



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014 – 2015

Mycotoxinen in de melkveehouderij: voorkomen en invloed van DON op de pensfermentatie

Emilie Costers

Promotor: Prof. dr. ir. Geert Haesaert

Promotor: Prof. dr. ir. Veerle Fievez

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2014 – 2015

Mycotoxinen in de melkveehouderij: voorkomen en invloed van DON op de pensfermentatie

Emilie Costers

Promotor: Prof. dr. ir. Geert Haesaert

Promotor: Prof. dr. ir. Veerle Fievez

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de biowetenschappen: land- en tuinbouwkunde

Auteursrechtelijke bescherming

De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de masterproef te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elke ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

Student
Emilie Costers

Promotor
Prof. dr. ir. G. Haesaert

Woord vooraf

Graag zou ik van de gelegenheid willen gebruik maken om alle mensen te bedanken die hebben meegeholpen met het realiseren van deze masterproef.

Eerst en vooral wil ik Dimitri Valckenier (buitenpraktijk UGent) bedanken voor het aanreiken van dit thesis onderwerp, dit na talrijke problemen bij heel wat bedrijven die aangesloten zijn bij de buitenpraktijk.

Mijn dank gaat speciaal uit naar mijn promotors Prof. dr. ir. Geert Haesaert en Prof. dr. ir. Veerle Fievez voor de goede begeleiding, tips, uitleg en het nalezen van mijn masterproef. Ook Prof. Dr. Geert Opsomer wil ik bedanken voor het helpen op starten van deze thesis en de verder begeleiding erna.

Verder wil ik ook graag Eddy Decaesteker van Inagro en Gert Van de Ven van de hooibeekhoeve bedanken voor het aanreiken van melkveebedrijven waar ik een enquête mocht afnemen en een staal van het TMR nemen. Ook alle melkveebedrijven die hier hebben aan meegewerkt verdienen een woord van dank.

Ook aan Charlotte Melis, een woord van dank voor de goede begeleiding tijdens de *in vitro* incubaties.

Mijn dank gaat ook uit naar Jan Verwaeren en Dr. ir. Kris Audenaert van de Universiteit Gent voor de hulp tijdens de verwerking van de resultaten.

Graag wil ik Dieter Vanparys (ID-Nutrition) en Tilly Haertjens (Alltech) bedanken voor de info rond mycotoxine binders.

Een speciaal woord van dank aan mijn vriend, Jeroen, voor zijn onvoorwaardelijke steun en begrip. Ook bij het verzamelen van de stalen en opstellen van de inhoudstafel stak hij graag een handje toe waarvoor ik hem heel dankbaar voor ben.

Als laatste wil ik mijn ouders bedanken voor hun oprechte steun, begrip en raad tijdens mijn studies en het maken van mijn masterpoef.

Emilie Costers
Oedelem, mei 2015

Abstract

Mycotoxinen zijn giftige verbindingen die geproduceerd worden door schimmels. Melkvee is relatief tolerant tegen mycotoxinen dankzij de detoxificatie eigenschappen van de pens. Het vervoederen van met mycotoxine gecontamineerd voeder aan runderen met een slecht functionerende pens (o.a. pensverzuring) kan echter wel problemen opleveren. Bovendien kan elke voedercomponent van het rantsoen mycotoxinen bevatten, die kunnen intrageren. Bijgevolg is het van belang het mycotoxine gehalte van het totale rantsoen (TMR) te bepalen. Daarom werden in het eerste deel van de praktijkstudie op 23 melkveebedrijven, verspreid over Vlaanderen, TMR stalen verzameld en het mycotoxine gehalte bepaald. Ook werd op deze bedrijven een enquête afgenomen om een verband na te gaan tussen het vastgestelde DON gehalte en de locatie, eventuele ervaringen met mycotoxinen, in en-, uitkuilmanagement, rantsoeneigenschappen en teeltsysteem. Er werd een significante interactie gevonden tussen het DON gehalte en een melkproductiedaling (Mann-Whitney U of $MWU < 0,046$), het oogsten van de maïs in 2013 ($295,63 \mu\text{g/kg}$) of 2014 ($729,50 \mu\text{g/kg}$) ($MWU < 0,021$) en de leeftijd van plastic gebruikt voor kuilafdekking ($MWU < 0,008$).

In het tweede deel van de praktijkstudie werden *in vitro* incubaties uitgevoerd waarbij maïsgraan gespiked werd met 0, 5, 10 of 15 ppm DON, die gedurende 1, 3, 6 of 24 u werden geïncubeerd met pensvocht bij een pH 6,8 of 5,8. Uit de proef blijkt dat DON geen effect (Wilks's Lambda of $WL = 0,479$) heeft op de totale vetzuurproductie en dus op pensfermentatie. Wel werd een significante interactie ($WL < 0,039$) gevonden tussen de vetzuurproductie, pH en DON concentratie. Dit effect was zichtbaar vanaf 10 ppm DON en was het grootst bij pH 6,8.

Kernwoorden: Mycotoxinen, TMR, DON, vetzuurproductie, pensverzuring

Abstract

Mycotoxins are poisonous connections produced by fungus. Dairy cattle is relatively tolerant against these mycotoxins thanks to detoxification qualities of the rumen. The feeding with contaminated fodder to cows with a badly working rumen (like rumen acidosis) could be problematic. On the other hand, every element of the forage share could contain possibly interacting mycotoxins. This means, it's very important to measure to amount of mycotoxin present in the total forage. Because of this, samples were collected from 23 dairy companies in Flanders during the case study. These companies were also asked to fill in a survey to be able to check the relation between the established DON-level, the location, possible experiences with mycotoxins, pit-management, ration qualities and the cultivation system. A significant interaction was found amongst the DON-level and the lowering of the milk production (Mann-Withney U or MWU<0,046), the corn harvest in 2013 (295,63 µg/kg) or 2014 (729,50 µg/kg) (MWU<0,021) and the age of the plastic used for pit covering (MWU<0,08).

During the second part of the case study, "in vitro incubations" were realized. Corn grain was spiked with 0, 5, 10 or 15 ppm DON, which was incubated with rumen fluids with a pH of 6,8 or 5,8 during 1, 3, 6 or 24 hours. The examination proved that DON doesn't have any effect (Wilk's Lambda or WL = 0,479) on the total carboxylic acid production leading to abdomen fermentation. A significant interaction (WL<0,039) was measured between the carboxylic acid production, the pH and the DON concentration. This effect was clearly visible from 10 ppm DON and was the largest at a pH of 6,8.

Keywords: Mycotoxins, TMR, DON, carboxylic acid production, rumen acidosis

Inhoudsopgave

Woord vooraf	5
Abstract	6
Abstract	7
Inhoudsopgave	8
Lijst met figuren	10
Lijst met tabellen	10
1. Inleiding en probleemstelling	12
2. Literatuurstudie	14
2.1. Wat zijn mycotoxinen?	14
2.2. De belangrijkste mycotoxinen	17
2.2.1. Aflatoxinen	18
2.2.2. Ochratoxine A	20
2.2.3. Fumonisin	22
2.2.4. Zearalenone	23
2.2.5. Trichothecenen	24
2.2.5.1. Trichothecenen A	25
2.2.5.1.1. T-2 toxine	25
2.2.5.1.2. Diacetoxyscirpenol	26
2.2.5.2. Trichothecenen B	26
2.2.5.2.1. Deoxynivalenol	26
2.2.5.2.2. Nivalenol	28
2.2.6. Patuline	28
2.2.7. Roquefortine C	29
2.2.8. Mycofenolzuur	29
2.2.9. Citrinine	30
2.3. Teruggevonden gehalten in het voeder van melkvee	30
2.3.1. Ruwvoerders	30
2.3.1.1. Maïskuil	31
2.3.1.2. Graskuil	32
2.3.2. Krachtvoerders	32
2.3.3. Bijproducten	33
2.3.4. TMR	33
2.4. Toegelaten gehalten	35
2.5. Mycotoxinen en het pensmetabolisme	36
2.5.1. Biodegradatie van mycotoxinen in de pens	36
2.5.2. Invloed van mycotoxinen op het pensmetabolisme	38
2.6. Maatregelen om het mycotoxine gehalte in het voeder te beperken	38
2.6.1. Schimmelgroei en micotoxinen productie reduceren	39
2.6.1.1. Resistente rassen	39

2.6.1.2. Teelrotatie en ploegen	39
2.6.1.3. Andere maatregelen binnen het kader van goede landbouwpraktijken	40
2.6.2. Detoxificatie van het besmet voeder	41
2.6.3. De biologische beschikbaarheid van mycotoxinen verminderen	42
3. Materiaal en methode	45
3.1. Het voorkomen van mycotoxinen in de TMR	45
3.2. <i>In vitro</i> incubatie met DON	45
3.3. Statistische verwerking	47
4. Resultaten	47
4.1. Het voorkomen van mycotoxinen in de TMR	47
4.1.1. Het mycotoxine gehalte in de TMR	47
4.1.2. Enquête	49
4.2. Incubatie met DON	55
4.2.1. De invloed van DON op de vetzuurproductie	55
4.2.2. De afbraak van DON	55
4.3. Incubatie met DON bij pensverzuring	55
4.3.1. De invloed van DON op de vetzuurproductie bij pensverzuring	55
4.3.2. De afbraak van DON bij pensverzuring	58
5. Discussie	58
5.1. Het voorkomen van mycotoxinen in de TMR	58
5.1.1. Het mycotoxine gehalte in de TMR	58
5.1.2. Enquête	59
5.2. Incubatie met DON	61
5.2.1. De invloed van DON op de vetzuurproductie	61
6. Algemene besluit	64
Referentielijst	65
Bijlagen	70
Bijlage 1: Het voorkomen van mycotoxinen in maiskuil	70
Bijlage 2: Het voorkomen van mycotoxinen in graskuil	72
Bijlage 3: Het voorkomen van mycotoxinen in krachtvoeder grondstoffen	74
Bijlage 4: Het voorkomen van mycotoxinen in bij producten	77
Bijlage 5: De enquête	78

Lijst met figuren

Figuur 1: De locatie van de deelnemende bedrijven	45
Figuur 2: De gemiddelde en standaarddeviatie van de totale vetzuurproductie in functie van de incubatieduur en het DON gehalte en de resultaten van de verwerking	55
Figuur 3: De gemiddelde en standaarddeviatie van de vetzuurproductie in functie van de incubatieduur, DON concentratie en pH en resultaten van de statistische verwerking	56
Figuur 4: De gemiddelde en standaarddeviatie van de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding in functie van de incubatieduur, DON concentratie en pH en resultaten van de statistische verwerking	57
Figuur 5: De gemiddelde en standaarddeviatie van de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding van in functie van de incubatieduur, DON concentratie en de proef en resultaten van de statistische verwerking	63

Lijst met tabellen

Tabel 1: De verschillende schimmelsoorten met hun bijhorende mycotoxine en het voedermiddel dat ze contamineren	16
Tabel 2: Aflatoxinen concentraties en hun bijhorend effect op herkauwers	20
Tabel 3: OTA concentraties en hun bijhorende effecten op herkauwers (Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)	22
Tabel 4: Verschillende fumonisinen concentraties en hun bijhorend effect op runderen	23
Tabel 5: ZEN concentraties en hun bijhorende effecten op herkauwers (Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)	24
Tabel 6: T-2 concentraties en hun bijbehorend effect (Hussein & Brassel, 2001)	26
Tabel 7: DON concentraties en hun bijhorend effect op herkauwers	28
Tabel 8: De mycotoxinen die aanwezig zijn in een TMR	35
Tabel 9: Actiedrempels (ppm) in diervoeders herleid tot 12 % vocht volgens de GMP-code OVOCOM versie 2012 en FAO (Declerck <i>et al.</i> , 2009; Devreese, <i>et al.</i> , 2013; OVOCOM, 2014)	36
Tabel 10: De pH van de buffer, pensvloeistof en buffer+pensvloeistof	47
Tabel 11: Het mycotoxine gehalte ($\mu\text{g/kg}$) van de verschillende mengvoeders	48
Tabel 12: De gemiddelde, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van DON gehalten in West- en Oost-Vlaanderen en Antwerpen	49
Tabel 13: Gemiddelde standaardafwijkingen en resultaten van de verwerking van de symptomen	50
Tabel 14: Gemiddelde, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van vragen in verband met inkuilproces	51
Tabel 15: Gemiddelde, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van vragen in verband met uitkuilproces	53

Tabel 16: Gemiddelde, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van vragen in verband met de rantsoeneigenschappen	54
Tabel 17: Gemiddelde, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van vragen in verband met het teeltsysteem	54
Tabel 18: Het effect op de pH en DON concentratie op de totale vetzuurproductie (μmol)	57
Tabel 19: Het voorkomen van mycotoxinen in maïskuil	70
Tabel 20: Het voorkomen van mycotoxinen in graskuil	72
Tabel 21: Het voorkomen van mycotoxinen in krachtvoedergrondstoffen	74
Tabel 22: Het voorkomen van mycotoxinen in bijproducten (Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)	77

1. Inleiding en probleemstelling

Mycotoxinen waren altijd al aanwezig in onze omgeving. Toch is de erkenning van de negatieve invloed op productiviteit en gezondheid van runderen relatief nieuw. Waarom mycotoxinen plots een probleem geworden zijn, kan verklaard worden door het feit dat de melkproductie per koe de laatste jaren sterk is toegenomen. Hoog productieve melkkoeien zouden gevoeliger zijn voor mycotoxinen. Ook de klimaatsverandering kan hier een rol in spelen door het feit dat verhoging van temperatuur en meer extreme weersomstandigheden (met bijvoorbeeld hogere neerslagintensiteit op kortere tijd) meer optimale omstandigheden genereert voor schimmelontwikkeling.

Het grote probleem met mycotoxinen in de melkveehouderij is dat er nog maar weinig over geweten is. Zo zijn er nog heel wat onbeantwoorde vragen over welke gehalten aan mycotoxinen nu problemen kunnen veroorzaken bij melkvee. Een bijkomend probleem is het feit dat bepaalde mycotoxinen mogelijke synergetische effecten kunnen hebben indien ze samen voorkomen. Ook rijzen er vele vragen over de detoxificatie capaciteit van de pens bij hoogproductieve dieren, runderen met pensverzuring en koeien met metabole stoornissen. Verder wordt de vraag gesteld of langdurige blootstelling aan lage concentraties van mycotoxinen tot chronische problemen kunnen leiden.

