänicke *et al.* (2004) mätte koncentrationen DON i serum skilde sig inte gruppen som fick Mycofix+ tillsammans med DON mot gruppen som enbart fick DON. Det var inte heller någon skillnad i koncentrationen DON som utsöndrades via urin. Detta tyder på att DON har absorberats i tunntarmen, transporteras via blodbanan och utsöndrats genom njurarna i samma utsträckning oavsett tillskott av BBSH 797 eller inte., Detta och kan tolkas som att BBSH 797 inte har metaboliserat DON till DOM-1 före absorption i tunntarmen.

En del försök har bara haft tre grupper vid *in vivo*-försök, där en kontrollgrupp får rent foder, en grupp får enbart DON i fodret och en grupp får DON tillsammans med en toxinbindare (e.g. Awad *et al.*, 2006, EFSA, 2005). Ett förslag på att det bör ingå en kontrollgrupp där tillsatsen ges tillsammans med rent foder har presenterats (Döll & Dänicke, 2004). Detta för att utesluta andra effekter av bakterierna som är oberoende av DON. Samtidigt har flera studier haft detta försöksupplägg och i dessa försök har tillsatsen av bakterier inte haft någon påverkan jämfört med kontrollgruppen som enbart fått rent foder (e.g. He *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2011).

Trots många skäl till skepsis finns det ändå vissa argument som väcker intresse för framtiden. Att aeroba bakterier har isolerats skulle kunna öppna för helt nya möjligheter, om foder kan behandlas före utfodring, men utan att fermenteras. Det innebär också att effekten är lättare att mäta, när de komplexa förhållandena i mag- och tarmkanalen inte påverkar resultatet. Däremot behövs vidare forskning där toxiciteten hos 3-epi-DON utvärderas.

Att använda mikroorganismers naturliga förmåga att metabolisera toxiner har fördelar med tanke på att det är en specifik reaktion som inte påverkar näringsvärdet i fodret eller bildar några skadliga biprodukter som ackumuleras i miljön. Risken finns dock att godkända preparat övervärderas för sin förmåga att sänka halten mykotoxiner, och att djur därmed utfodras med foder av sämre kvalitet.

Syftet med den här litteraturstudien var att studera effekten av toxinbindare med avseende på DON. Många in vitro-försök har visat att mikroorganismer är effektiva på att bryta ner DON, men detta har inte bekräftats i de in vivo-försök som utförts. Med tanke på resultaten av de studier som har undersökt kommersiella preparat finns stor anledning till att vara kritisk till deras effekt som fodertillsatser.

Litteraturförteckning

- Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., Visconti, A., (2005). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 22:4, 379-388.
- Awad, W.A., Böhm, J., Razzazi-Fazeli, E., Ghareeb, K., Zentek, J., (2006). Effect of Addition of a Probiotic Microorganism to Broiler Diets Contaminated with Deoxynivalenol on Performance and Histological Alterations of Intestinal Villi of Broiler Chickens. *Poultry Science Association Inc.* 85(6), 974-979.
- Awad, W.A., Ghareeb, K., Böhm, J. and Zentek, J., (2010). Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives and Contaminants Part A* 27: 510-520.
- Binder, J., Horvath, E.M., Schatzmayr, G., Ellend, N., Danner, H., Krska, R., Braun, R., (1997). Screening for deoxynivalenol-detoxifying anaerobic rumen microorganisms. *Cereal Research Communications* 25:343–346.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137, 265-282.
- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., (2010). Biomonitoring of *Fusarium* spp. mycotoxins: perspectives for an individual exposure assessment tool. *Food Science and Technology* 16, 266-276.
- Chakraborty, S., Newton, A.C., (2011). Climate change, plant diseases and food security: an overview. *Plant Pathology* 60, 2-14.
- Robinson, M.J., Cobb, M., (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 9:180-186.

- Dänicke, S., Valenta, H., Döll, S., Ganter, M., Flachowsky, G., (2004). On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. *Animal Feed Science and Technology* 114, 141-157.
- Dänicke, S., Gareis, M., Bauer, J., (2001). Orientation values for critical concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in diets for pigs, ruminants and gallinaceous poultry. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* 10, 171-174.
- Döll, S., Dänicke, S., Valenta, H., Flachowsky, G., (2004). In vitro studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Archives of Animal Nutrition* 58:4, 311-324.
- EC, 2006. Commission Regulation (EC) No 583/2006 of 17 August 2006. Commission recommendation on the prevention and reduction of Fusarium toxins in cereals and cereal products. Off. J. Eur. Union L 234, 35–40.
- EC, 2009. Commission Regulation (EC) No 386/2009 of 12 May 2009. Amending Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. Official Journal of the European Union L 118, 166.
- EFSA, 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.
- EFSA 2005. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the safety of the product “Biomim BBSH 797” for piglets, pigs for fattening and chickens for fattening. The EFSA Journal 169, 1-14.
- EFSA, 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. The European Food Standard Agency (EFSA) Journal, 39, 1-27.
- El-Nezami, H., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Ahobas, J., (2002). Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives & Contaminants* 19, 680–686.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H., Johnsen, K., Lindberg, J.E., (2002). Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. *Archives of Animal Nutrition* 56, 263-274.
- Eriksen, G.S., Petterson, H., (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114, 205-239.
- Eriksen, G.S., Pettersson, H., Lindberg, J.E., (2003). Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch Tierernähr* 57, 335–345.
- Eriksen, G.S., Petterson, H., Lundh, T., (2004). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* 42, 619-624.

