



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# Metabolism av mykotoxiner i våmmen

*Lisa Holmqvist*

---

Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Uppsala 2010

Examensarbete, 15 hp  
– Kandidatarbete (Litteraturstudie)

Agronomprogrammet – Husdjur

---



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

## **Metabolism av mykotoxiner i våmmen**

Metabolism of mycotoxins in the rumen

*Lisa Holmqvist*

**Handledare:**

Fredrik Andersson, SLU, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

**Examinator:**

Hans Pettersson, SLU, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Kandidatarbete i husdjursvetenskap

**Kurskod:** EX0553

**Program:** Agronomprogrammet, Husdjur

**Nivå:** Grund C, G2E

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2010

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

## Sammanfattning

Mykotoxiner är sekundära metaboliter som kan bildas av vissa mögelsvampar. Idisslare har generellt ett högre skydd mot mykotoxiner än vad enkelmagade djur har då våmmens mikroorganismer kan fungera som ett extra skydd mot mykotoxikos. Trichotecenerna deoxynivalenol och T-2 toxin bryts ner till de-epoxymetaboliter i våmmen genom att dess toxiska epoxyring spjälkas bort. Deoxynivalenol metaboliseras helt eller delvis av våmmens mikroorganismer, medan T-2 toxinets nedbrytningskapacitet inte är lika hög. Aflatoxin B<sub>1</sub> har en låg nedbrytbarhet, och inga metaboliter har kunnat detekteras i våmmen. Ochratoxin A klyvs i hög grad genom hydrolys till det mindre toxiska ochratoxin  $\alpha$ . Zearalenon metaboliseras i relativt hög grad till  $\alpha$ -zearalenol och  $\beta$ -zearalenol. Då  $\alpha$ -zearalenol är mer toxisk än zearalenon sker ingen avgiftning i våmmen. Våmmens nedbrytningskapacitet av mykotoxiner kan bero på foder, djurets ålder, djurets miljö och djurslag. Resultatet kan även skilja mellan olika studier då försökens design såsom analysmetod, inkubationstid och mängden toxin kan spela roll.

## Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites of certain moulds. Ruminants are generally more resistant to mycotoxins than monogastric animals, as the rumen microorganisms can serve as a form of protection against mycotoxicoses. The trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin are degraded to de-epoxymetabolites in the rumen through breakdown of their toxic epoxyrings. Several studies have shown that deoxynivalenol is fully or partially degraded by microorganisms in the rumen, while the degradation capacity of T-2 toxin is not as high. Aflatoxin B<sub>1</sub> has a low degradability and no metabolites have been detected in the rumen. Ochratoxin A is hydrolyzed to the less toxic ochratoxin  $\alpha$ . Zearalenon is metabolized relatively quickly to  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol. As  $\alpha$ -zearalenol is more toxic than zearalenon, no detoxification takes place in the rumen. Degradation rates of mycotoxins depend on feed, age, environment and species. The results of the different studies can also vary due to experimental design: analytical methods, incubation time and the amount of toxin used.

## Introduktion

Mykotoxiner är toxiska sekundära metaboliter som kan bildas av vissa filamentösa mögelsvampar, till exempel *Penicillium*, *Aspergillus* och *Fusarium*. Toxinerna bildas vid för svamparna gynnsamma förhållanden och dessa svampar växer till som fält- eller lagringsflora på de vanligaste fodermedlen. Svamptillväxt kan påverka fodermedlets näringssammansättning och toxinerna påverkar djurens hälsa och foderutnyttjande (Yiannikouris & Jouany, 2002). Idisslare är generellt mer resistent mot mykotoxiners negativa inverkan än vad enkelmagade djur är eftersom våmmens mikroorganismer fungerar som ett extra försvar mot mykotoxikos (Hussein & Brasel, 2001). En studie har genom att separera bakterie- och protozofraktionerna i våmvätska från får visat att protozoerna är spelar en stor roll vid metabolism av mykotoxiner. Bakteriefractionen var i stort sett helt inaktiv vid närvaro av flera toxiner (Kiessling et al., 1984). Våmbakteriernas roll vid metabolism av mykotoxiner kan dock ha blivit underskattad. Flera bakterier med god förmåga att bryta ner mykotoxiner har isolerats ur våmvätska från nötkreatur (Westlake et al., 1987a; Schatzmayr et al. 2006).

Konsumtion av mykotoxiner kan trots högre resistens både ge akuta symptom såsom aborter och blödningar på inre organ och kroniska symptom såsom nedsatt immunförsvar och förändrad metabolism hos idisslare (Hussein & Brasel, 2001; Yiannikouris & Jouany, 2002). De kroniska effekterna är förmodligen vanligast och alltfler historiska sjukdomsutbrott associeras idag med mykotoxinförgiftning då tekniker för detektion av toxinerna har utvecklats (Morgavi & Riely 2007). Mykotoxinerna tros idag orsaka både sjukdomsfall och ekonomiska förluster på grund av minskad tillväxt och mjölkproduktion hos idisslare runt om i världen (Hussein & Brasel, 2001; Yiannikouris & Jouany, 2002). Problemet kan även komma att öka i Sverige i och med att klimatförändringarna ger oss ett klimat som är gynnsamt för flera mögelsvampar (SOU, 2007:60).

Det är stor skillnad mellan hur de olika toxinerna metaboliseras. I den här litteraturstudien kommer idisslarnas metabolism av de vanligast förekommande toxinerna i foder, aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenon, ochratoxin A och två olika trichotecener att undersökas. Litteraturstudien syftar till att beskriva våmmens metabolism av mykotoxiner genom att sammanställa toxinernas öde i våmmen. Studien kommer att omfatta vilka toxiner som metaboliseras, till vilken grad de bryts ner samt vilka metaboliter som bildas och om de är toxiska. Arbetet kommer även att omfatta olika faktorer som påverkar våmmens nedbrytningskapacitet av mykotoxiner.