Een ander probleem is dat het *in vitro* en *in vivo* onderzoeken die gebeurd is meestal gesteund is op zeer hoge concentraties die slechts zelden worden vastgesteld in de praktijk. Ook is er weinig geweten over welke mycotoxinen aanwezig zijn in het volledige rantsoen (*Total Mixed Ration* of TMR) van melkvee en wat hun concentraties zijn. Naar het voorkomen van mycotoxinen en hun concentratie in de afzonderlijke voedermiddelen is wel al heel wat onderzoek verricht.

Om op enkele van de vele vragen een antwoord te kunnen geven, werd besloten een Masterproef op te stellen in verband met mycotoxinen in de melkveehouderij. Hierbij wordt eerst en vooral getracht om een antwoord vinden op de volgende onderzoeksvraag: 'Welke mycotoxinen komen voor in een TMR?'. Verder wordt via een enquête nagegaan welke factoren (locatie, eventuele ervaringen met mycotoxinen, in- en-, uitkuilmanagement, rantsoeneigenschappen en teeltsysteem) een invloed hebben op het mycotoxine gehalte van een TMR.

Tot slot wordt getracht om met behulp van een *in vitro* incubatie een antwoord te vinden op vraag of DON een invloed heeft op de totale vetzuurproductie en of deze invloed verandert wanneer de incubatie wordt uitgevoerd bij acidotische omstandigheden. Verder wordt de afbraaksnelheid van DON in beide proeven onderzocht waarbij opnieuw de vraag kan gesteld worden of deze verandert in acidotische omgeving en hoge concentraties.

Ter voorbereiding op het praktische gedeelte, wordt een literatuurstudie geschreven. Eerst wordt besproken wat mycotoxinen zijn. Daarna volgt een opsomming van de belangrijkste mycotoxinen in België. In het deeltje hierna wordt per voedermiddel aangehaald welke

mycotoxinen er kunnen voorkomen en in welke concentraties. Daarna volgt een opsomming van de maximaal toegelaten gehalten. Dit wordt gevolgd door de bespreking van de biodegradatie capaciteit van de pens. Als laatste worden alle maatregelen besproken die het mycotoxinen gehalte in het voeder kunnen beperken.

In het eerste praktische deel wordt nagegaan welke mycotoxinen voorkomen in de TMR van melkvee en in welke concentratie deze mycotoxinen voorkomen. De stalen worden op 23 melkveebedrijven genomen. De bedrijven werden zodanig gekozen dat alle belangrijke melkveestreken van Vlaanderen vertegenwoordigd waren. Eerst en vooral wordt nagegaan of de gevonden waarden overeen komen met de literatuur. Verder wordt gecontroleerd of de toelaatbare waarden wordt overschreden. Ook wordt er nagegaan of er een verband bestaat tussen het voorkomen van één bepaalde mycotoxine en de overige mycotoxinen in de TMR. Tot slot wordt er nagegaan of er een verschil is tussen de mycotoxinen concentraties die vast gesteld zijn op de bedrijven in West - en Oost Vlaanderen en tussen de bedrijven in Antwerpen.

Op dezelfde bedrijven waar een staal werd genomen van de TMR wordt ook een enquête afgenomen om de mycotoxinen problematiek in kaart te brengen en na te gaan of bepaalde factoren een invloed kunnen hebben op de aanwezigheid van de mycotoxinen en het mycotoxinen gehalte.

Het tweede praktische gedeelte is een *in vitro* simulatie van de pensfermentatie die wordt onderverdeeld in twee verschillende proeven. In een eerste proef wordt nagegaan of DON een invloed heeft op de pensfermentatie, waarbij de totale vetzuurproductie hiervoor als maat wordt gebruikt. Ook de afbraaksnelheid van DON wordt onderzocht. In de tweede proef wordt het eerste onderzoek herhaald, maar wordt nu uitgevoerd bij twee verschillende pH's. Deze pH's zijn pH 6,8 wat overeenkomt met een gezonde koe en pH 5,8 wat een koe met pensverzuring moet simuleren.

2. Literatuurstudie

2.1. Wat zijn mycotoxinen?

Mycotoxinen zijn giftige chemische verbindingen met een laag molecuul gewicht geproduceerd door bepaalde species die behoren tot de geslachten *Aspergillus*, *Penicillium* of *Fusarium* (Rodrigues, 2014). Het zijn secundaire metabolieten die door deze toxigene schimmels tijdens de infectie en kolonisatie van waardplanten worden geproduceerd (Jouany & Diaz, 2005; Rodrigues, 2014; Yiannikouris & Jouany, 2002). De contaminatie met mycotoxinen van oogstbare plantendelen veroorzaakt ernstige agrarische economische schade (Jouany & Diaz, 2005; Upadhaya *et al.*, 2010). Naast de productie van mycotoxinen kan een schimmelbesmetting ook een verminderde kwaliteit en opbrengst van teelt teweeg brengen (Landschoot *et al.*, 2012).

Schimmels die mycotoxinen produceren komen vaak voor in de natuur en komen in contact met ruwvoeders en granen op het veld, tijdens de oogst, tijdens het transport en tijdens de opslag (Devreese *et al.*, 2013; Jouany & Diaz, 2005; Upadhaya *et al.*, 2010). Hierdoor maakt men een onderscheid tussen veldschimmels zoals *Fusarium* en bewaarschimmels zoals *Penicillium* en *Aspergillus*. Onder normale omstandigheden zijn veldschimmels zelf niet in staat de overgang van veld naar de voeding te overleven. De mycotoxinen blijven wel aanwezig op en in het geoogste product, hoewel ze niet visueel waarneembaar zijn. Voedergewassen kunnen dus visueel van goede kwaliteit zijn, maar ze kunnen wel nog altijd besmet zijn met grote hoeveelheden mycotoxinen. Toch is de grens tussen veld- en bewaarschimmels niet altijd even duidelijk. Als voorbeeld kunnen hier de *Fusarium* soorten aangehaald worden. Ze groeien tijdens de veldfase maar kunnen ook op/in geoogste producten groeien, bijvoorbeeld bij een slechte bewaring. Anderzijds kunnen *Penicillium* en *Aspergillus* soorten op het einde van het groeiseizoen droge plantendelen infecteren (Haesaert, 2014).

Het bewaarproces beïnvloedt de aanwezigheid van kuilschimmels.

Een schimmelbesmetting van de plant en de vorming van de toxinen is afhankelijk van de omgevingsfactoren zoals klimatologische omstandigheden (Audenaert *et al.*, 2013b; Yiannikouris & Jouany, 2002), cellulaire signalen (Audenaert *et al.*, 2013b), aanwezigheid van andere schimmels (Landschoot *et al.*, 2012), oogstmethode (Yiannikouris & Jouany, 2002) en het chemotype van de schimmelsoort (Upadhaya *et al.*, 2010). Een chemotype duidt op het feit dat schimmelsoorten onderscheidbaar kunnen zijn op basis van een verschil in chemische samenstelling van de secundaire metabolieten. In Tabel 1 zijn de belangrijkste mycotoxinen opgesomd met hun corresponderende schimmels en hun bijhorende voedermiddelen die ze contamineren. Eén schimmel kan in staat zijn om verschillende mycotoxinen te produceren en verschillende schimmels kunnen een zelfde mycotoxine produceren. Schimmels die eenzelfde mycotoxine produceren behoren tot eenzelfde chemotype. Om deze reden is het moeilijk om een correlatie te maken tussen de mycotoxinen en de aanwezige schimmels. (Jouany & Diaz, 2005)

De aanwezigheid van de schimmel betekent niet dat er mycotoxinen aanwezig zijn (Jouany & Diaz, 2005) en omgekeerd betekent de visuele afwezigheid van de schimmel niet dat geen mycotoxinen aanwezig zijn, omdat de toxine producerende schimmel al kan afgestorven zijn (Jouany & Diaz, 2005; Tangni *et al.*, 2013). Zo is de correlatie tussen de symptomen van aarfusarium en de aanwezigheid van deoxynivalenol sterk variabel, en varieert van geen tot een sterk positieve correlatie. De variatie wordt hier verklaart door de complexe aarfusariumpopulaties, door het feit dat *F.graminearum* en *F.culmorum* ook van het nivalenol of NIV chemotype kunnen zijn en tot slot kan *F. nivale* aarfusarium induceren maar is niet in staat DON te produceren. (Landschoot *et al.*, 2012)

De reden waarom schimmels mycotoxinen produceren is volgens Rodrigues (2014) nog niet helemaal duidelijk. Ze kunnen een hulpmiddel zijn om het verdedigingsstelsel van de plant te omzeilen en zo de plant te kunnen koloniseren (Audenaert *et al.*, 2013a; Audenaert *et al.* 2013b; Rodrigues, 2014). Aarfusarium groeit in de eerste fase na de infectie biotroof in de intercellulaire ruimten. In deze fase heeft DON geen enkele rol. Daarna zal de schimmel meer intracellulair gaan groeien waardoor necrose en celdood optreedt. Hier is DON noodzakelijk voor de verspreiding van de schimmel in de spil van tarwe. Hoge concentraties DON leiden tot de activatie van de H_2O_2 synthese wat celdood veroorzaakt. Dit is een verdedigingsstelsel van de plant waarmee het de rest van plant probeert te beschermen tegen het verder verspreiden van de schimmel in de plant. Verder is er aangetoond dat H_2O_2 de productie van DON induceert, vooral in een vroeg stadium van sporevorming. Anderzijds wordt DON ook gebruikt om het primaire C en N metabolisme van de plant te misleiden om zo de groei van de schimmel te bevorderen en de productie van virulentiefactoren tegen de plant te verbeteren. (Audenaert *et al.* 2013b)

Een andere theorie is dat de mycotoxinen de schimmels kunnen helpen concurreren in hun ecologische niche (Alltech, 2008; Rodrigues, 2014). Toch is van heel wat mycotoxinen de rol voor de schimmel nog niet gekend (Haesaert, 2014).

Zoals eerder al aangehaald, bestaan er heel veel verschillende mycotoxinen die door de grote variatie in hun chemische structuur verschillende symptomen bij dieren kunnen veroorzaken (Yiannikouris & Jouany, 2002).

De biologische effecten van mycotoxinen zijn dus afhankelijk van de aard van het toxine maar worden ook bepaald door de hoeveelheid opgenomen toxine, de tijd van blootstelling aan de mycotoxinen en de gevoeligheid van de diersoort (Upadhaya *et al.*, 2010). Zo zijn de symptomen vaak meer uitgesproken bij de éénmagige dieren dan bij de herkauwers (Fink-Gremmels, 2008b; Rodrigues, 2014) door de aanwezigheid van de pens. In vele gevallen vindt in de pens een detoxificatie van de mycotoxinen plaats.

Mycotoxinen kunnen kankerverwekkend, mutageen, oestrogenen, teratogeen, neurotoxisch of immunotoxisch zijn (Yiannikouris & Jouany, 2002). Ook kunnen bepaalde mycotoxinen een daling van de voederopname teweeg brengen (Yiannikouris & Jouany, 2002). Volgens Upadhaya *et al.* (2010) is de economische impact veroorzaakt door een lagere productiviteit, verlaging van het lichaamsgewicht, daling van de voederefficiëntie, schade aan

organen en de verstoring van de reproductiviteit vele male groter dan de onmiddellijke mortaliteit en morbiditeit vermits dit veel minder voorkomt. Ook volgens Yiannikouris & Jouany (2002) leiden toxinen in dieren tot minder chronische problemen en zelden tot de dood. Veel voorkomende effecten van mycotoxinen bij herkauwers zijn: een variabele voederopname, verminderde vruchtbaarheid, bloederige mest, pensverzuring, gezwollen hakken/ poten/ spenen, niet consistente melkproductie, spiertrillingen, slechte penswerking, slechte immuunstatus, lusteloosheid/ apathie, diarree en wankel gang (Alltech, 2008). Uit bovenstaande symptomen blijkt dus dat mycotoxinen atypische symptomen veroorzaken waardoor deze moeilijk kunnen worden gebruikt voor diagnose van de aanwezigheid van mycotoxinen in het voeder.

Tabel 1: De verschillende schimmelsoorten met hun bijhorende mycotoxine en het voedermiddel dat ze contamineren

Soort schimmel	Mycotoxinen	Contaminatie	Bronnen
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Aflatoxine (B1, B2, G1, G2)	Maïs, maïsbijsproducten, granen, katoenzaad, pindanoten, sorghum, zonnebloemkoek, kopra, soja, koolzaad	Alltech, z.j.; Fink-Gremmels, 2008; Jouany <i>et al.</i> , 2005; Upadhaya <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Ochtratoxine A	Granen, koffiebonen, druiven en andere fruitsoorten en inkuilen	(Alltech, z.j.; Jouany <i>et al.</i> , 2005)
<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>	Fumonisine (B1, B2, B3)	Maïs, maïsbijsproducten, en ruwvoeders	(Alltech, z.j.; Jouany <i>et al.</i> , 2005; Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)
<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>	Zearalenone	Maïs en maïsbijsproducten, granen, rijst, sorghum en ruwvoeders	(Alltech, z.j.; Fink-Gremmels, 2008b; Jouany <i>et al.</i> , 2005)
<i>Fusarium venenatum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. sambucium</i>	Trichothecenen A: T2-toxine en Diacetoxyscirpenol	Maïs, tarwe, haver en gerst	(Alltech, z.j.; Declerck <i>et al.</i> , 2009; Foroud & Eudes, 2009)
<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Trichothecenen B: nivalenol en Deoxynivalenol	Maïs, tarwe, gerst, DDGS, sojaschroot en ruwvoeders	(Alltech, z.j.; Declerck <i>et al.</i> , 2009)
<i>Penicillium expansum</i> , <i>P. urticae</i>	Patuline	Fruit, granen, inkuilen, gefermenteerd voeder,	(Alltech, z.j.; Declerck <i>et al.</i> ,

<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssoschlamys nivea</i>		verwerkte producten en bijproducten	2009; Fink- Gemmels, 2008b; Jouany <i>et al.</i> , 2005; Tapia <i>et al.</i> , 2002)
<i>Penicillium roquefortine</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P.</i> <i>crustosum</i> , <i>P.</i> <i>expansum</i> , <i>P.</i> <i>griseofulvum</i>	Roquefortine C	Inkuilen en bij de opslag van grondstoffen	(Alltech, z.j.; Declerck <i>et al.</i> , 2009;)
<i>Penicillium</i> <i>brevicompactum</i> , <i>P.</i> <i>roquefortine</i> , <i>P.</i> <i>carneum</i> en <i>Byssoschlamys nivea</i>	Mycofenolzuur	Inkuilen en bij de opslag van grondstoffen	(Alltech, z.j.; Declerck <i>et al.</i> , 2009; Mohr <i>et al.</i> , 2007; Schneewis <i>et al.</i> , 2000)
<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P.</i> <i>verrucosum</i> , <i>Aspergillus</i> <i>terreus</i>	Citrinine	Inkuilen	(Declerck <i>et al.</i> , 2009)

2.2. De belangrijkste mycotoxinen

Volgens Abidin & Khatoon (2012) en Zachariasova *et al.* (2014) zijn er rond de 300 verschillende mycotoxinen. Toch wordt verondersteld dat er nog veel meer zijn die nog ontdekt moeten worden (Alltech, 2008; Jouany & Diaz, 2005). Van de beschreven mycotoxinen zijn er slechts minder dan tien uitgebreid onderzocht na de ontdekking van aflatoxine in de jaren 1960 (Jouany & Diaz, 2005).