- EU SCAN, 2003. Mycotoxins In Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Undesirable Substances in Feed (Adopted on 20 February 2003) European Commission, Health & Consumer Protection Directorate General, Brussels, Belgium, pp. 6-24.
- European Commission (EC), 2003. Commission Directive 2003/100/ EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/ EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. Official Journal of the European Union L 285: 33-37.
- 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. Official Journal of the European Union L 229: 7-9.
- European Commission (EC), 2009. Commission regulation (EC) No. 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. Official Journal of the European Union L 118: 66.
- Gareis, M., Bauer, J., Gedek, J., (1987). On the metabolism of the mycotoxin deoxynivalenol in the isolated perfused rat liver. *Mycotoxin Research* 3, 25–32.
- Hassan, Y.I., He, J.W., Perilla, N., Tang, K., Karlovsky, P., Zhou, T., (2017). The enzymatic epimerization of deoxynivalenol by *Devosia mutans* proceeds through the formation of 3-keto-DON intermediate. *Scientific Reports* 7: 6929.
- He, J.W., Bondy, G.S., Zhou, T., Caldwell, D., Boland, G.J., Scott, P.M., (2015). Toxicology of 3-epi-deoxynivalenol, a deoxynivalenol-transformation product by *Devosia mutans* 17-2-E-8. *Food and Chemical Toxicology* 84, 250-259.
- He, J.W., Hassan, Y.I., Perilla, N., Li, X-Z., Boland, G.J., Zhou, T., (2016). Bacterial Epimerization as a Route for Deoxynivalenol Detoxification: the Influence of Growth and Environmental Conditions. *Frontiers in Microbiology* 7:572.
- He, P., Young, L.G., Forsberg, C., (1992). Microbial Transformation of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3857–3863.
- He, P., Young, L.G., Forsberg, C., (1993). Microbially Detoxified Vomitoxin-Contaminated Corn for Young Pigs. *J. Animal Science* 71, 963-967.
- Jard, G., Liboz, T., Guyonvarc’h, A., Lebrihi, A., (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28:11, 1590-1609.
- Kabak, B., Dobson, A.D. and Var, I., (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46: 593-619.

- Karlovsy, P, (2011). Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(3), 491-504.
- King, R.R., Mcqueen, R.E., Levesque, D., Greenhalgh, R., 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:1181–1183.
- Kolossova, A., Stroka, J., (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal* 4, 225-256.
- Lewis, C.W., Smith, J.E., Anderson, J.G., Freshney, R.I., (1999). Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. *Mycopathologia* 148, 97–102.
- Li, X-Z., Zhu, C., de Lange, C.F.M., Zhou, T., He, J., Yu, H., Gong, J., Young, J.C., (2011). Efficacy of detoxification of deoxynivalenol-contaminated corn by *Bacillus* sp. LS100 in reducing the adverse effects of the mycotoxin on swine growth performance. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28:7, 894-901.
- Li, Y., Wang, Z., Beier, R.C., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S., Zhang, S., (2011). T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3441–3453.
- Lidman, Ulf. 2008. Toxikologi – läran om gifter. Studentlitteratur, 53-66.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, C., Sanchis, V., (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60, 218-237.
- Nordkvist, E., Häggblom, P., (2014). Fusarium mycotoxin contamination of cereals and bedding straw at Swedish pig farms. *Animal Feed Science and Technology* 198, 231-237.
- Payros, D., Alassane-Kpembi, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., Oswald, I.P. (2016). Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology* 90:2931-2957.
- Pestka, J.J., (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137, 283-298.
- Pinton, P., Oswald, I.P., (2014). Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins* 6:1615–1643.
- Prelusky, D.B., Gerdes, R.G., Underhill, K.L., Rotter, B.A., Jui, P.Y., Trenholm, H.L., (1994). Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig. *Natural Toxins* 2, 97–104.

- Rodrigues, I., Naehrer, K., (2012). Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 175-192.
- Santin, E., (2005). Mould growth and mycotoxin production. In: Diaz, D.E. (Eds.) *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, 226.
- Sato, I., Ito, M., Ishizaka, M., Ikunaga, Y., Sato, Y., Yoshida, S., Koitabashi, M., Tsushima, S., (2012). Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. *FEMS Microbiology Letters* 327 (2), 110-117.
- Savard, M.E., Blackwell, B.A., (1997). Spectral Characteristics of Secondary Metabolites from *Fusarium* Fungi. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in grain – Compounds Other Than Aflatoxin*. *American Association of Cereal Chemists, Inc.*, 60.
- Shima, J., Takase, S., Takahashi, Y., Iwai, Y., Fujimoto, H., Yamazaki, M., Ochi, K., (1997). Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3825–3830.
- Völkl, A., Vogler, B., Schollenberger, M., Karlovsky, P., (2004). Microbial detoxification of mycotoxin deoxynivalenol. *Journal of Basic Microbiology* 44 (2), 147-156.
- Williams, R.T., (1959). *Detoxication Mechanisms: The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds*, New York, NY Wiley.
- Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J., Pestka, J.J., (2000). Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164:149–160.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany, J.-P., (2004). Adsorption of zearalenone by α -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection* 67, 1195–1200.
- Yoshizawa, T., Takeda, H., Ohim, T., (1983). Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agricultural and Biological Chemistry* 47, 2133–2135.
- Young, J.C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., Gong, J., (2007). Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food and Chemical Toxicology* 45, 136–143.
- Yu, H., Zhou, T., Gong, J., Young, C., Su, X., Li, X-Z., Zhu, H., Tsao, R., Yang, R., (2010). Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. *BMC Microbiology* 10:182.
- Zhou, T., He, J., Gong, J., (2008). Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin Journal* 1(1), 23-30.

Zhu, Y., Hassan, Y.I, Watts, C., Zhou, T. (2016) Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients – A review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology* 216, 19-29.