## **Våmmen och dess mikroorganismer**

Våmmens mikrobflora består främst av bakterier, protozoer och svampar. Bakterierna är flest till antalet och står för 50-90 % av den mikrobiella massan i våmmen. Protozoerna står för 10-50 % av massan i våmmen, medan svamppopulationen är den minsta på 5-10 %. Den största delen av våmmens mikroorganismer är obligat anaeroba (Sjaastad et al., 2003).

Mikroorganismerna finns både lösa i våmvätskan, fastsatta på foderpartiklar eller fast på våmväggen. Då flödet till löpmagen är konstant måste mikroorganismer som har längre generationsintervall än 8-16 timmar, såsom svampar och vissa protozoer, vara fästa vid våmväggen eller foderpartiklar för att bibehålla en stabil population i våmmen. Våmmen är ett öppet system där 100-200 liter vätska passerar varje dygn och nya mikroorganismer tillkommer ständigt. Våmfloran är trots detta relativt stabil och bakteriefloran varierar sällan mellan djur som lever under olika förhållanden. Protozoefloran i våmmen kan dock variera i större utsträckning mellan arter och individer som lever och är uppfödda under olika förhållanden (Sjaastad et al., 2003).

Våmmen hos vuxna nötkreatur rymmer ungefär 100 liter och hos vuxna får ungefär 10 liter. Som nyfödda har djuren en utvecklad våm. Mjölken bryts ner i löpmagen som då är större än våmmen. När djuren börjar äta vegetabilier utvecklas våmmen och våmfloran utvecklas genom kontaminering från omgivningen (Hobson, 1997). Ett ungt djur kan få en komplett bakterieflora utan kontakt med vuxna djur, antingen via luften eller via foder och inredning. För att ett ungt djur ska få en fullständig protozoeflora underlättar det att det har kontakt med äldre djur (Sjaastad et al., 2003).

## **Metoder**

### **In vitro**

I *in vitro* studier har våmvätska samlats från slaktade djur (Müller et al., 1998) eller våmfistulerade djur (Mathur et al., 1976; Upadhaya et al., 2009). Våminnehållet kan sedan antingen filtreras (Mathur et al., 1976; Upadhaya et al., 2009) eller centrifugerats (Xiao et al., 1991). Även helt våminnehåll har använts för att analysera nedbrytningskapaciteten (Marci et al., 2005). Det är viktigt att våmvätskan hålls i en anaerob miljö efter att den samlats från våmmen. Toxinerna inkuberas sedan i våmvätskan och nedbrytningskapaciteten kan mätas. För att undersöka våmvätskefraktioners eller enskilda mikroorganismers specifika egenskaper har vissa studier delat upp våmvätskan i bakterie- och protozofraktioner (Kiessling et al., 1984) och vissa har isolerat bakterier från våmvätska i renkulturer (Westlake et al., 1987a; Schatzmayr et al., 2006).

En våmsimulatorteknik har också använts för att studera toxiners nedbrytning i våmvätska *in vitro* (Seeling et al., 2006b). Våminnehåll placeras i simulatortorn och till exempel salivtillförsel och våmkontraktioner kan simuleras. Toxinkontaminerat foder läggs i nylonpåsar som placeras i simulatortorn varefter nedbrytningen kan kontrolleras.

### **In vivo**

Nedbrytningshastighet, fodrets påverkan och när i förhållande till utfodringen som nedbrytningen är som effektivast kan även undersökas *in vivo*. Djur med permanentkanyler i våmmen och i början av duodenum kan utfodras med mykotoxinkontaminerat foder och användas i studier av djurens metabolism (Dänicke et al., 2005; Seeling et al., 2006a). Toxinhalten i våmmen och duodenum kan jämföras och metabolismen kan utifrån det uppskattas. Toxinet kan även placeras direkt i våmmen via en våmfistel och nedbrytningen övervakas genom att samla våmvätska för analys efter bestämda tider (Xiao et al., 1991).

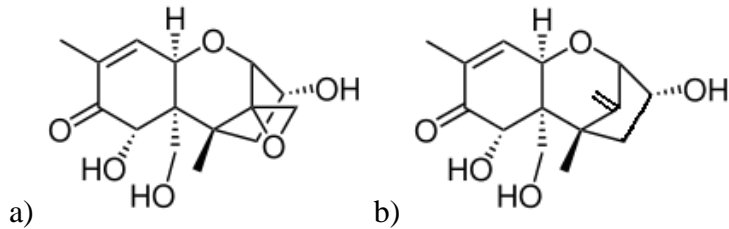
## **Våmmens metabolism av mykotoxiner**

### **Trichotecener**

Trichotecener är en grupp mykotoxiner som kännetecknas av en 12- 13- epoxyring (Hussein & Brasel, 2001), se figur 1 och 2.