De meest voorkomende mycotoxinen volgens Abidin & Khatoon (2012) en Zachariasova *et al.* (2014) zijn aflatoxine, ochratoxine, trichothecenen, zearalenone en fumonisin. De belangrijkste mycotoxinen zijn volgens Jouany & Diaz (2005) aflatoxinen, ochratoxine A, fumonisine, zearalenone, trichothecenen en patuline.

Volgens een Nederlands onderzoek zijn de belangrijkste mycotoxinen die voorkomen in het voeder van melkvee aflatoxine B1, deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxine A, fumonisine B1 en B2 (Driehuis *et al.*, 2008a).

Declerck *et al.* (2009) onderzochten de aanwezigheid van negen mycotoxinen in de Belgische maïs- en graskuilen waaruit bleek dat de meest voorkomende mycotoxinen roquefortine C, mycofenolzuur, patuline en citrinine zijn. Volgens Fink-Gremmels (2004) wordt in kuilen vaak *Penicillium ssp.*, *Byssoschlamus spp.*, *Aspergillus fumigatus* en *Trichoderma* teruggevonden. *Penicillium roquefortine* is de meest voorkomende schimmel in kuilen. Deze zuurtolerante schimmel is in staat te groeien bij lage concentraties aan zuurstof (Driehuis *et al.*, 2008b) en produceert verschillende mycotoxinen waaronder roquefortine C,

patuline, Mycofenolzuur en PR-toxine. Vermits kuilvoeder het belangrijkste voedermiddel is voor herkauwers kunnen deze mycotoxinen in hoge mate aanwezig zijn in het rantsoen (Mohr *et al.*, 2007).

Gezien hun belang worden hierna meer details weergegeven van volgende mycotoxinen: aflatoxine, ochratoxine A, fumonisine, zearalenone, trichothecenen, patuline, roquefortine C, mycofenolzuur en citrinine. Aflatoxine, ochratoxine A, fumonisine, zearalenone en trichothecenen zijn mycotoxinen die vooral afkomstig zijn van veldschimmels. Patuline, roquefortine C, *mycophenolic acid* en citrinin zijn mycotoxinen die vooral afkomstig zijn van bewaarschimmels.

2.2.1. Aflatoxinen

Aflatoxinen is een verzamelnaam van een groep van verwante verbindingen, namelijk AFB1, AFB2, AFG1 en AFG2 (Fink-Gremmels, 2008b; Jouany & Diaz, 2005; Upadhaya *et al.*, 2010). Van aflatoxine B1 of AFB1 vindt men de hoogste concentraties terug (Fink-Gremmels, 2008b; Upadhaya *et al.*, 2010), in het bijzonder op graan (Richard, 2007). In Tabel 1 werd weergegeven in welke gewassen deze mycotoxine voorkomt. Aflatoxinen kunnen geproduceerd worden door *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* en *A. nomius* (Abidin & Khatoon, 2012; Upadhaya, Park & Ha, 2010). De hoogste concentraties aan aflatoxinen vindt men terug in tropische en subtropische gebieden omdat schimmels die deze toxinen produceren een warme en een vochtige omgeving verkiezen (Upadhaya *et al.*, 2010). Hierdoor worden aflatoxinen in West-Europa gewoonlijk in lage concentraties teruggevonden. In maïskuilen verspreid over Nederland, België, Duitsland en Frankrijk werd een gemiddelde concentratie vastgesteld van 1 µg AFB1/kg en maximaal tot 18 µg AFB1/kg (Van Asselt *et al.*, 2012).

Alle diersoorten zijn gevoelig voor AFB1, maar monogastrische dieren zijn gevoeliger dan herkauwers (Upadhaya *et al.*, 2010), hoewel dit afhangt van het productieniveau, bijvoorbeeld is hoogproductief melkvee gevoeliger dan melkvee op een lager productieniveau (Fink-Gremmels, 2008b). Ook de aanwezige soorten aflatoxinen bepalen de gevoeligheid waarbij door mogelijke synergistische effecten een combinatie van verschillende aflatoxinen risicovoller is (Jouany & Diaz, 2005). Dit is van belang voor natuurlijk gecontamineerd voeder die ook verschillende mycotoxinen kan bevatten.

Aflatoxine B1 is een kankerverwekkend stof (Richard, 2007) omdat het zich gedraagt als een DNA tussenvoegende verbinding die bindt met de guanine basen wat leidt tot celdood of fout delende cellen met tumorvorming als gevolg (Jouany & Diaz, 2005).

De acute symptomen van aflatoxinen zijn een gebrek aan eetlust, lusteloosheid, ataxie, ruige vacht, bleke vacht, een vergrote vette lever (Upadhaya *et al.*, 2010), leverbeschadigingen die kunnen leiden tot opstoppen en bloedingen (Jouany & Diaz, 2005). Chronische blootstelling leidt verder tot een verminderde voederefficiëntie en een lagere melkproductie (Upadhaya *et al.*, 2010). Effecten op opname en productie kunnen gelinkt zijn aan een

verteringsdepressie in de pens. Deze blijkt echter dosisafhankelijk: *in vitro* supplementatie van 9,5 ng AFB1/ml had geen effect op de vluchtige vetzuurproductie, terwijl deze met 50 en 67 % werd gereduceerd bij incubatie van respectievelijk 1 en 10 µg AFB1/ml (Jouany & Diaz, 2005). In lage concentraties hebben aflatoxinen echter wel een invloed op de cellulaire structuren en het hormonaal immuunsysteem wat resulteert in een verhoogde gevoeligheid voor infectieziekten (Fink-Gremmels, 2008b). In Tabel 2 wordt een opsomming gegeven van verschillende experimenten waarin het effect van verschillende concentraties aflatoxinen op dieren werd onderzocht.

Aflatoxine kan in de pens omgezet worden in aflatoxicol of aflatoxine M1 (AFM1) (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b; Upadhyaya *et al.*, 2010), wat 18 maal minder actief is dan AFB1 maar bezit wel nog steeds carcinogene eigenschappen (Devreese *et al.*, 2013). Over de omzetting capaciteit bestaat er discussie (Jouany & Diaz, 2005), waarbij in sommige studies amper afbraak wordt vermeld en in andere tot 42 % (Abidin & Khatoon, 2012; Haesaert, 2014; Jouany & Diaz, 2005; Kiessling *et al.*, 1984). Bovendien kan AFB1 terug gevormd worden uit AFM1 (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b). De omzetting van AFB1 naar AFM1 door de pensmicro-organismen zou volgens sommigen niet veel zin hebben omdat de toxiciteit van de metabolieten gelijk is aan de toxiciteit van AFB1 (Jouany & Diaz, 2005). Bijgevolg zijn herkauwers niet efficiënt beschermd tegen AFB1 (Jouany & Diaz, 2005).

Door zijn laag moleculair gewicht kan de onafgebroken fractie van AFB1 via passieve diffusie opgenomen worden vanuit het verteringstelsel, waardoor ook een snelle overdracht van AFB1 en zijn metabolieten naar de melk mogelijk is (Jouany & Diaz, 2005). Hierbij wordt 1 tot 6 % van het voeder-AFB1 in de melk uitgescheiden (Abidin & Khatoon, 2012; Driehuis *et al.* 2008a). De uitscheidingssnelheid van de andere aflatoxinen is honderd keer lager ten opzichte van aflatoxine B1/M1. Om deze reden is AFB1 het enige belangrijke voedingsgerelateerde mycotoxine met betrekking tot de voedselveiligheid van melk en melkproducten (Driehuis *et al.*, 2008a).

Tabel 2: Aflatoxinen concentraties en hun bijhorend effect op herkauwers

Concentratie Aflatoxinen (µg/kg voeder)	Diersoort	Symptomen	Bron
2500	Lammeren van 21 dagen oud	Beschadiging nieren en lever. Toename gewicht en grootte van lever en nieren	(Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)
2500	Lammeren van 5 maanden	Gewichtsverlies en een vermindering cellulaire immuniteit	(Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)
200-800	Ossen	Minder pensbewegingen	(Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)
600	Vleesvee	Leverbeschadigingen	(Jouany & Diaz, 2005)
600	Ossen	Verminderde voederefficiëntie en gewichtstoename	(Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)
200-500	Kalveren	Pathologische effecten	(Abidin & Khatoon, 2012)
100 of 300	Melkvee	Verminderde voederopname en lagere melkproductie	(Jouany & Diaz, 2005)
60-300	Geit	Geen negatieve effecten	(Abidin & Khatoon, 2012)
120	Melkvee	Verminderde vruchtbaarheid	(Jouany & Diaz, 2005)
10-108.5	Runderen	Dosisafhankelijke reductie voederopname	Upadhaya <i>et al.</i> , 2010
100	Melkvee	Lagere melkproductie	(Jouany & Diaz, 2005)
100	Vleesvee	Verhoging levergewicht	(Jouany & Diaz, 2005)
77	Melkvee	Abortus	(Abidin & Khatoon, 2012)
20	Melkvee	Verminderde voederopname en lagere melkproductie	(Jouany & Diaz, 2005)

2.2.2. Ochratoxine A

Ochratoxine A of OTA is een toxine dat geproduceerd wordt door *Aspergillus* en *Penicillium* soorten (Abidin & Khatoon, 2012; Mobashar *et al.*, 2012; Upadhaya *et al.*, 2010) zoals *Aspergillus clavatus* (Alltech, z.j.), *A. ochraceus* en *Penicillium verrucosum* (Jouany & Diaz, 2005). *Penicillium* komt het meest voor in koelere klimaten terwijl in warme klimaten vooral *Aspergillus* voorkomt (Mobashar *et al.*, 2012). In Tabel 1 werd weergegeven in welke voedermiddelen OTA voorkomt. Krachtvoeder is de belangrijkste bron van OTA in de melkveehouderij (Mobashar *et al.*, 2012). Het kan tot 100 µg OTA/kg bevatten maar meestal ligt het gehalte lager (Mobashar *et al.*, 2012).

Herkauwers zijn resistent tegen OTA doordat de micro-organismen van de pens de amidebinding van OTA kunnen hydrolyseren tot OT α en fenylalanine (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b; Kiessling *et al.*, 1984; Mobashar *et al.*, 2012; Upadhaya *et al.*, 2010). Deze metabolieten zijn minder toxisch dan OTA (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b; Upadhaya *et al.*, 2010). Herkauwers kunnen maximum 12 mg OTA/kg besmet voeder omzetten tot OT α (Abidin & Khatoon, 2012; Mobashar *et al.*, 2012). Hogere concentraties resulteren in diarree en een sterke daling van de melkproductie, waarbij de melkproductie binnen de 2 weken na de blootstelling maar tot één derde van de oorspronkelijke productie stijgt (Ribelin *et al.*, 1978). Volgens een ander onderzoek kunnen herkauwers maximaal 33 tot 72 mg OTA/dag omzetten (Abidin & Khatoon, 2012). Een ander bewijs dat niet alle OTA wordt omgezet, is de vaststelling van OTA in de melk (Ribelin *et al.*, 1978).

Penmicro-organismen hebben een hoge afbraak capaciteit voor OTA want na 2,6 h incubatie is 50 % van de totale hoeveelheid OTA afgebroken (Mobashar *et al.*, 2012). In totaal wordt 50 tot 100 % van totale hoeveelheid OTA omgezet tot OT α (Abidin & Khatoon, 2012; Haesaert, 2014; Jouany & Diaz, 2005), waarna het wordt uigescheiden in de urine (Abidin & Khatoon, 2012). Bij de vergelijking van gemeenschappen van microbiële populaties uit de pens (bacteriën, fungi en protozoa) vervullen de gram positieve bacteriën de belangrijkste rol in de afbraak van OTA indien de pens pH lager is dan 7 (Abidin & Khatoon 2012; Mobashar *et al.*, 2012). Volgens Jouany & Diaz (2005) vervullen de protozoa de belangrijkste rol in de omzetting van OTA in OT α . Een meer diverse microbiële populatie zou aanleiding geven tot een betere afbraak wat kan wijzen op synergetische effecten tussen de populaties (Mobashar *et al.*, 2012). Doordat de voedersamenstelling de samenstelling van de microbiële populaties kan sturen, beïnvloed het ook de OTA afbraak. (Mobashar *et al.*, 2012)

Kalveren zijn gevoeliger voor OTA vermits ze de hydrolyse capaciteit nog niet bezitten. Ook alle monogastrische dieren zijn gevoelig voor OTA. Een acute blootstelling kan bij deze dieren leiden tot nierschade, een verminderde eetlust, gewichtsverlies, braken, hoge rectale temperatuur, bindvliesontsteking, uitdroging, algemene verzwakking en zelfs tot overlijden binnen de 2 weken na de blootstelling. Een chronische vergiftiging leidt tot een verminderde voederopname, nierbeschadigingen en heeft een negatief effect op het immuunsysteem. (Upadhaya *et al.*, 2010)

Dat OTA weinig invloed heeft op herkauwers blijkt ook uit Tabel 3. In deze tabel wordt een overzicht gegeven van verschillende concentraties aan OTA en hun effect op herkauwers. Tot slot moet volgens Jouany & Diaz (2005) voldoende aandacht besteed worden aan de accumulatie in weefsels van de niet uitgescheiden fractie OTA vermits dit tot schadelijke effecten kan leiden bij herkauwers in geval van chronische toediening. Ook kan OTA voor een lange tijd in het bloed blijven doordat het bindt met plasma eiwitten en het geabsorbeerd kan worden in de nefronen.