### **Deoxynivalenol**

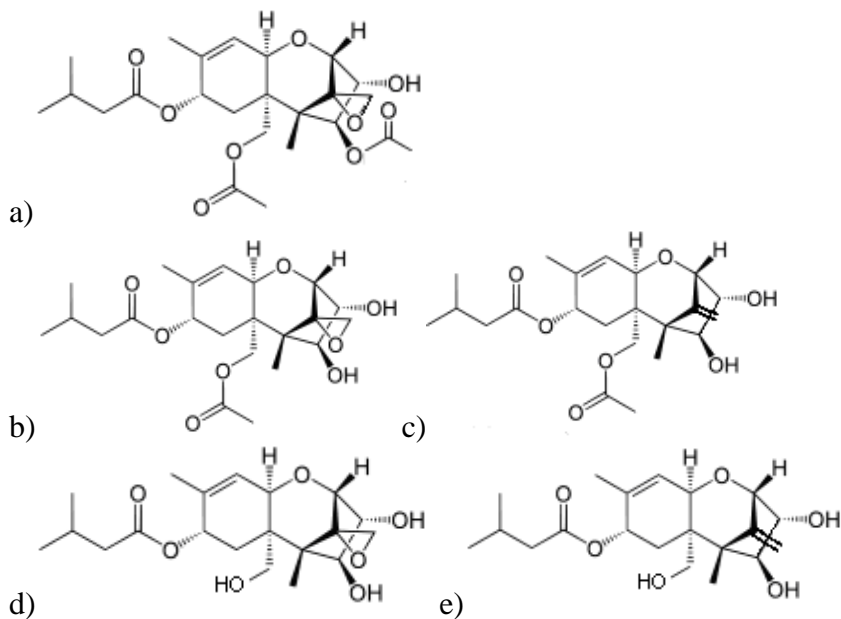
Deoxynivalenol (DON) (figur 1a) metaboliseras till de-epoxy DON (figur 1b) av våmmens mikroorganismer (Swanson et al., 1987b; He et al., 1992; Dänicke et al., 2005; Seeling et al., 2006). Metaboliten de-epoxy DON är mindre toxisk än DON då den reaktiva epoxyringen spjälkats bort (Sundstøl Eriksen et al., 2004). Det har konstaterats att de-epoxy DON är 500 gånger mindre toxisk än DON då det gäller inhibering av lymfocytillväxt hos kyckling (Schatzmayr et al., 2006). De-epoxy DON har även visat sig vara 50 gånger mindre toxisk än DON då det gäller inhibering av celledelning (Sundstøl Eriksen et al., 2004).



Figur 1. Struktur av (a) DON och (b) de-epoxy DON.

### T-2 toxin

T-2 toxin (figur 2a) deacetyleras till HT-2 toxin (figur 2b) och T-2 triol (figur 2d) av mikroorganismerna i våmmen. Hos får har det har påvisats att protozofraktionerna av våmvätskan är mer aktiv än bakteriefractionen vid nedbrytningen (Kiessling et al., 1984). En annan studie har detekterat nedbrytning av T-2 toxin i renkulturer av bakterierna *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerovibrio lipolytica* och *Selenomonas ruminantum* (Westlake et al., 1987a). En deacetylering av T-2 toxin till HT-2 toxin leder inte till någon detoxifiering eftersom epoxyringen förblir intakt. I en studie av toxinmetabolismen i våmvätska från nöt har en vidare nedbrytning av T-2 toxinets metaboliter HT-2 toxin och T-2 triol till de-epoxy HT-2 toxin (figur 2c) respektive de-epoxy T-2 triol (figur 2e) detekterats (Swanson et al., 1987b). De-epoxy HT-2 toxin och de-epoxy T-2 triol har 50 gånger lägre toxicitet än T-2 toxin i en studie gjord på saltvattensräkor (Swanson et al., 1987a).

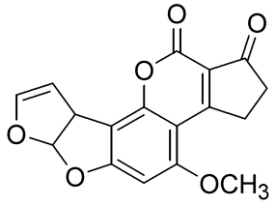


Figur 2. Struktur av (a) T-2 toxin, (b) HT-2 toxin, (c) de-epoxy HT-2 toxin, (d) T-2 triol och (e) de-epoxy T-2 Triol.

### Aflatoxin B<sub>1</sub>

Försök för att undersöka våmmikrobernas förmåga att bryta ner aflatoxin B<sub>1</sub> (figur 3) har gett olika resultat, men generellt har nedbrytningskapaciteten varit liten. Då nedbrytningen i våmmen

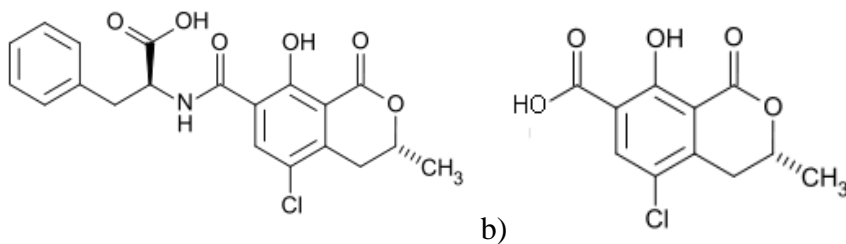
är låg har inga metaboliter detekterats (Mathur et al., 1976; Kiessling et al., 1984; Westlake et al., 1987b; Upadhaya et al., 2009).



Figur 3. Struktur av aflatoxin B<sub>1</sub>.

## Ochratoxin A

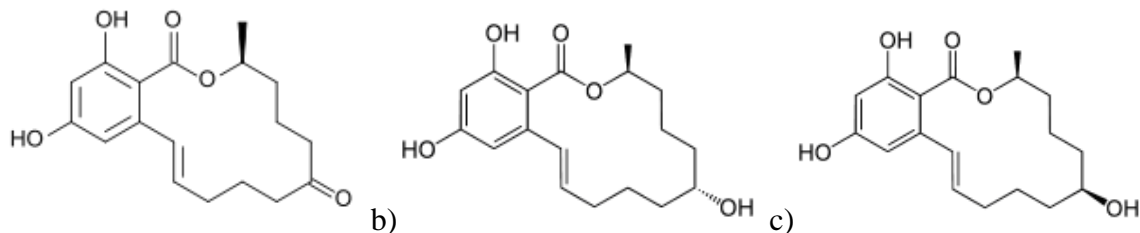
Genom *in vitro* studier har det konstaterats att ochratoxin A (figur 4a) klyvs genom hydrolys och metaboliterna ochratoxin  $\alpha$  (figur 4b) och fenyylalanin bildas (Kiessling et al., 1984; Müller et al., 1998). I en studie av en renkultur av våmbakterien *Lactobacillus vitulinus* har det påvisats att bakterier kan vara aktiva vid nedbrytning av ochratoxin A (Schatzmayr et al., 2006). Det har dock konstaterats att våmvätskans protozofraktion är mer aktiv än bakteriefractionen vid nedbrytningen (Kiessling et al., 1984). Ochtratoxin  $\alpha$  har mycket lägre toxicitet än ochratoxin A. Tillväxten av makrofager inhiberas exempelvis inte av ochratoxin  $\alpha$ , vilket den gör av ochratoxin A (Schatzmayr et al., 2006). Ochtratoxin  $\alpha$  försvinner även upp till tio gånger fortare från blodet än vad ochratoxin A gör (Li et al., 1997). Hos unga djur kan ett mycket högt toxinintag leda till döden och hos vuxna djur metaboliseras toxinet inte fullständigt vilket leder till att det kan utsöndras i mjölken (Ribelin et al., 1978).



a) b)  
Figur 4. Struktur av (a) ochratoxin A och (b) ochratoxin  $\alpha$ .

## Zearalenon

Zearalenon (figur 5a) metaboliseras till isomererna  $\alpha$ -zearalenol (figur 5b) och  $\beta$ -zearalenol (figur 5c) i våmmen hos idisslare. Protozofractionen är mer aktiv än bakteriefractionen vid nedbrytning av zearalenon. I en studie uppmättes dubbelt så mycket av metaboliten i form av  $\alpha$ -zearalenol än av  $\beta$ -zearalenol (Kiessling et al., 1984). Även Macri et al. (2005) detekterade högre halter av  $\alpha$ -zearalenol än  $\beta$ -zearalenol, men konstaterade att förhållandet mellan metaboliterna varierar beroende på djurens foderstat. Vid en annan studie observerades proportionerna mellan toxinet och dess metaboliter i duodenum vara 30 % zearalenon, 30 %  $\alpha$ -zearalenol och 40 %  $\beta$ -zearalenol (Dänicke et al., 2005). Trots att toxinet metaboliseras i våmmen så leder det inte till någon avgiftning då  $\alpha$ -zearalenol är mer än tre gånger mer östrogen än zearalenon (Hagler et al., 1979). Zearalenon som tagits upp i kroppen kan ackumuleras i gallan (Dänicke et al., 2005)



Figur 5: struktur av (a) zearalenon, (b)  $\alpha$ -zearalenol och (c)  $\beta$ -zearalenol.

## Nedbrytningskapacitet

### Deoxynivalenol

Olika studier har visat skiftande resultat när det gäller i hur stor omfattning DON metaboliseras till de-epoxy DON. I en studie av Kiessling et al. (1984) kunde ingen nedbrytning av DON i våmvätska från får detekteras inom tre timmar då 2.5 mg toxin per liter våmvätska inkuberades. Andra försök har däremot detekterat en helt eller delvis nedbrytning av toxinet. En *in vitro* studie har konstaterat fullständig nedbrytning av 10 mg DON per liter våmvätska från nötkreatur på 24 timmar. Vid högre doser kunde dock rester av toxinet detekteras (King et al., 1984). En annan *in vitro* studie med inkubering av 1 g DON per liter våmvätska från nötkreatur under 92 timmar har rapporterat en 35 procentig nedbrytning av DON till de-epoxy DON (He et al., 1992). Även *in vivo* försök har visat att DON bryts ner nästintill fullständigt till de-epoxy DON. Nötkreatur med permanentkanyler i våmmen och i duodenum utfodrades med 4.1 mg toxin per 100 kg kroppsvikt (ungefär 0.25 mg per liter våmvätska<sup>1</sup>). Det konstaterades att 88 % av det intagna toxinet metaboliserades fullständigt i förmagarna hos idisslare. Av det intagna toxinet kunde endast 4-28 % detekteras i duodenum, främst i form av de-epoxy DON (Dänicke et al., 2005). Vid en annan *in vivo* studie med samma metod fann man att 99 % av toxinet i duodenum var i form av de-epoxy DON. Under försöksperioden kunde inget DON, men däremot de-epoxy DON detekteras i blodet. Detta indikerar en mycket snabb nedbrytning av DON till de-epoxy DON samt att DON inte kan passera våmslemhinnan (Seeling et al., 2006a). Det har även konstaterats att en stor del av metaboliten de-epoxy DON bryts ner i våmmen (Dänicke et al., 2005).

### T-2 toxin

I en *in vitro* studie av T-2 toxinets nedbrytningshastighet i våmvätska inkuberades 20 mg T-2 toxin per liter våmvätska från får i tre timmar. En nedbrytning med 26 % kunde detekteras under denna period. Mängden HT-2 toxin bildades i samma takt som T-2 toxin bröts ner (Kiessling et al., 1984).