Tabel 3: OTA concentraties en hun bijhorende effecten op herkauwers (Upadhaya *et al.*, 2010)

Concentratie OTA (µg/kg)	Diersoort	Symptomen
2 000 -5 000	Schapen	Geen significante klinische symptomen en na 1 u incubatie geen OTA meer
390-540	Kalveren van 12 weken oud	Geen significante klinische symptomen
100-150	<i>In vitro</i> met pensvloeistof van een geit	Geen detectie van OTA na 6u

2.2.3. Fumonisin

Fumonisin zoals A1, A2, B1, B2, B3, B4 en C1 zijn toxinen afkomstig van de schimmels *Fusarium proliferatum* en *F.verticillioides* (Abidin & Khatoon, 2012; Caloni *et al.*, 2000; Upadhaya *et al.*, 2010). Fumonisine B1 of FB1 is de meest toxische verbinding uit de fumonisine groep (Abidin & Khatoon, 2012; Caloni *et al.*, 2000; Upadhaya *et al.*, 2010). In Tabel 1 is te zien in welke voeders fumonisin voorkomen maar door de lage concentraties komen geen acute intoxicaties voor op de melkveebedrijven (Caloni *et al.*, 2000).

Bovendien blijken herkauwers vrij resistent tegen fumonisine doordat deze toxine in de pens gehydrolyseerd kan worden tot aminopolyol 1, aminopolyol 2 of aminopentol (Caloni *et al.*, 2000). Bij hogere concentraties blijkt de microbiële degradatie in de pens echter onvolledig waarbij slechts 0 % tot 35 % van de fumonisin werden omgezet (Abidin & Khatoon, 2012; Caloni *et al.*, 2000; Fink-Gremmels, 2008b; Haesaert, 2014; Jouany & Diaz, 2005). In dergelijke gevallen van onvolledige afbraak werden biochemische en microscopische lever beschadigingen vastgesteld (Caloni *et al.*, 2000; Fink-Gremmels, 2008b). Uit Tabel 4 blijkt dat hoge concentraties ook aanleiding kunnen geven tot een gereduceerde voederopname met een verminderde melkproductie tot gevolg.

Mogelijk zijn de weinig eenduidige onderzoeksresultaten het gevolg uiteenlopende dosissen. Over het algemeen wordt het metabolisme in de pens niet negatief beïnvloed (Caloni *et al.*, 2000; Jouany & Diaz, 2005).

Dit wordt bevestigd door de *in vitro* studie van Caloni *et al.* (2000) waar na de toevoeging van 1 µg FB1/ml geen invloed werd vastgesteld op de pH in de pens, methaanproductie en op de productie van de kortketen vetzuren. Verder kan besloten worden dat fumonisin weinig nefaste gevolgen hebben voor diergezondheid wat kan verklaard worden door het feit dat fumonisin amper worden geabsorbeerd vanuit de darm (Abidin & Khatoon, 2012).

Tot slot dient opgemerkt te worden dat melkvee gevoeliger is voor fumonisin dan vleesvee

en schapen door de hoge behoeften voor de melkproductie, zeker in het begin van de lactatie (Jouany & Diaz, 2005) .

Tabel 4: Verschillende fumonisinen concentraties en hun bijhorend effect op runderen

Concentratie FB1	Diersoort	Symptomen	Bronnen
100 000 µg/kg	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> vertering werd niet significant beïnvloed	(Jouany & Diaz, 2005)
3 000 µg/kg lichaamsgewicht	Runderen	Verminderde voederopname en melkproductie	(Abidin & Khatoon, 2012)
400 µg/g voeder	Runderen	80 % FB1 uitgescheiden in de mest, geen metabolieten, geen FB1 en metabolieten teruggevonden in het bloed	(Abidin & Khatoon, 2012)

2.2.4. Zearalenone

Zearalenone of ZEN wordt geproduceerd door *Fusarium* soorten waaronder *F. graminearum* (Fink-Gremmels, 2008b; Jouany & Diaz, 2005; Upadhaya *et al.*, 2010), *F. crookwellense* en *F. culmorum* (Jouany *et al.*, 2005) en wordt in zeer kleine hoeveelheden geproduceerd onder natuurlijke omstandigheden, waarschijnlijk in te kleine hoeveelheden om problemen bij herkauwers te veroorzaken (Upadhaya *et al.*, 2010). In Tabel 1 werden de voeders weergegeven waarin ZEN kan teruggevonden worden.

ZEN en de metabolieten van deze toxine binden met de receptoren van oestrogeen wat resulteert in symptomen die vergelijkbaar zijn met hyperoestrisme (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b; Upadhaya *et al.*, 2010).

Opnieuw zijn monogastrische dieren veel gevoeliger aan ZEN dan de herkauwers (Fink-Gremmels, 2008b; Upadhaya *et al.*, 2010). Dit wordt veroorzaakt door het feit dat in de pens ZEN wordt omgezet naar α -zearalenol (α -ZOL) en β -zearalenol (β -ZOL) (Abidin & Khatoon, 2012; Kiessling *et al.*, 1984; Seeling *et al.*, 2006). Tot 90 % van de ZEN kan in de pens tot α -ZOL worden omgezet (Jouany & Diaz, 2005; Kiessling *et al.*, 1984; Upadhaya *et al.*, 2010), terwijl dit volgens Haesaert (2014) slechts 0 tot 40 % is. De snelheid van ZEN omzetting is het grootst tijdens de eerste vier uur in een *in vitro* incubatie (Jouany & Diaz, 2005). De omzetting gebeurt hoofdzakelijk door pensprotozoa (Fink-Gremmels, 2008b). Volgens Jouany & Diaz (2005) is de pensbacterie *Butyrivibrio fibrisolvens* één van de belangrijkste soort die ZEN omzet waarbij ZEN geen toxisch effect heeft op deze bacterie. Tot slot kan na de na absorptie ZEN ook worden omgezet in de lever (Fink-Gremmels, 2008b).

Hoewel de α -ZOL een hogere oestrogene eigenschap heeft dan ZEN (bindt nog beter met de oestrogeen receptoren), zullen herkauwers weinig gevoelig zijn voor ZEN door een tragere absorptiesnelheid van de metabolieten (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels,

2008b; Rodrigues, 2014; Upadhaya *et al.*, 2010) en door het feit dat α -ZOL omgezet naar β -ZOL in de lever indien het wordt opgenomen (Fink-Gremmels, 2008a).

Gevoeligheid voor ZEN zou vooral optreden bij hoge concentraties aan ZEN (Tabel 5), waarbij een negatief effect op de reproductie werd vastgesteld. Ook volgens Jouany & Diaz (2005) kan de aanwezigheid van ZEN in het voeder van herkauwers leiden tot een vaginale ontsteking, vaginale afscheidingen, abortus en onvruchtbaarheid. Tot slot worden bij pinken en kalveren symptomen een opmerkelijke groei van de uier waargenomen (Fink-Gremmels, 2008b; Jouany & Diaz 2005).

Tabel 5: ZEN concentraties en hun bijhorende effecten op herkauwers (Upadhaya *et al.*, 2010)

Concentratie ZEN ($\mu\text{g/kg}$)	Diersoort	Symptomen
12 000	Schapen	Een negatief effect op de reproductie
385-1 925	Melkvee in lactatie	Geen effect op de melkproductie en geen ZEN residu's werden gevonden

2.2.5. Trichothecenen

Trichothecenen kunnen geproduceerd worden door *Fusarium* soorten zoals *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. culmorum* en door leden van het schimmelgeslacht *Trichothecium* en van *Myrothecium* (Hussein & Brasel, 2001; Upadhaya, *et al.*, 2010).

De Trichothecenen bevatten meer dan 150 verschillende toxinen die gegroepeerd kunnen worden in vier groepen: type A, B, C en D. Voorbeelden van trichothecenen A zijn onder andere T-2 toxine, HT-2 toxine en diacetoxyscirpenol (DAS). De trichothecenen B groep bevat deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol, 5-acetyldeoxynivalenol en nivalenol (NIV). Trichothecenen B verschillen van de trichothecenen A door de afwezigheid van een carbonyl groep ter hoogte van C-8 (Klötzel *et al.*, 2005). De toxiciteit van trichothecenen is te wijten aan de sterke remming van eiwitsynthese (Hussein & Brasel, 2001). Van alle mycotoxinen die behoren tot de trichothecenen zijn T-2 toxinen en DAS het meest toxisch (Hussein & Brasel, 2001; Rodrigues, 2014).

Herkauwers zijn vrij resistent tegen trichothecenen omdat ze in staat zijn deze mycotoxinen om te vormen met behulp van een de-esterase of de-epoxidase reactie (Jouany & Diaz, 2005).

Indien intoxicaties voorkomen als gevolg van trichothecenen leiden deze doorgaans tot gewichtsverlies, braken, remming eiwitsynthese, celdood, ernstige huidproblemen, bloedingen, in sommige gevallen tot de dood en onderdrukking van het immuunsysteem doordat ze inwerken op het aantal macrofagen, lymfocyten en erythrocyten (Upadhaya *et al.*, 2010).

2.2.5.1. Trichothecenen A

Trichothecenen A worden geproduceerd door *Fusarium venenatum*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. sambucium* (Alltech, z.j.; Declerck et al., 2009), *F. sporotrichoides* en *F. langsethiae* (Alltech, z.j.). In Tabel 1 werd aangegeven in welke voeders deze toxinen voorkomen.

2.2.5.1.1. T-2 toxine

Monogastrische dieren zijn gevoeliger aan T-2 toxine dan herkauwers (Fink-Gremmels, 2008b; Jouany & Diaz, 2005) waarbij ernstige irritaties van de bovenste delen van het spijsverteringsstelsel worden veroorzaakt en maagbloedingen kunnen voorkomen door het cytotoxisch effect (Fink-Gremmels, 2008b).

Herkauwers danken hun resistentie aan het feit dat in de pens T-2 toxine snel wordt afgebroken in verschillende metabolieten zoals HT-2, T-2 triol en neosolaniol (Jouany & Diaz, 2005) die geen toxische effecten meer hebben (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b). Deze afbraakreacties worden vooral (90%) uitgevoerd door de protozoa in de pens. Het probleem met T-2 toxine is dat het bindt met de ribosomen van protozoa waardoor de eiwitsynthese onderdrukt wordt en waardoor de productie van protozoaal eiwit na 6 u incubatie 83 % gereduceerd werd terwijl het bacterieel eiwit steeg met 14 % in diezelfde periode. Dat bacteriën ongevoelig zijn voor T-2 toxine bleek ook na de toevoeging van 1 mg T-2 toxine/ml, waar geen effect werd gevonden op de groei van *B. fibrisolvens* (Jouany & Diaz, 2005).

Ondanks de detoxificatie capaciteit van de pens worden weldegelijk symptomen vastgesteld bij runderen die T-2 toxine verstrekt kregen, namelijk een onderdrukking van het immuunsysteem, een inductie van necrose in het lymfatisch weefsel, onvruchtbaarheid, abortus in het laatste trimester van de dracht (Hussein & Brasel, 2001), gastro-enteritis, darmbloedingen, lagere voederopname, gastro-intestinale letsels en de dood (Jouany & Diaz, 2005). Ook bij kalveren worden symptomen ten gevolge van T-2 toxine opname vastgesteld, namelijk een lager immunoglobuline gehalte in het serum, een daling van het aantal witte bloedcellen en neutrofielen, lusteloosheid, anorexia, diarree en bij hoge dosissen irritatie van de lever, longen en het hart (Jouany & Diaz, 2005). Dat er toch symptomen worden vastgesteld kan waarschijnlijk verklaard worden door de variabele omzetting van T-2 toxine namelijk, van 0 tot 70 % (Haesaert, 2014).

Ook uit Tabel 6 blijkt dat het vervoederen van T-2 toxinen verschillende negatieve effecten heeft op kalveren en melkkoeien.

Tabel 6: T-2 concentraties en hun bijhorend effect (Hussein & Brasel , 2001)

Concentratie T-2 (µg/kg)	Diersoort	Symptomen
10 000– 25 000	Kalveren	Zweren in de pens en een afname van de penspapillen
1 000	Melkkoeien	Bloedingen

2.2.5.1.2. Diacetoxyscirpenol

DAS beïnvloedt de gezondheid of prestaties van vee niet (Hussein & Brasel, 2001) wat kan verklaard worden door het feit dat DAS in de pens geacetyleerd wordt tot monoacetoxyscirpenol (MAS) en scirpenetriol, die dan verder worden omgezet in de-epoxy MAS en de-epoxyscirpenetriol (Abidin & Khatoon, 2012). 90 % van deze afbraak wordt uitgevoerd door de pensprotozoa (Jouany & Diaz, 2005).

2.2.5.2. Trichothecenen B

In Tabel 1 werd aangegeven in welke voeders trichothecenen B terug te vinden zijn.

2.2.5.2.1. Deoxynivalenol

DON is de belangrijkste mycotoxine van de type- B trichothecenen en wordt teruggevonden in de korrel van granen, maïs, stro en gras (Fink-Gremmels, 2008b). DON is de meest voorkomende *Fusarium* mycotoxine wereldwijd (Landschoot *et al.*, 2012) en is de meest voorkomende mycotoxine in graanvelden (Audenaert *et al.*, 2013b). Hoewel het niet het meest toxische mycotoxine is, is DON op economisch gebied het belangrijkste mycotoxine (Audenaert *et al.*, 2013b).

DON is één van de meest polaire trichothecenen met een laag moleculair gewicht en is oplosbaar in water waardoor het goed opneembaar is vanuit het maag-darmkanaal (Jouany & Diaz, 2005).

Herkauwers lijken ongevoelig voor het toxisch effect van DON, doordat tot 90 % wordt omgezet (Jeong *et al.*, 2000) door de pensmicro-organismen die DON de-epoxiseren in de-epoxy DON, wat veel minder toxisch is (Abidin & Khatoon, 2012; Jeong *et al.*, 2000; Jouany & Diaz, 2005; Seeling *et al.*, 2006) waardoor herkauwers tien tot twintig keer meer DON kunnen verdragen dan monogastrische dieren (Jeong *et al.*, 2000). Uit andere onderzoek blijkt dan weer dat maar 0 tot 50 % DON wordt afgebroken (Haesaert, 2014; Kiessling *et al.*, 1984). Van de totale hoeveelheid DON en zijn metaboliëten wordt 30 % opgenomen binnen de 24 u na inname (Jouany & Diaz, 2005). DON toxiciteit is gerelateerd met diarree, braken, gastro-intestinale ontsteking, necrose in het darmkanaal, het beenmerg en het lymfoïde weefsel, remming van de eiwitten, DNA en RNA-synthese, remming van mitochondriale functies en heeft een effect op de celdeling en membraamintegriteit (Audenaert *et al.*, 2013b).

Ondanks de detoxificatie eigenschap van de micro-organismen in de pens, worden bij runderen toch symptomen van DON toxicatie vastgesteld, namelijk een stijging van het aantal ontstekingsreacties zoals mastitis en hoefbevangenheid (Fink-Gremmels, 2008b; Rodrigues, 2014), een verminderde voederopname (Jouany & Diaz, 2005; Rodrigues, 2014), een lagere melkproductie, een lager melkvetgehalte (Jouany & Diaz, 2005), lagere pens pH, lagere ammoniakale-N en reductie van de totale vetzuurproductie, meer bepaald de acetaat en propionzuur productie (Jeong *et al.*, 2010). Uit bovenstaande vaststellingen kan besloten worden dat DON een negatieve invloed heeft op de pensflora en het de samenstelling ervan wijzigt (Jeong *et al.*, 2010; Rodrigues, 2014) waarbij de pensfermentatie capaciteit gereduceerd wordt (Jeong *et al.*, 2010). Een belangrijke opmerking bij dit onderzoek zijn de extreme hoge concentraties die gebruikt zijn, namelijk 40 mg DON/kg DS. Verder was de DON degradatie in het rantsoen met cellulose vlugger dan deze met maïszetmeel wat verklaard kan worden door de invloed op de pens pH. Om deze reden kan de verhouding krachtvoeder/ruwvoeder een sterke invloed hebben op de biodegradatie van DON (Jeong *et al.*, 2010).

Toch wordt ook lagere concentraties problemen vastgesteld. Zo kunnen herkauwers slecht 5 tot 10 ppm DON omzetten zonder enige nadelige gevolgen op de gezondheid en de prestaties van de runderen (Abidin & Khatoon, 2012; Dänicke *et al.*, 2002).

Ook uit Tabel 7 blijkt dat in de literatuur heel wat tegenstrijdigheid is over een al dan niet nadelig effect van een DON blootstelling.

Uit bovenstaande gegevens kan dus besloten worden runderen pas een nadelig effect ondervinden van DON indien het in voldoende hoge concentraties aanwezig is in het voeder.

Vleesvee en schapen zijn minder gevoelig aan DON dan melkvee wat verklaard kan worden door het hoger niveau van stress waar melkvee aan blootgesteld wordt. (Jouany & Diaz, 2005). Binnen de groep van melkvee zijn de dieren in het begin van de lactatie (Jouany & Diaz, 2005) en runderen met pensverzuring het gevoeligst aan omdat DON bij deze groepen onvoldoende degradeert (Fink-Gremmels, 2008b).

Tabel 7: DON concentraties en hun bijhorend effect op herkauwers

Concentratie DON (µg/kg)	Diersoort	Symptomen	Bron
440 000	Melkkoeien	Stijging aantal baarmoederinfecties, verminderde melkproducties en meer diarree	(Rodrigues, 2014)
66 000	Melkkoeien	Geen residuen in melk	(Jouany & Diaz, 2005)
18 000	Stieren	Geen effect op voederopname, dagelijkse groei, voederefficiëntie en karkas eigenschappen	(Jouany & Diaz, 2005)
15 600	Schapen	Geen effect voor 28 dagen, na langere periode gewichtsverlies	(Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)
2600 – 6500	Melkkoeien	13 % minder melk	(Rodrigues, 2014)
6 000	Melkkoeien	Geen invloed op melkproductie, geen residuen in melk	(Hussein & Brasel, 2001)
3 000 – 5 000	Melkkoeien	Vermindering van IgA, albumine, globuline	(Upadhaya <i>et al.</i> , 2010)

2.2.5.2.2. Nivalenol

NIV wordt vooral geproduceerd door *F. crookwellense*, *F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* en *F. equiseti* (Van Asselt *et al.*, 2012). Herkauwers kunnen in hun pens 80 % NIV omzetten tot de-epoxy NIV (Pronk *et al.*, 2002). NIV wordt vaak samen teruggevonden met DON en ZEN (Pronk *et al.*, 2002).

2.2.6. Patuline

Patuline is een kankerverwekkend mycotoxine (Declerck *et al.*, 2009) en wordt gevormd door *Penicillium*, *Aspergillus* en *Byssoschlamus* species (Fink-Gemmels, 2008b; Jouany & Diaz, 2005; Tapia *et al.*, 2002) zoals *Penicillium expansum*, *Byssoschlamys nivea*, *Paecilomyces variotii* en *P. paneum* (Declerck *et al.*, 2009). In Tabel 1 werd weergegeven in welke voeders dit toxine wordt teruggevonden.

Patuline vormt covalente bindingen met eiwitten en aminozuren die thiol-groepen bevatten zoals glutathion (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gemmels, 2008b). Deze binding kan leiden tot een uitputting van glutathion wat kan resulteren in oxidatieve stress (Abidin & Khatoon, 2012). Verder veroorzaakt patuline longoedeem, bloedingen (Declerck *et al.*, 2009), schade aan de nieren en maag-darmkanaal functies, een reductie van de mannelijke vruchtbaarheid, een immunosuppressieve eigenschap bij hoge dosissen (Rasmussen *et al.*, 2011), rillingen,

een verstoorde bewegingscoördinatie en het kan zelfs leiden tot de dood. (Fink-Gemmels, 2008b). Omdat in de praktijk vooral lage concentraties aan patuline worden teruggevonden in kuilen, komen slechts zelden bovenstaande symptomen voor (Fink-Gemmels, 2008b).

Het probleem met patuline is dat het een concentratie afhankelijk effect heeft op de groei van de pensmicroben (Fink-Gemmels, 2008b; Singh, 1967). Singh (1967) onderzocht het effect van patuline op 70 soorten bacteriën waarbij geen enkel van deze bacteriën volledig resistent was tegen de inhiberende werking. De concentratie patuline waarbij een groeiremming van de bacteriën werd vastgesteld, was afhankelijk van de soort en varieerde van 2 tot 100 µg/ml. Naast een antimicrobiële werking, bezit patuline ook een sterke antiprotazoaire eigenschap (Abidin & Khatoon, 2012).

Patuline heeft een invloed op de productie van vluchtige vetzuren en op de eiwitsynthese in de pens (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gemmels, 2008b). Verder reduceert 30 en 90 mg patuline per liter tijdens een *in vitro* incubatie de werkelijk verteerde fractie van organisch materiaal, *acid detergent fiber* of ADF, de ruw eiwit fractie en bacterieel stikstof. Verder werd bij 90 mg patuline per liter een hogere ammoniakale N – concentratie, minder vluchtige vetzuren en een lagere concentratie vluchtige vetzuren, in het bijzonder acetaat teruggevonden terwijl het aandeel butyraat en valeraat toenam. Hieruit kan dus besloten worden dat patuline een effect kan hebben op de vertering van nutriënten bij herkauwers door de negatieve invloed op pensmicroben wat een negatief effect kan hebben op de productie en de gezondheid van herkauwers (Tapia *et al.*, 2002).

2.2.7. Roquefortine C

ROC wordt geproduceerd door *Penicillium* soorten zoals *P. roquefortine*, *P. carneum*, *P. crustosum*, *P. expansum* en *P. griseofulvum* (Declerck *et al.*, 2009). In Tabel 1 werd voorgesteld in welke voeders dit toxine wordt teruggevonden. ROC heeft antibacteriële (Rasmussen *et al.*, 2011; Singh, 1967) en neurotoxische eigenschappen (Declerck *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2011) waardoor een gebrek aan coördinatie bij herkauwers wordt vastgesteld (Fink-Gremmels, 2004). Bij schapen werden geen toxische effect noch afwijkende hematologische, endocrinologische en enzymologische parameters in het bloed vastgesteld wanneer 10 of 50 mg roquefortine C per dag (0,13 en 0,62 mg/kg BW) werd verstrekt. Bij de hoge concentratie (50 mg) veroorzaakt ROC een daling van de pens pH met 0,4 eenheden waardoor dit toxine in staat is de samenstelling van de pensflora te wijzigen (Driehuis *et al.*, 2008b).

2.2.8. Mycofenolzuur

Mycofenolzuur of MPA wordt geproduceerd door *Penicillium brevicompactum*, *P. roquefortine*, *P. carneum* en *Byssochlamys nivea* (Declerck *et al.*, 2009). In Tabel 1 werden voeders opgelijst waarin dit toxine wordt teruggevonden.

MPA is een zwak organisch zuur met antifungale, antibacteriële en antivirale eigenschappen

met een lage acute toxiciteit voor zoogdieren. MPA is een specifiek, niet competitieve en reversibele remmer van inosine monofosfaat dehydrogenase (IMPDH) in eukaryote cellen. Dit enzym speelt een belangrijke rol bij *de novo*-synthese van guanosine nucleotiden waar het de irreversibele omzetting van inosine monofosfaat tot monofosfaat xanthosine katalyseert. Voor de aanvoer van dit purine zijn T- en B-lymfocyten vooral afhankelijk van de *de novo*-biosynthese. MPA blokkeert hun proliferatieve respons en remt hierdoor zowel de vorming van antilichamen als de productie van cytotoxische T-cellen. De gevoeligheid van T- en B-lymfocyten voor MPA kan verklaard worden door het feit dat deze cellen voornamelijk het IMPDH type II bevatten. Deze vorm is vijf keer gevoeliger voor MPA dan het type I. (Mohr *et al.*, 2007; Schneweis *et al.*, 2000)

Door bovenstaand fenomeen kan een MPA inname een immunosuppressie veroorzaken. (Declerck *et al.*, 2009; Mohr *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2011; Schneweis *et al.*, 2000) In de lever kan MPA gemetaboliseerd worden tot een MPA inactieve glucuronide (MPAG). (Mohr *et al.*, 2007)

2.2.9. Citrinine

Citrinine of CIT is een mycotoxine dat geproduceerd kan worden door *Penicillium*, *Aspergillus* en *Monascus* soorten waaronder *P. citrinum*, *P. verrucosum* en *A. terreus* (Declerck *et al.*, 2009; Schneweis *et al.*, 2001). Welke voeders dit toxine bevatten werd voorgesteld in Tabel 1. CIT remt verschillende enzymen die gekoppeld zijn aan de oxidatiereacties in de niercortex (nierschade) (Declerck *et al.*, 2009; Rasmussen *et al.*, 2011; Schneweis *et al.*, 2001) en de lever (Rasmussen *et al.*, 2011; Schneweis *et al.*, 2001). Bovendien worden malaat en glutamaat dehydrogenasen en het ATP-synthetase complex geremd en heeft het een antifungale en antibacteriële activiteit (Schneweis *et al.*, 2001). Tot slot vertoont CIT een synergetisch effect met een ander niertoxinen namelijk OTA (Rasmussen *et al.*, 2011).

2.3. Terugggevonden gehalten in het voeder van melkvee

2.3.1. Ruwvoerders

De totale blootstelling aan mycotoxinen van melkvee is afhankelijk van de samenstelling van het voeder en het gehalte aan mycotoxinen in de ruwvoerders, krachtvoerders en bijproducten. Het voeder dat aan het melkvee verstrekt wordt, kan bestaan uit gras- en maïskuil waarbij de hoogproductieve dieren extra krachtvoeder krijgen. Op de meeste bedrijven wordt gewerkt met een mengwagen waardoor het gemakkelijker wordt om andere bijproducten zoals pulp, draf,... te gebruiken of met grondstoffen zoals sojaschroot, koolzaadschroot, tarwe, gerst,... te werken in plaats van krachtvoeder. Verder kan een rantsoen aangevuld worden met wat stro of hooi om de structuurwaarde van het rantsoen te verhogen.

De verscheidenheid aan ingrediënten in een TMR vergroot de kans op een contaminatie met verschillende soorten mycotoxinen, maar zorgt tegelijkertijd voor een daling van het risico op

hoge mycotoxine concentratie omdat een gecontamineerd voedermiddel verdund kan worden door een ander component in de TMR (Jouany & Diaz, 2005).

Het inkuilproces kan het mycotoxine gehalte van een voeder dat reeds besmet is tijdens de veldfase echter niet verminderen, bijvoorbeeld zal zowel het DON als het ZEN gehalte niet beïnvloed worden door het inkuilproces (Driehuis *et al.*, 2008a). Ook na pelletteren of extruderen zal het mycotoxine gehalte nauwelijks veranderen (Zachariasova *et al.*, 2014).

In België vertegenwoordigen kuilen 50 – 80 % van het rantsoen van melkvee (Driehuis *et al.*, 2008b; Rasmussen *et al.*, 2011; Tangni *et al.*, 2013) waarvan maïs- en graskuilen de belangrijkste zijn (Tangni *et al.*, 2013), gevolgd door samengestelde voeders met een aandeel van 23 % per kg DS (Driehuis *et al.*, 2008b). In kuilvoeders wordt DON, ZEN, ROC en MPA teruggevonden (Driehuis *et al.*, 2008b).

Tot slot bestaat er een significante correlatie tussen CIT en OTA aanwezigheid in maïs en graskuilen wat dus aantoont dat deze mycotoxinen samen voorkomen (Tangni *et al.*, 2013).