### Aflatoxin B<sub>1</sub>

Vid ett *in vitro* försök med våmvätska kunde en mindre minskning av aflatoxin B<sub>1</sub> detekteras efter 30 minuters inkubation av 0.2 mg toxin per liter våmvätska. Därefter fortsatte inte toxinkoncentrationen minska, samma minskning sågs vid inkubation i enbart buffert (Kiessling et al., 1984). Andra studier har konstaterat att viss nedbrytning av toxinet sker. Vid ett försök inkuberades 50 mg aflatoxin B<sub>1</sub> per liter våmvätska från nötkreatur. Minst 90 % av toxinet var

<sup>1</sup> Författarens anmärkning



intakt efter 24 timmars inkubering (Mathur et al., 1976). Vid en jämförelse mellan nedbrytningskapaciteten av aflatoxin B<sub>1</sub> *in vitro* i våmvätska från nötkreatur och getter konstaterades en skillnad mellan djurslagen där 20-25 % av toxinet bröts ner i våmmen hos get och 10-14 % bröts ner i våmmen hos nötkreatur. De båda djurslagen fick samma typ av foder och skötsel under försöket för att minska risken att miljöfaktorer skulle påverka resultatet. Nedbrytningen av toxinet undersöktes efter 12 timmars inkubering av 80 µg aflatoxin B<sub>1</sub> per liter våmvätska (Upadhaya et al., 2009).

## Ochratoxin A

Mängden ochratoxin A minskar i samma takt som ochratoxin  $\alpha$  ökar. Mängden toxin är således alltid densamma (Müller et al., 1998), men toxiciteten minskar i och med att ochratoxin  $\alpha$  är mindre toxisk än ochratoxin A (Li et al., 1997; Schatzmayr et al., 2006). Många *in vitro* försök där toxinets nedbrytningshastighet har undersökts påvisar en fullständig nedbrytning av ochratoxin A till ochratoxin  $\alpha$ . I en *in vitro* studie på våmvätska från får inkuberades 2 µg ochratoxin A per liter våmvätska. Toxinet bröts ner fullständigt till ochratoxin  $\alpha$  inom 30 minuter. Vid högre koncentration av toxinet, 5 µg toxin per liter våmvätska, fanns små mängder kvar efter 30 minuter men toxinet var fullständigt nedbrutet inom 1 timme (Kiessling et al. 1984). I en *in vivo* studie på får uppmättes en långsammare nedbrytningshastighet. Tre grupper fick olika doser toxin i sitt foder och vid ett intag av 387 och 774 µg (ungefär 38.7 och 77.4 µg toxin per liter våmvätska<sup>1</sup>) ochratoxin A per dag under en period på 29 dagar kunde en fullständig nedbrytning av toxinet konstateras 10-13 timmar efter utfodring. Vid en högre dos på 1161 µg toxin (116.1 µg toxin per liter våmvätska<sup>1</sup>) fanns dock låga halter av toxinet kvar. Ochratoxin  $\alpha$  kunde detekteras i våmmen vid alla provtillfällen efter intag av toxinet (Blank et al., 2003).

## Zearalenon

Vid inkubering av 2.8 mg zearalenon per liter våmvätska från får i tre timmar bröts 90 % ner till zearalenol (Kiessling et al., 1984). Nedbrytningens omfattning har även undersökts av Marci et al. (2005) som såg en lägre nedbrytningskapacitet. I studien inkuberades 100 µg zearalenon per liter våmvätska från nöt och 51.5 % av toxinet hade brutits ned efter 24 timmar. I en *in vivo* studie där nötkreatur utfodrades med zearalenonkontaminerat vete jämfördes toxinhalten i våmmen och i duodenum. Vid ett intag av 790 µg zearalenon per dag (ungefär 7.9 µg per liter våmvätska<sup>1</sup>) var halten zearalenon och dess metaboliter i duodenum 89 % av det intagna toxinet (Dänicke et al., 2005).

## Faktorer som påverkar nedbrytningskapaciteten

Våmmens skiftande nedbrytningskapacitet av mykotoxiner kan bero på flera olika faktorer. Djurets ålder kan spela roll då en äldre idisslare har en mer utvecklad våmflora och därmed ett bättre skydd än ett yngre djur. I en studie utfodrades två femveckorskalvar med 11 respektive 25 mg ochratoxin A per kilo kroppsvikt i en dos och båda kalvarna dog inom ett dygn. I samma studie utfodrades en dräktig ko med 13.3 mg ochratoxin A per kilo kroppsvikt. Dagen efter utsöndrade kon både ochratoxin A och ochratoxin  $\alpha$  i mjölken, men därefter sågs inga symptom och hon födde en frisk kalv (Ribelin et al., 1978).

---

<sup>1</sup> Författarens anmärkning

Stärkelses påverkan på nedbrytningskapaciteten av zearalenon har undersökts genom att jämföra nedbrytningskapaciteten i våmvätska tillsammans med rent koncentrat med våmvätska tillsammans med koncentrat berikat med stärkelse. Det konstaterades att efter en timmes inkubering hade toxinet i lösningen med rent koncentrat den högsta nedbrytningshastigheten. Efter 24 timmar hade dock våmvätskan med rent koncentrat brutit ner toxinet till 46.7 % och våmvätskan med det stärkelseberikade koncentratet till 37.3 % av ursprungskoncentrationen av zearalenon (Macri et al., 2005).

I en *in vivo* studie har nedbrytningen av ochratoxin A och zearalenon i våmmen med olika foder jämförts. En högkoncentratblandning som bestod av hö och koncentrat i proportionerna 3:7 jämfördes med en standardblandning med proportionerna 5:7. Nedbrytningskapaciteten av toxinerna minskade med 20 % med högkoncentratfoderstaten. I samma studie undersöktes även nedbrytningshastigheten vid tillsats av krossat spannmål i våmvätska *in vitro*. Spannmålet visade sig minska nedbrytbarheten av ochratoxin A med 29 % och zearalenon med 23 % (Kiessling et al., 1984).