2.3.1.1. Maïskuil

In bijlage 1 (zie p. 70) worden het aantal maïskuilstalen, aantal positieve maïskuilen en de gemiddelde en maximum gehalten weergegeven per mycotoxine. Hierin worden analyses van maïskuilen uit België (Tangni *et al.*, 2013), Nederland (Driehuis *et al.*, 2008a; Driehuis *et al.*, 2008b; Van Asselt *et al.*, 2012), Duitsland (Schneweis *et al.*, 2000) als het Verenigd Koninkrijk en Tsjechië republiek weergegeven (Zachariasova *et al.*, 2014).

Uit bijlage 1 (zie p. 70) blijkt dat een maïskuil volgende mycotoxinen kan bevatten: DON, ZEN, FB1, FB22 fumonisine, 15-acetyl-DON, NIV, MPA en ROC. In mindere mate wordt ook OTA, AFB1 en CIT teruggevonden. Ook volgens Driehuis *et al.* (2008b) ligt contaminatieniveau van AFB1 en OTA laag in maïs dat in Nederland geoogst wordt. Aflatoxinen besmetting van maïs is afhankelijk van het geografisch gebied waar het geteeld wordt. Het weinig voorkomen van OTA in maïs duidt er op dat de omgevingscondities Nederland niet gunstig zijn voor de infectie door de schimmelsoorten die geassocieerd zijn met de productie van deze mycotoxinen.

Verder blijkt uit bijlage 1 (zie p. 70) dat DON in zeer veel maïskuilen (70,8 – 100 %) werd teruggevonden, dit met een gemiddelde concentratie variërend van 692,6 tot 978 µg/kg. De hoogste concentratie werd vastgesteld in een Nederlandse kuil (4114,6 µg/kg). ZEN werd minder frequent vastgesteld in maïskuilen (29 tot 64,2 %), met een gemiddelde concentratie variërend van 29 tot 174 µg/kg. Opnieuw werd de hoogste concentratie (1 122,2 µg/kg) teruggevonden in een Nederlandse kuil. Ook voor fumonisine (FB1 en FB2) werden de hoogste concentraties vastgesteld in Nederlandse kuilen (78 000 µg/kg). Voor NIV werd slecht één onderzoek teruggevonden met een gemiddelde concentraties van 185 µg/kg en een maximale concentratie van 823 µg/kg. ROC en MPA, beiden bewaarschimmels, werden vooral teruggevonden in de beschimmelde delen van een maïskuil. Toch werd voor ROC een sterke spreiding gevonden in de beschimmelde delen, namelijk van 134 tot 25 986

µg/kg. Bij MPA variëren deze gemiddelde waarden iets minder sterk, namelijk van 278,8 tot 9311 µg/kg.

2.3.1.2. Graskuil

In bijlage 2 (zie p. 72) zijn de mycotoxinen die kunnen voorkomen in een graskuil weergegeven. Ook het aantal graskuilstalen, het aantal positieve kuilen, gemiddelde gehalten en maximumgehalten er zijn weergegeven. Hierin worden analyse van graskuilen uit België (Tangni *et al.*, 2013), Nederland (Driehuis *et al.*, 2008a; Driehuis *et al.*, 2008b) en Duitsland (Schneweis *et al.*, 2000) weergegeven.

Uit bijlage 2 (zie p. 72) blijkt dat in graskuil volgende mycotoxinen aanwezig kunnen zijn: MPA, OTA, ZEN, ROC en CIT. ZEN werd minder frequent (6 tot 13 %) in graskuilen teruggevonden ten opzicht van maïskuilen. Ook de maximale waarde (308 µg/kg) ligt hier lager, terwijl de gemiddelde concentraties (93 – 180 µg/kg) binnen het zelfde bereik valt als in de maïskuilen. OTA wordt vooral teruggevonden in de niet beschimmelde delen wat er dus op wijst dat dit geen bewaarschimmels is, wel een veldschimmel.

Wat de mycotoxinen van bewaarschimmels betreft (MPA, ROC en CIT), werden de hoogste concentraties teruggevonden in de beschimmelde delen. De maximale teruggevonden concentraties liggen voor MPA (35000 µg/kg) en ROC (7208 µg/kg) veel hogere ten opzicht van CIT (158 µg/kg).

In hooi, dat ook een graslandproduct is, wordt enkel ZEN teruggevonden (Korosteleva *et al.*, 2007).

2.3.2 Krachtvoerders

In bijlage 3 (zie p. 74) zijn per krachtvoedergrondstof de mogelijke mycotoxinen, aantal stalen, aantal positieve stalen, gemiddelde en maximum waarden weergegeven. De resultaten die hierin worden opgenomen, zijn zowel afkomstig van België (Vanheule *et al.*, 2014) als Verenigd Koninkrijk en Tsjechië republiek (Zachariasova *et al.*, 2014).

In granen worden vaak volgende mycotoxinen teruggevonden: DON (Abidin & Khatoon, 2012; Driehuis *et al.*, 2008a; Korosteleva *et al.*, 2007), ZEN (Driehuis *et al.*, 2008a; Korosteleva *et al.*, 2007), OTA, ergot alkaloiden en aflatoxine (Abidin & Khatoon, 2012). In mindere mate detecteert men ook 15-acetyl-DON (Korosteleva *et al.*, 2007). In bijlage 3 (zie p. 74) werden ergot alkaloiden en aflatoxine echter niet teruggevonden in de stalen. Wel werd DAS, T-2 en HT-2 teruggevonden.

Maïsgraan bevat vaak DON (Driehuis *et al.*, 2008a), ZEN (Abidin & Khatoon, 2012; Driehuis *et al.*, 2008a) en fumonisine (Abidin & Khatoon, 2012). Uit bijlage 3 (zie p. 74) blijkt dat maïsgraan verder nog NIV kan bevatten. Uit bijlage 3 (zie p. 74) blijkt verder nog dat in maïsgraan zowel de gemiddelde concentratie voor DON (624 µg/kg) als ZEN (30 µg/kg) als

de maximale gevonden concentratie voor DON (1523 µg/kg) als ZEN (159 µg/kg) lagere liggen ten opzichte van maïskuil.

Sojaboonproducten bevatten vaak aflatoxinen (Abidin & Khatoon, 2012), dit werd echter niet teruggevonden in de stalen die werden opgenomen in bijlage 3 (zie p. 74). Hieruit blijkt wel dat sojaproducten ZEN en DON bevatten, wel in mindere mate ten opzichte van de graanproducten.

2.3.3 Bijproducten

Bijproducten zoals bietenpulp, *Dried Distillers Grains with Solubles* of DDGS en bierborstel worden vaak in natte vorm aangewend, wat betekent dat bewaarschimmels hierop kunnen groeien en mycotoxinen kunnen produceren (Jouany & Diaz, 2005).

In bijlage 4 (zie p. 77) wordt weergegeven welke mycotoxinen er kunnen voorkomen in bietenpulp en DDGS op basis van maïs en tarwe. Ook het aantal genomen stalen en de gemiddelde en de maximum concentratie zijn hierin weergegeven. Hierin worden de resultaten weergegeven van stalen die werden genomen in het Verenigd Koninkrijk en Tsjechië republiek (Zachariasova *et al.*, 2014).

Uit bijlage 5 blijkt dat bietenpulp volgende mycotoxinen kan bevatten: FB1, ZEN en DON. DDGS kan dan weer FB1, FB2, ZEN, DON, OTA, T-2 en HT-2 bevatten.

Doordat mycotoxinen niet worden verwijderd tijdens de productie van bio-ethanol DDGS, ligt hun concentratie in vergelijking met de oorspronkelijke granen hoger waardoor zeer hoge waarden aan mycotoxinen worden teruggevonden (Zachariasova *et al.*, 2014). Dit is ook te zien wanneer de analyses van tarwe- en maïsgraan uit bijlage 3 (zie p. 74) worden vergeleken met de mycotoxinen concentratie in DDGS op basis van maïs of tarwe uit bijlage 4 (zie p. 77).

Wat de mycotoxinen samenstelling van bierborstel betreft, werd in het onderzoek van Zachariasova *et al.* (2014) enkel enniatine B, B1, A en A1 gedetecteerd. Voor zover bekend is enniatine een niet-polaire mycotoxine die in het draf blijft, terwijl de polaire trichothecenen zoals DON overgaan in het bier, wat zeer ongewenst is.

2.3.4 TMR

Belangrijk verschillen van een TMR ten opzicht van afzonderlijke voedermiddelen zijn het groter aantal mycotoxinen die kunnen voorkomen en een verdunningseffect die optreedt. Wanneer Tabel 8 vergeleken wordt met bijlage 1 (zie p. 70), blijkt dat er in maïskuil meer mycotoxinen worden vastgesteld. In de TMR stalen werden namelijk geen AFB1, OTA en CIT teruggevonden. Dit kan verklaard worden door hun lage concentratie in maïskuil waardoor deze mycotoxinen verdund worden in het rantsoen. Dit verdunningseffect wordt ook bevestigd door de overige mycotoxinen waar telkens een lagere concentratie wordt

teruggevonden in de TMR stalen. Enkel voor NIV werd in de TMR stalen een hogere concentratie vastgesteld.

Ten opzichte van graskuilen uit bijlage 2 (zie p. 72), bevat een TMR wel meer soorten mycotoxinen vermits hier enkel mycotoxinen werden teruggevonden die geproduceerd worden door bewaarschimmels, met uitzondering van OTA en ZEN. Van de gedetecteerde mycotoxinen in de graskuil, lag de concentratie telkens hoger ten opzicht van de TMR stalen. Ten opzicht van de krachtvoedergrondstoffen uit bijlage 3 (zie p. 74), worden minder mycotoxinen teruggevonden in de TMR stalen. Ook de concentratie van mycotoxinen die wel nog worden teruggevonden in de TMR stalen, ligt lager ten opzichte van de concentratie in de krachtvoedergrondstoffen. Dit wordt opnieuw verklaard door het verdunningseffect. Opmerkelijk is wel dat in de TMR stalen meer ZEN wordt teruggevonden dan in de krachtvoedergrondstoffen. Dit kan te wijten zijn aan hoge concentratie in de maïskuil, wat het belangrijkste component is in het rantsoen van melkvee.

Tabel 8: De mycotoxinen die aanwezig zijn in een TMR

Mycotoxinen	Aantal stalen	Aantal positieve stalen (%)	Gemiddelde (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Bron
FB1	19		13	58	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
FB2	19		3	14	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
ZEN	47	46	28	203	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	19		9	86	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
HT-2	19		21	33	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
DON	47	81	273	969	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	19		524	1 262	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
NIV	19		307	1 175	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
ROC	47	23	114	2 211	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
MPA	47	17	54	1 840	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)

2.4. Toegelaten gehalten

Om dieren te beschermen tegen mycotoxinen werden door verschillende instanties maximale waarden of actiedrempels ingevoerd. Hierna volgt een opsomming van enkele van deze waarden, opgesteld door *Food and Agriculture Organization* of FAO en OVOCOM. In Tabel 9 zijn de actiedrempels of afkeurgrenzen weergegeven per mycotoxinen. Deze waarden zijn afhankelijk van het soort voeder waarin het wordt teruggevonden en de leeftijd van de runderen.

Voor T-2 en HT-2 wordt enkel een onderverdeling gemaakt in het soort graan. Zo geleden voor niet bewerkte granen volgende actiedrempels: 0,2 ppm voor gerst (inclusief gemalen

gerst) en maïs, 0,1 ppm voor haver (met kaf) en 0,25 ppm voor tarwe, rogge en andere granen (Declerck et al., 2009; Devreese et al., 2013; OVOCOM, 2014). Voor graanproducten voor de dier- en mengvoeders gelden volgende actiedrempels: 2 ppm voor gemalen haver (kaf), 0,5 ppm voor andere graanproducten en 0,25 ppm voor mengvoeders met uitzondering van voeders voor katten (Declerck et al., 2009; Devreese et al., 2013; OVOCOM, 2014).

Tabel 9: Actiedrempels (ppm) in diervoeders herleid tot 12 % vocht volgens de GMP-code OVOCOM versie 2012 en FAO (Declerck et al., 2009; Devreese et al., 2013; OVOCOM, 2014)

		DON	ZEN	OTA	FB1+FB2	AB1
Voedermiddelen	Granen met uitzondering van maïsbijsproducten	8	2	0,25	60	0,02
	Maïsbijsproducten	12	3	0,25	60	0,02
Aanvullende en volledige diervoeders voor:	Varkens	0,9	0,25 ⁽¹⁾	0,05		0,02 ⁽⁴⁾
	Pluimvee	5		0,1	20	0,02 ⁽⁴⁾
	Kalveren & lammeren (schapen en geiten)	2	0,5		20	0,01
	Melkvee	5	0,5		50	0,005
	Andere runderen	5	0,5		50	0,02
	Andere dieren	5	0,5		5 ⁽²⁾ -10 ⁽³⁾	0,01 ⁽⁵⁾ -0,005 ⁽⁶⁾

(1) Met uitzondering van biggen en gelten: 0,1

(2) Paarden, konijnen en gezelschapsdieren

(3) Vissen

(4) Met uitzondering van jonge dieren: 0,001 (voor volledige diervoeders) en 0,005 (voor aanvullende diervoeders)

(5) Volledige diervoeders

(6) Aanvullende diervoeders

2.5. Mycotoxinen en het pensmetabolisme

2.5.1. Biodegradatie van mycotoxinen in de pens

De pensflora omvat bacteriën (10^{11} /ml), protozoa (10^6 /ml), schimmels (10^4 zoosporen/ml) (Jouany & Diaz, 2005) en tot slot bacteriofagen (10^8 - 10^9 /ml) (Abidin & Khatoon, 2012). Voor een optimale groei verkiezen de pensmicro-organismen een pH van 6,0 tot 6,9 en een temperatuur van 39 °C (Abidin & Khatoon, 2012).

De pensmicroben spelen een belangrijke rol bij de vertering van vezels, productie van vitamines B, de productie van vluchtige vetzuren, beschermen van het dier tegen de ontwikkeling van pathogene organismen in het spijsverteringskanaal en bij de omzetting van mycotoxinen (Jouany & Diaz, 2005).

Daarnaast produceren de micro-organismen van de pens microbiële enzymen die mycotoxinen gedeeltelijk kunnen afbreken of omzetten naar een minder schadelijke vorm (Fink-Gremmels, 2008b; Upadhaya *et al.*, 2010; Yiannikouris & Jouany, 2002). Via deze reactie kunnen echter ook nog schadelijkere metabolieten ontstaan. Verder kunnen mycotoxinen zoals patuline, ROC, MPA en CIT het potentieel van de pens om andere mycotoxinen af te breken sterk verminderen (Abidin & Khatoon, 2012; Alltech, 2008; Fink-Gremmels, 2008b; Rodrigues, 2014) waardoor mycotoxinen zelfs in lagere gehalten kunnen 'samenwerken' en problemen veroorzaken bij het rund (Alltech, 2008). Men spreekt ook wel van een synergetisch effect tussen mycotoxinen (Rasmussen *et al.*, 2011; Yiannikouris & Jouany, 2002) waardoor een contaminatie met verschillende mycotoxinen tot ernstigere problemen kan leiden dan wanneer de toxinen afzonderlijk voorkomen (Yiannikouris & Jouany, 2002). Uit een onderzoek dat de aanwezigheid van *Fusarium* mycotoxinen en de groei van de bacteriën *Ruminoicoccus albus* en *Methanobrevibacter ruminantium* onderzocht, werd een significante remming gevonden (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b). Toch heeft DON, dat één van de *Fusarium* mycotoxinen is, geen enkel effect op de groei van de pensbacteriën (Abidin & Khatoon, 2012). Het gehalte van een bepaalde mycotoxinen heeft dus een grote invloed op de biodegradatiecapaciteit van de pens (Upadhaya *et al.*, 2010). Daarnaast heeft ook het immuun status van het dier, de type bacteriën die in de pens leven (Upadhaya *et al.*, 2010) en de stabiliteit van de microflora in de pens een invloed op de biodegradatiecapaciteit (Rodrigues, 2014).

Veder speelt ook de leeftijd van de koe een belangrijke rol in de biodegradatiecapaciteit (Upadhaya *et al.*, 2010). Jonge dieren hebben echter nog geen of nog geen optimale penswerking waardoor ze gevoeliger zijn dan volwassen dieren voor mycotoxinen. Ook het ras en het geslacht hebben een invloed (Upadhaya *et al.*, 2010).

Toch wordt bij dieren van de dezelfde leeftijd, ras en geslacht vastgesteld dat de detoxificatie capaciteit van de pensflora verzadigbaar is (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b). Verschillende factoren zoals slepende melkziekte, negatieve energiebalans, pensverzuring abrupte verandering van rantsoen, een hoog eiwit rantsoen,... kunnen de detoxificatie capaciteit van de pens negatief beïnvloeden (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b).

Een plotse verandering van het rantsoen, meer bepaalt een hoog eiwit rantsoen leidt tot een verandering van het ruminaal ecosysteem waardoor ook de detoxificatie capaciteit van de pensmicro-organismen onderdrukt wordt (Abidin & Khatoon, 2012).

De variatie van de pens pH wordt beïnvloed door de voedersamenstelling en door de antimicrobiële activiteit van de mycotoxinen (Rodrigues, 2014). Door deze lagere pH wordt de biodegradatiecapaciteit van de pens sterk gereduceerd, waardoor in verschillende onderzoeken een lagere afbraak van OTA (Jouany & Diaz, 2005; Kiessling *et al.*, 1984),

DON (Abidin & Khatoon, 2012; Haesaert, 2014), ZEN en DAS wordt waargenomen (Kiessling *et al.*, 1984).

Bij pensverzuring zal naast de pH ook het aantal protozoa dalen (Abidin & Khatoon, 2012; Jouany & Diaz, 2005), wat resulteert in een lagere afbraak van mycotoxinen (Jouany & Diaz, 2005) vermits er wordt aangenomen dat van alle pensmicro-organismen, de protozoa de grootste mycotoxinen detoxificatie capaciteit hebben (Abidin & Khatoon, 2012; Alltech, 2008; Kiessling *et al.*, 1984; Upadhaya *et al.*, 2010). Zo zou 90 – 100 % van de omzetting van OTA, ZEN, T-2 Toxine en DAS gerealiseerd worden door protozoa. Toch wijzen enkele andere studies er op dat de bacteriële fractie van de pens een aanzienlijke capaciteit heeft om OTA te degraderen (Upadhaya *et al.*, 2010).

De bovenstaande invloeden maken duidelijk dat bepaalde groepen runderen gevoeliger zijn aan mycotoxinen dan andere. Van alle runderen blijkt dat de jonge dieren en hoog productieve koeien het meest vatbaar zijn voor de negatieve effecten van mycotoxinen (Rodrigues, 2014).

2.5.2. Invloed van mycotoxinen op het pensmetabolisme

De mycotoxinen afkomstig van bewaarschimmels zoals patuline, ROC, MPA en CIT zijn instaat de samenstelling van de pensflora aan te passen door hun antimicrobiële, antiprotozoaire of antifugale activiteit (Fink-Gremmels, 2008b; Rodrigues, 2014) waardoor ze een invloed hebben op de microbiële fermentatie. Hierdoor leiden deze mycotoxinen tot een slechtere benutting van het voeder waardoor een verminderde voederopname (Rasmussen *et al.*, 2011), lagere gewichtstoename, lagere productiviteit (Upadhaya *et al.*, 2010) en een verandering van de melksamenstelling wordt waargenomen (Rodrigues, 2014).

Daarnaast produceren bewaarschimmels microbiële vluchtige organische verbindingen. Deze zijn de oorzaak van de beschimmelde geur waar herkauwers niet van houden waardoor de schimmelaantasting kan leiden tot een verminderde voederopname. Bij NEB kan beschimmeld voeder tot een nog grotere NEB leiden. (Abidin & Khatoon, 2012)

2.6. Maatregelen om het mycotoxinen gehalte in het voeder te beperken

Mycotoxinen kunnen voor de oogst, direct na de oogst of tijdens de opslag geproduceerd worden. Op deze verschillende momenten kan dan ook ingespeeld worden om het mycotoxine gehalte in het voeder te reduceren. (Devreese *et al.*, 2013; Van Asselt *et al.*, 2012 ; Upadhaya *et al.*, 2010).

Er zijn 3 strategieën om het mycotoxine gehalte te verminderen. Eerst en vooral kan de groei van schimmels die mycotoxinen produceren of de productie van mycotoxinen verminderd worden. Ten tweede kan een detoxificatie uitgevoerd worden van het besmet voeder. Tot slot kan men ook de biologische beschikbaarheid van mycotoxinen verminderen eens ze zijn opgenomen door het dier (Devreese *et al.*, 2013).

2.6.1. Schimmelgroei en mycotoxine productie reduceren

Het beheersen van schimmels die instaat zijn mycotoxinen te produceren voor en tijdens de oogst, zijn de belangrijkste methode om de mycotoxinen productie te beheersen (Upadhaya *et al.*, 2010). De belangrijkste strategie om dit te bereiken zijn goede landbouwpraktijken (Devreese *et al.*, 2013), namelijk passende vruchtwisseling, grondbewerkingen, irrigatie, het juiste gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen (Alltech, 2008; Devreese *et al.*, 2013), telen op vruchtbare bodems, gebruik van resistente rassen (Alltech, 2008), teeltmanagement, gepast oogsttijdstip (Van Asselt *et al.* 2012 ; Upadhaya *et al.*, 2010), tijdstip van zaaien of planten, genetisch gemodificeerde gewassen die resistent zijn tegen de penetratie van insecten en de competitieve uitsluiting door het gebruik van niet-toxische stammen in het veld (Upadhaya *et al.*, 2010).

2.6.1.1. Resistente rassen

De keuze van de plantenvariëteit speelt een belangrijke rol, vooral in jaren met een hoge ziekte druk (Landschoot *et al.*, 2012), vermits er resistentie rassen bestaan tegen verschillende schimmelaantastingen (Alltech, 2008). Genetische resistentie is één van de belangrijkste agronomische factoren om het DON gehalte te reduceren. Enkel het type I (resistentie op het niveau van de initiële infectie) en het type II (resistentie op het niveau van de verspreiding in de aar) zijn bruikbaar voor de plantenveredelaars (Landschoot *et al.*, 2012).

Ook resistentie tegen de productie van mycotoxinen wordt teruggevonden. Zo bezitten sommige tarwe variëteiten het *Fhb1* resistentie gen, die een glucosyltransferase werking bezit die DON kan omzetten naar een minder schadelijke metaboliet, deoxynivalenol-3-glucoside (DON-3G) (Audenaert *et al.*, 2013a). Belgische cultivars die dit gen bevatten, kunnen 8 tot 30 % van de aanwezige DON omzetten in DON-3G (Landschoot *et al.*, 2012).

2.6.1.2. Teeltrotatie en ploegen

De meest voor de hand liggende bron van inoculum zijn de resterende geïnfecteerde oogstresten. Daarom is teeltrotatie en ploegen zo belangrijk om inoculumopbouw te voorkomen (Landschoot *et al.*, 2012) en zo de kans op schimmelgroei en eventuele mycotoxine productie te verminderen in de volgende teelt (Alltech, 2008; Devreese *et al.*, 2013).

Door ploegen worden gewasresten ondergewerkt en kan mogelijk inoculum door gebrek aan zuurstof zich niet verder ontwikkelen. Er is dan ook geen sporenvorming en infectie van het gewas waardoor het mycotoxine gehalte gereduceerd wordt (Audenaert *et al.*, 2013b; Devreese *et al.*, 2013). Dit wordt bevestigd door het onderzoek van Landschoot *et al.* (2013) waaruit bleek dat ploegen leidt tot een lager DON gehalte. Dit effect was wel afhankelijk van de ziektedruk waarbij de reductie groter was wanneer de weersomstandigheden gunstig waren voor de ontwikkeling van *Fusarium* schimmels.

Wat vruchtwisseling betreft, ligt het DON gehalte significantie hoger als de vorige teelt ook gevoelig is voor *Fusarium* (Landschoot *et al.*, 2012). Het belang van vruchtwisseling werd ook aangetoond met het onderzoek van Landschoot *et al.* (2013), waar een continue herhaling van de maïs-tarwe rotatie in combinatie met gunstige weersomstandigheden voor de schimmel, resulteerde in een DON gehalte van maar liefst 9,90 ppm DON in de wintertarwe.

Naast een gereduceerde hoeveelheid inoculum zal een goede vruchtwisseling, samen met de stikstofbesmesting en onkruidbeheer, de structuur van de bodem verbeteren en het bodemleven bevorderen waardoor ook de overlevingskansen van *Fusarium ssp.* gereduceerd worden (Audenaert *et al.*, 2013b).

2.6.1.3. Andere maatregelen binnen kader van goede landbouwpraktijken

Irrigatie heeft een grote invloed op het mycotoxine gehalte, dit door verminderde plantenstress. Alle planten hebben nood aan een voldoende watervoorziening. Een overmaat aan water in de bloei creëert dan weer ideale groei omstandigheden voor een *Fusarium* besmetting tarwe (Audenaert *et al.*, 2013b; Devreese *et al.*, 2013).

Het gepaste gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen omvat insecticiden om schade van de maïsstengelboorder te verminderen (Alltech, 2008; Devreese *et al.*, 2013). Het effect van fungiciden op een schimmelaantasting zijn heel duidelijk en leiden doorgaans tot een verminderde schimmel aantasting. Ondanks een gereduceerd schimmeligroei hangen de onderzoeksresultaten van fungicide op de productie van mycotoxinen totaal niet samen. Zo varieert het effect van *azoxystrobin* op de DON productie van stijgende tot een dalende DON productie (Audenaert *et al.*, 2013b).

Goede landbouwpraktijken zijn ook belangrijk rond de oogst en tijdens de opslag en bewaring van de voeder middelen. Zo kan de mycotoxine productie sterk gereduceerd worden door oogststress te verminderen dit door bijvoorbeeld niet te laat en te droog te oogsten en een goed management rond het inkuilen (Alltech, 2008) namelijk: voorkom graan met meer dan 15 % vocht, zichtbaar beschadigde of geïnfecteerde korrels verwijderen (Devreese *et al.*, 2013), zorg voor goede bewaaromstandigheden en fermentatie. Tot slot is een goed uitkuil management noodzakelijk op het bedrijf. Dit houdt het volgende in: propere kuilen en voldoende snel uitkuilen (Alltech, 2008).

Toch blijkt het effect van goede landbouwpraktijken niet altijd te voldoen aan de verwachtingen. In het onderzoek van Van Asselt *et al.* (2012) werd geen correlatie gevonden tussen goede landbouwpraktijken en de aanwezigheid van mycotoxinen. Wel werd een geografisch verschil opgemerkt. In het Noorden van Nederland bevatte 60 % van de stalen mycotoxinen. In het Midden en het zuiden van Nederland was dit respectievelijk 43 % en 31

% . Dit verschil is te wijten aan de koudere temperaturen in het Noorden waardoor de maïs pas later kon geoogst worden.

2.6.2. Detoxificatie van het besmet voeder

Indien het voeder al besmet is, bestaan er verschillende methodes om de mycotoxinen te inactiveren of vernietigen (Devreese *et al.*, 2013). Dit kan verwezenlijkt worden door het toepassen van mechanische scheiding, bestralingen, solventie-extractie en mycotoxinemodificeerders (Upadhaya *et al.*, 2010). Verder zijn er nog heel wat chemisch detoxificatie methoden: oxidatie, reductie, een behandeling met ammoniak, alkaliseren, verzuring en deaminering (Devreese *et al.*, 2013; Upadhaya *et al.*, 2010). Ook kunnen gassen worden gebruikt zoals ammoniak wat vooral wordt toegepast bij pinda's en katoen (Upadhaya *et al.*, 2010). Een andere belangrijke opmerking hierbij is dat deze methoden niet zijn toegestaan in de Europese Unie gezien de chemische behandelingen kunnen leiden tot toxische derivaten (Devreese *et al.*, 2013).