I en annan studie har det undersökts hur våmmens pH relaterar till förmågan att bryta ner ochratoxin A hos får. En foderstat enbart bestående av hö resulterade i ett pH i våmmen på 6.9 och en foderstat med enbart spannmål gav ett pH på 5.2. Hydrolysen av ochratoxin A till ochratoxin  $\alpha$  i våmvätska från fåret på höfoderstat var upp till fem gånger högre än i våmvätska från fåret på spannmålsfoderstat (Xiao et al., 1991).

Vid en studie av utfodringens påverkan på nedbrytningshastigheten av aflatoxin B<sub>1</sub> samlades våmvätska från nötkreatur och getter 0, 3, 6, 9 och 12 timmar efter utfodring för att undersöka när mikrobernas aktivitet var som störst. Det visade sig att aktiviteten var högst under fasta, 9 timmar efter utfodring hos getter och 12 timmar efter utfodring hos nötkreatur. I våmvätska från getter minskade mikrobaktiviteten under de tre första timmarna efter utfodring (Upadhaya et al., 2009). I en annan studie konstaterades det att även nedbrytningskapaciteten av ochratoxin A var som högst under fasta. Efter utfodring sjönk nedbrytningshastigheten under en timme för att sedan öka fram till nästa utfodring (Kiessling et al., 1984).

Försök har gjorts för att undersöka om nedbrytningshastigheten skiljer sig mellan våmmens olika delar. I en studie samlades våminnehåll från våmmens övre och nedre del på nötkreatur. Proverna inkuberades med 100  $\mu$ g zearalenon per liter våmvätska. Nedbrytningskapaciteten tenderade att vara högre i våmvätska från våmmens undre del, men skillnaden var inte signifikant. Efter 24 timmars inkubering hade 37.4 % av toxinet brutits ner i våmvätska från våmmens övre del och 51.5 % brutits ner i våmvätskan från den nedre delen (Marci et al., 2005). I en annan studie samlades vätska från våmmens övre, nedre och mellersta del. Nedbrytningshastigheten av ochratoxin A undersöktes och en skillnad kunde endast konstateras mellan våmvätska från våmmens övre och mellersta del då djuret utfodrades med en spannmålsfoderstat. Nedbrytningshastigheten var då högst i våmmens mellersta del. Då djuret gavs en höbaserad foderstat kunde inga skillnader mellan någon av våmmens delar ses (Xiao et al., 1991).

## Diskussion

Denna litteraturstudie syftar bland annat till att sammanställa olika toxiners nedbrytningskapacitet och faktorer som påverkar denna. Till vilken grad mykotoxinerna bryts ner varierar mellan olika försök. Detta kan exempelvis bero på försöktekniska faktorer som analysmetod, hanteringen av våminnehållet, inkubationslängd, toxinmängd och var i våmmen våminnehållet är samlat. Det kan även bero på andra faktorer såsom typ av foder, djurslag, miljö och djurets ålder. Våmmens kapacitet att metabolisera mykotoxinerna kan jämföras med i vilken grad nedbrytningen leder till en avgiftning. Även om ett toxin kan brytas ner fullständigt i våmmen är det metaboliternas egenskaper som avgör om idisslaren påverkas.

Då flödet genom våmmen är såpass högt som 100-200 liter per dygn hos nötkreatur kan det spekuleras i vilken den optimala inkubationstiden i *in vitro* försök är. I vissa studier har nedbrytningskapaciteten undersökts efter 24 timmar (Mathur et al., 1976; King et al., 1984; Marci et al., 2005) och efter 92 timmar (He et al., 1992). Efter så lång tid borde rimligtvis merparten av det intagna toxinet redan ha lämnat våmmen med vätskan via bladmagen. I studien av He et al. (1992) hade det kanske varit bättre att använda sig av en lägre dos toxin och studera nedbrytningskapaciteten under en kortare tid.

Detektionsgränsen för analysmetoden som används i en studie kan också påverka resultatet. Två studier av våmmens nedbrytningskapacitet av ochratoxin A har till exempel fått olika resultat. Kiessling et al. (1984) hade en detektionsgräns på 75 ng per ml i sin studie och Blank et al. (2005) som observerade en lägre nedbrytningskapacitet hade en detektionsgräns på 1 ng per ml. Detektionsgränsen kan påverka försökens resultat genom att en hög detektionsgräns gör att provet kan anses vara fullständigt nedbrutet tidigare än i en studie med en låg detektionsgräns. Den skiftande toxinmängden som använts i olika försök kan också ge resultat som inte går att jämföra. I studier angående nedbrytningskapaciteten av aflatoxin B<sub>1</sub> har det i en studie använts 50 mg toxin per liter våmvätska (Mathur et al., 1976) och i en annan studie 80 µg toxin per liter våmvätska (Upadhaya et al., 2009). Höga toxinhalter kan även påverka studiens resultat dels genom att nedbrytningshastigheten initialt kan vara högre än vid en lägre dos, men främst för att en mycket hög dos toxin även kan verka toxiskt på mikroorganismerna vilket leder till en längre aktivitet i våmvätskan.

Nedbrytningskapaciteten för aflatoxin B<sub>1</sub> i våmmen är generellt låg. I en studie kunde en liten nedbrytning ses hos nötkreatur och getter (Upadhaya et al., 2009). Det kunde dock Kiessling et al. (1984) även se med enbart buffert. Detta skulle kunna tyda på att toxinet är instabilt och kanske har påverkats av andra faktorer än våmvätskans mikroorganismer. Upadhaya et al. (2009) kunde dock inte se någon nedbrytning alls i sitt kontrollprov som bestod av autoklaverad våmvätska.

Då våminnehållet i flera *in vitro* studier har filtrerats och de största fasta partiklarna därmed har sorterats ut från våmvätskan skiljer sig inkubationsmediet en del från den naturliga våmmiljön. Mikroorganismer med en livslängd längre än 8-16 timmar måste sitta fästa på våmväggen eller på foderpartiklarna i våmmen. När våminnehållet filtreras tas foderresterna och därmed en del av protozoofloran bort och endast våmvätskan analyseras. Detta skulle kunna påverka studiernas resultat då protozoerna spelar en stor roll vid toxinerens nedbrytning. Även i studien av Kiessling et al. (1984), där bakterie- och protozofractionen separerades, filtrerades våminnehållet.

Filtrationen släppte alltså igenom en del av protozoofloran, men man kan anta att våmvätskan i *in vitro* studier i regel har ett lägre protozoinehåll än i studier där hel våmvätska använts eller i *in vivo* studier. Vid *in vitro* studier riskerar även våminnehållet och mikroberna att utsättas för syre under samling och bearbetning. Om hanteringen inte sker under anaeroba förhållanden riskerar även detta att påverka studiens resultat. Foder har visat sig kunna ha inhiberande effekter på våmmikrobernas nedbrytningskapacitet *in vitro* (Kiessling et al. 1984; Marci et al. 2005) Detta kan bland annat bero på att mikrobernas toxinmetabolism hämmas av foderpartiklarna i våmvätskan.

I en våmsimulator kan vissa processer som annars inte sker *in vitro* simuleras, till exempel våmkontraktioner. Detta gör våmsimulatoren till lite av ett mellanting mellan de konventionella *in vitro* studierna och *in vivo* studier. Den mest sanna bilden av våmmens nedbrytningskapacitet fås antagligen av *in vivo* studier. Det sker då en naturlig nedbrytning av toxinerna och toxinets påverkan på våmmiljön, till exempel på våmkontraktionerna får spela in. Det kan även vara en fördel att använda naturligt kontaminerat foder i *in vivo* försök istället för rent toxin då det kan en roll för toxinets tillgänglighet för mikroorganismerna. En nackdel med *in vivo* studier är att individuella faktorer kan spela större roll än i *in vitro* studier. Enligt en studie av Cook et al. (1986) finns risken för att våmmen kan återkontamineras av aflatoxin B<sub>1</sub> som har tagits upp av blodet och som sedan utsöndrats i saliven och åter svalts ner i våmmen. Det finns även andra risker för återkontaminering. Zearalenon lagras in i gallan och kan därmed utsöndras i duodenum (Dänicke et al., 2005). Vid mätningar i tarmen under *in vivo* försök kan ackumulerat zearalenon därför ge ett för studien irrelevant värde. De kvantitativa mätningarna av toxininnehållet i våmmen och duodenum i *in vivo* studier kan därför inte vara helt tillförlitliga.

Typ av foder spelar in när man undersöker våmmikrobernas kapacitet att bryta ner olika toxiner. Spannmål och koncentrat minskar nedbrytningskapaciteten av toxiner i våmmen jämfört med om djuret äter mer grovfoder (Kiessling et al., 1984; Xiao et al., 1991). En spannmålsfoderstat ger ett lägre pH än en grovfoderfoderstat och ett lågt pH-värde inhiberar mikrobernas aktivitet i våmmen. Protozoerna är speciellt känsliga för låga pH-värden (Xiao et al., 1991) och eftersom de är mest aktiva vid nedbrytningen av flera mykotoxiner (Kiessling et al., 1984) är detta förmodligen en del av orsaken till den minskade nedbrytningskapaciteten som observerats när spannmålets påverkan undersökts *in vitro* och *in vivo*. Då pH i våmmen sjunker under de 1-3 första timmarna efter utfodring (Kiessling et al., 1984; Upadhaya et al., 2009) kan detta även vara orsaken till den lägre nedbrytningshastigheten den första tiden efter utfodring. Vid en jämförelse mellan en koncentratfoderstat och en foderstat innehållande koncentrat berikat med stärkelse sågs dock en högre nedbrytningskapacitet på stärkelsefoderstaten (Marci et al., 2005). Detta kan tyda på att stärkelsen fungerar bättre som substrat åt mikroberna än det rena koncentratet vilket får mikroberna att tillväxa och nedbrytningskapaciteten i våmmen att öka.

Det finns djurslagsskillnader mellan våmmens nedbrytningskapacitet av mykotoxiner. Upadhaya et al. (2009) kunde se en skillnad mellan nötkreatur och getter när det gällde nedbrytningskapaciteten av aflatoxin B<sub>1</sub>. Djurslagsskillnader skulle kunna utnyttjas då det gäller att förbättra våmfloran hos de mindre anpassade djuren. Genom att överföra mikroorganismer från ett djur som är mer resistent mot mykotoxiner till ett djur med mindre resistens kan motståndskraften öka. Detta kan vara till nytta om problemet med mykotoxinkontaminerat foder kommer att öka, exempelvis till följd av klimatförändringar (SOU, 2007:60). Att överföra mikroorganismer skulle även kunna utnyttjas då man ser skillnader mellan individer och djur som

fötts upp under olika förutsättningar. Då produktionsdjur idag, exempelvis mjölkkor, skiljs från sina kalvar väldigt snart efter födseln finns risken för att kalvarna aldrig kommer att få en fullt utvecklad protozooflora. Även här skulle man kunna förbättra våmmens kapacitet att bryta ner mykotoxiner genom att föra över mikroorganismer som gynnar detta.

Trots att flera toxiner teoretiskt kan brytas ner fullständigt i våmmen finns risken för förgiftning vid ett högt intag av mykotoxiner. Våmmens mikroorganismer har en liten eller ingen effekt på detoxifieringen av aflatoxin B<sub>1</sub> och zearalenon. Det har på senare tid påvisats en viss nedbrytning av aflatoxin B<sub>1</sub>, men fler studier på området behövs för att undersöka förutsättningarna och vilka metaboliter som bildas. Zearalenon bryts ner av våmmens mikroorganismer, trots det sker ingen avgiftning då metaboliten  $\alpha$ -zearalenol är mer toxiskt än det ursprungliga toxinet. Våmmens mikrober kan skydda helt eller delvis mot DON, ochratoxin A och T-2 toxin. För att kunna få säkrare resultat samt för att kunna jämföra både *in vitro* och *in vivo* studier behöver våmmiljön studeras ytterligare och standardiserade mätmetoder borde utvecklas.

## Referenser

- Blank, R., Rolfs, J-P., Südekum, K-H., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R., Wolfram, S. 2003. Effects of Chronic Ingestion of Ochratoxin A on Blood Levels and Excretion of the Mycotoxin in Sheep. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6899-6905.
- Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Trampel, D.W. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>. *American Journal of Veterinary Research* 47, 1817-1825.
- Dänicke, S., Matthäus, K., Lebzien, P., Valenta, H., Stemme, K., Ueberschär, K.-H., Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J., Flachowski, G. 2005. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89, 303-315.
- Hagler, W.M., Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Behrens, J.C. 1979. Identification of the Naturally Occurring Isomer of Zearalenol Produced by *Fusarium roseum* "Gibbosum" in Rice Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 849-853.
- He, P., Young, L.G., Forsberg, C. 1992. Microbial Transformation of Deoxynivalenol (Vomitoxin). *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3857-3863.
- Hobson, P.N. 1997. The rumen and its development. In: *The Rumen Microbiological Ecosystem*. Volym 2 (eds. P.N Hobson, C.S. Stewart), 3-5. St Edmundsbury Press, Suffolk, UK.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101-13
- Kiessling, K-H., Pettersson, H., Sandholm, K., Olsen, M., 1984. Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone, and Three Trichothecenes by Intact Rumen Fluid, Rumen Protozoa, and Rumen Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1070-1073.
- 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.
- Li, S., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Crow, G. 1997. Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 145, 82-90.
- Marci, A., Schollenberger, M., Drochner, W., Tafaj, M., Morar, M.V. 2005. Investigation on the "In vitro" degradation of zearalenone in rumen fluid. *Mycotoxin Research* 21, 65-67.
- Mathur, C.F., Smith, R.C., Hawkins, G.E. 1976. Growth and Morphology of *Streptococcus bovis* and of Mixed Rumen Bacteria in the Presence of Aflatoxin B<sub>1</sub>, In Vitro. *Journal of Dairy Science* 59, 455-458.
- Morgavi, D.P., Riely, R.T. 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137, 201-212.
- Müller, H-M., Lerch, C., Müller, K., Eggert, W. 1998. Kinetic Profiles of Ochratoxin A and Ochratoxin  $\alpha$  During *In Vitro* Incubation in Buffered Forestomach and Abomasal Contents from Cows. *Natural Toxins* 6, 251-258.
- Ribelin, W.E., Fukushima, K., Still, P.E. 1978. The Toxicity of Ochratoxin to Ruminants. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 42, 172-176.
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A.P., Binder, E.M. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 543-551
- Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E., Flachowsky, G. 2006a. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Additives and Contaminants* 23, 1008-1020.

- Seeling, K., Boguhn, J., Strobel, E., Dänicke, S., Valenta, H., Ueberschär, K.H., Rodehutschord, M. 2006b. On the effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilization and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). *Toxicology in Vitro* 20, 703-711.
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K., Sand, O. 2003. Microorganisms in the Rumen. In: *Physiology of Domestic Animals*. Volym 1 (eds. C. Steel), 517-520. Scandinavian Veterinary Press, Oslo.
- SOU. 2007:60. Statens offentliga utredningar. Bilaga B 34, Hälsoeffekter av en klimatförändring i Sverige, kap. 6: Hälsoeffekter av klimatets påverkan på foder och livsmedel. Arbetsgruppen för hälsa.
- Sundstøl Eriksen, G., Pettersson, H., Lundh, T. 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* 42, 619-624.
- Swanson, S.P., Rood, H.D. Jr., Behrens, J.C., Sanders, P.E. 1987a. Preparation and Characterization of the Deepoxy Trichothecenes: Deepoxy HT-2, Deepoxy T-2 Tetraol, Deepoxy 15-Monoacetoxyscripenol and Deepoxy Scripenol. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2821-2826.
- Swanson, S.P., Nicoletti, J., Rood, H.D. Jr., Buck, W.B., Côte., L.M. 1987b. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxycirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *Journal of Chromatography* 414, 335-342.
- Upadhaya, S.D., Sung, H. G., Lee, C.H., Lee, S.Y., Kim, S.W., Cho, K.J, Ha, J.K. 2009. Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. *Journal of Veterinary Science* 10, 29-31.
- Westlake, K., Mackie, R.I., Dutton, M.F. 1987a. T-2 Toxin Metabolism by Ruminal Bacteria and Its Effect on Their Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 587-598.
- Westlake, K., Mackie, R.I., Dutton, M.F. 1987b. Effects of Several Mycotoxins on Specific Growth Rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and Toxin Degradation In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 613-614.
- Xiao, H., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A., Phillips, G.G., Vitti, T.G. 1991. Effect of a hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *Journal of animal science* 69, 3706-3714.
- Yiannikouris, A., Jouany, J-P. 2002. Mycotoxins and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51, 81-99.