De meest gebruikte methode uit deze groep zijn de mycotoxinemodificeerders (De Mil *et al.*, 2015). Mycotoxinenmodificeerders veranderen de chemische structuur van de mycotoxinen waardoor de toxiciteit van de toxinen verminderd. Het zijn micro-organismen en hun enzymen en kunnen onderverdeeld worden in vier klassen: bacteriën, gisten, schimmels en enzymen (De Mil *et al.*, 2015; Devreese *et al.*, 2013) .

Deze methode zou veel veiliger en efficiënter zijn dan de andere methoden uit deze groep (Upadhaya *et al.*, 2010).

Mycotoxinemodificeerders werken buiten het dier of in het darmkanaal van de dieren vóór de absorptie van de mycotoxinen heeft plaatsgevonden (Devreese *et al.*, 2013). De bacteriën die gebruikt worden om mycotoxinen om te zetten zijn afkomstig van de pens, darm, bodem of water. Momenteel is al veel onderzoek (*in vitro* en *in vivo*) gebeurt op *Eubacterium* BBSH 797 stam (Devreese *et al.*, 2013). Deze bacterie is afkomstig uit het pensvocht van runderen en produceert het enzym (de-epoxidase) dat in staat is trichothecenen om te zetten in niet toxische metabolieten (Devreese *et al.*, 2013; Upadhaya *et al.*, 2010), dit door de splitsing ter hoogte van de 12, 13-epoxy-groep, wat belangrijk is voor hun toxiciteit. Enkel deze stam is beschikbaar voor commerciële doeleinden. Tijdens de productie van BBSH 797 wordt de bacterie gestabiliseerd door vriesdrogen en ingebed in een organische polymeer om de stabiliteit door het maag-darmkanaal te waarborgen. Verder werd ook aangetoond dat ook andere bacteriën mycotoxinen kunnen omzetten in minder of niet toxische metabolieten. Voorbeelden hiervan zijn: *Nocardia asteroides*, *Corynebacterium rubrum*, *Mycobacterium fluoranthenvivorans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Flavobacterium aurantiacum* en *Pseudomonas fluorescens*. Dit werd tot op heden enkel *in vitro* aangetoond. (Devreese *et al.*, 2013) Tot slot zou ook de bacterie *Butyrivibrio fibrisolvens* in staat zijn ZEN, T-2 toxine, DON, DAS en OTA af te breken. Enkel aflatoxine B1 kan niet worden afgebroken. De groei van de bacterie werd door geen enkel van de geteste mycotoxinen geremd. (Upadhaya *et al.*, 2010)

De belangrijkste gist met betrekking tot mycotoxinen transformatie is *Trichosporon mycotoxinivorans*. Deze is afkomstig uit de dikke darm van termieten en zou instaat zijn om OTA en ZEN om te zetten in niet toxische metabolieten. Bij OTA wordt alles binnen de 2,5 h gedetoxificeerd en leidt de reactie tot OT α . De omzetting van ZEN door deze gist leidt tot metabolieten die geen oestrogene werking hebben. Voor ZEN is pas na 24 h 100 % omgezet, maar vermits detoxificatie snel na inname (<8 u) moet gebeuren kan deze gist enkel gebruikt worden om OTA om te zetten. Uit een ander onderzoek blijkt dat *Saccharomyces cerevisiae* FB1 slecht 25 tot 50 % kunnen afbreken na 5 dagen, wat dus niet bruikbaar is voor de praktijk (Devreese et al., 2013).

Ook bepaalde schimmels zijn instaat om mycotoxinen om te zetten. Voorbeelden hiervan zijn *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Eurotium herbariorum* en *Rhizopus* sp. Deze kunnen AFB1 omzetten naar aflatoxicol dit door de reductie van het cyclopentenon carboxyl groep van AFB1. *Rhizopus* isolaten zoals *R. stolonifer*, *R. oryzae* en *R. microsporus* hebben verder ook nog een werking op ZEN. *Aspergillus* stammen zijn in staat ZEN en OTA om te zetten in minder toxische metabolieten. Ook *Exophiala spinifera* en *Rhinocladiella atrovirens* zijn in staat FB1 om te zetten (Devreese et al., 2013).

Tot slot kunnen ook enzymen gebruikt worden om mycotoxinen te transformeren (Devreese et al., 2013; Upadhaya et al., 2010). Enzymatische reacties zijn zeer specifiek, vaak onomkeerbaar, efficiënt, milieuvriendelijk en geven geen aanleiding tot toxische residuen of bijproducten. De gebruikte enzymen worden voornamelijk geproduceerd door micro-organismen. Als eerste kunnen epoxidase enzymen aangehaald worden die instaat zijn trichothecenen en DON om te zetten naar mindere toxische metabolieten. Verder kan lactonohydrolase, geproduceerd door de schimmel *Clonostachys rosea*, ZEN omzetten in een minder actief oestrogeenproduct door de splitsing van de lacton structuur. Er bestaan ook commerciële proteasen die OTA kunnen hydrolyseren tot OT α . Na een incubatieperiode van 25 u wordt een significantie hydrolyse activiteit waargenomen voor protease A (87,3 %) en pancreatine (43,4 %). Tot slot kunnen *Sphingopyxis* sp. MTA 144 FB1 transformeren. (Devreese et al., 2013)

2.6.3. De biologische beschikbaarheid van mycotoxinen verminderen

Een andere methode om de blootstelling van mycotoxinen te verminderen is door de biologische beschikbaarheid ervan te verminderen door aan het voedermiddel een absorberend middel toe te voegen (Alltech, 2008; Devreese et al., 2013). Deze middelen binden met de mycotoxinen waardoor ze geïmmobiliseerd worden en de biologische beschikbaarheid daalt (Upadhaya et al., 2010). De mycotoxinen detoxificatie methoden worden het meest toegepast (De Mil et al., 2015). Mycotoxinebinders verhinderen de absorptie van mycotoxinen vanuit het darmkanaal door de toxinen te absorberen aan hun oppervlak (De Mil et al., 2015). Het vermindert de absorptie vanuit het darmkanaal naar de

bloedstroom en het resulteert in een uitscheiding van een toxine-binder complex in de feces (Alltech, 2008; Devreese *et al.*, 2013). Er zijn 2 soorten adsorbanten of binders: Anorganische en organische binders (Alltech, 2008; De Mil *et al.*, 2015; Devreese *et al.*, 2013).

Aluminosilicaat mineralen (klei) zijn de grootste klasse van de anorganische mycotoxinebinders (Devreese *et al.*, 2013). De absorptie van klei is niet gelimiteerd tot de oppervlakte van de kleideeltjes, maar kan ook plaatsvinden in de tussenlaag ruimten van klei. Deze ruimten nemen toe als de klei zwelt, waardoor het aantal bindingsplaatsen toeneemt (De Mil *et al.*, 2015).

De aluminosilicaat mineralen bevatten twee subklassen. De eerste subklasse zijn de fyllosilicaten en bestaan uit: bentoniet, montmorilloniet, smectieten, kaolinieten en ilites. De tweede subklasse zijn de tectosilicaten en bevatten de zeolieten (Devreese *et al.*, 2013). Verder kunnen ook nanocomposieten gebruikt worden (Upadhya *et al.*, 2010). Uit een onderzoek van Mil *et al.* (2015) anorganische binders die verschillende lagen smectiet bevatten, het best ZEN kunnen vastleggen.

De zeolieten, bentonieten, klei en gehydrateerd natrium- en aluminiumsilicaten zijn relatief goedkoop maar door de hoge dosering lopen de kosten per ton voer toch hoog op en wordt er waardevolle ruimte in het rantsoen ingenomen (Alltech, 2008).

Een ander probleem met deze binders is dat ze niet allen mycotoxinen binden. Zo kunnen ze zich ook binden met bepaalde mineralen en vitaminen. Anorganische binders zijn niet biodegradeerbaar en kunnen dus problemen geven bij de mestafvoer wanneer ze in hoge dosis in het voer worden ingemengd (Alltech, 2008).

De efficiëntie van de anorganische binders hangt af van de chemische structuur van de binder en van het mycotoxine. Het belangrijkste kenmerk van de binders is de fysieke structuur. Dit is de ladingsverdeling, de grootte van de poriën en de toegankelijke oppervlakte. Aan de andere kant hebben ook de eigenschappen van de opgenomen mycotoxinen zoals polariteit, oplosbaarheid, vorm en ladingsverdeling een invloed op de bindingscapaciteit. Algemeen stijgt de bindingscapaciteit met de oppervlakte en de affiniteit tussen de binder en de mycotoxine. (Devreese *et al.*, 2013)

Naast anorganische komen er ook nog organische binders voor, wat vandaag veel wordt toegepast (Devreese *et al.*, 2013). De binding aan organische binders ontstaat door hydrofobe interacties (De Mil *et al.*, 2015). De organische binders bevatten onder andere haver hullen, tarwevezel, luzernevezel, extracten van gistcelwanden, cellulose, hemicellulose, pectines (Alltech, 2008).

De meest gebruikte organische mycotoxinebinder zijn celwandcomponenten uit *Saccharomyces cerevisiae* gist. De gistcelwanden zijn opgebouwd uit β -glucanen en mannaan oligosachariden. Doordat deze een hoog mycotoxine bindend vermogen hebben, worden alleen de celwanden gebruikt en niet de gehele cellen. Het feit dat dode cellen hun bindingscapaciteit niet verliezen, toont aan dat hun werking wordt uitgeoefend door adhesie aan onderdelen van de celwand en dus niet door covalente bindingen of door het

metabolisme van de gistcel. Er is aangetoond dat de β -D-glucaan fractie van de gistcelwand rechtstreeks betrokken is bij het binden van ZEN en dat de structurele organisatie van de β -D-glucaan fractie de bindingssterkte beïnvloedt. Op basis van *in vitro* testen blijkt dat gistcelwanden kunnen binden met DON, T-2 toxine, ZEN, OTA en AFB1. (Devreese *et al.*, 2013)

De voordelen van organische binders zijn dat de materialen biodegradeerbaar zijn, geen toxische contaminanten bevatten, een groot beschikbaar bindingsoppervlak bezitten en in lage hoeveelheden in het voeder moeten ingemengd worden. Het nadeel is echter dat ze zelf een bron van mycotoxinen kunnen zijn (Alltech, 2008).

Een andere groep van organische binders die verstrekt kunnen worden aan dieren zijn melkzuurbacteriën die kunnen onderverdeeld worden in vier geslachten: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* en *Pediococcus*. Hun gemeenschappelijk kenmerk is dat ze mycotoxinen kunnen binden. Het interactie mechanismen tussen melkzuurbacteriën en de mycotoxinen vertoont gelijkenissen met de absorptie van de gistcelwanden. Het blijkt dat polysaccharideverbindingen zoals glucanen en mannanen de bindingsplaatsen zijn. Verschillende mycotoxinen hebben verschillende bindingsplaatsen. Uit *in vitro* onderzoeken blijkt dat *Lactobacillus rhamnosus* en *L. rhamnosi* het vermogen hebben om met DON, T-2, ZEN, FB1, AFB1 en OTA te binden. De *in vitro* absorptie capaciteit is afhankelijk van de gebruikte stam en de gebruikte dosis. Een belangrijke opmerking hierbij is dat er nog geen *in vivo* studies zijn uitgevoerd om de mycotoxinebindende eigenschap aan te tonen (Devreese *et al.*, 2013).

Er bestaan dus tal van methoden die gebruikt kunnen worden om de mycotoxinebesmetting te verminderen. Helaas zijn veel van deze decontaminatie methoden niet efficiënt en onveilig door de aanwezigheid van eventuele chemische residuen in het eindproduct. Bovendien zijn veel van deze behandelingen niet rendabel. Ook absorptiemiddelen kunnen naast mycotoxinen andere voedingstoffen absorberen wat leidt tot een verlies aan voedingswaarde. De decontaminatie kan ook de smaak van het product beïnvloeden. (Upadhaya *et al.*, 2010)

Verder bindt niet elke mycotoxine binder, elke mycotoxine evengoed. Dit is afhankelijk van de eigenschappen van de binder en het mycotoxine zelf.

3. Materiaal en methoden

3.1. Het voorkomen van mycotoxinen in de TMR

Op 23 verschillende melkveebedrijven in Vlaanderen werd een staal van het voeder genomen. De locaties van de bedrijven is weergegeven op Figuur 1. De bedrijven werden zodanig gekozen dat alle belangrijke melkveestrecken van Vlaanderen vertegenwoordigd waren. De staalname gebeurde als volgt: om de 5 m werd met de hand een kleine hoeveelheid voeder van de TMR aan het voederhek opgeraapt en verzameld in een plastieken zak en in afwachting van drogen gestockeerd in de diepvriezer (18 °C).

De stalen werden gedroogd in een geventileerde droogstoof op 60 °C. Eenmaal de stalen droog zijn, werd een mycotoxine analyse uitgevoerd via de LC-MS/MS technologie die beschreven werd door Van Pamel *et al.* (2011). In één run worden 26 verschillende mycotoxinen geanalyseerd namelijk NIV, DON, neosolaniol, fusarenon-X, 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol + 15-acetyldeoxynivalenol, aflatoxine G2, aflatoxine G1, aflatoxine B2, aflatoxine B1, Diacetoxyscirpenol, alternariol, HT-2 toxine, T-2 toxine, HT-2 + T-2 toxine, ZEN, alternariol methylether, sterigmatocystine, FB1, FB2, FB1 + FB2, FB3, OTA, ROC en enniatine B.

Tijdens het bezoek aan de melkveebedrijven werd tevens een enquête afgenomen. Deze enquête is terug te vinden in bijlage 5 (zie p. 78) .



Figuur 1: De locatie van de deelnemende bedrijven

3.2. *In vitro* incubatie met DON

Via een *in vitro* incubatie wordt nagegaan of DON een invloed heeft op de totale vetzuurproductie, dit bij een pH 6,8. In een tweede proef wordt nagegaan of DON eenzelfde

invloed heeft op de totale vetzuurproducties, dit bij opnieuw bij een pH 6,8 wat een gezonde koe simuleert en bij een pH 5,8 wat acidotische omstandigheden nabootst.

De *in vitro* incubatie en de vluchtige vetzuren analyse werd uitgevoerd volgens de methode van Castro-Montoya et al. (2012). Het Maïsgraan werd gespiket met DON (0 ppm, 5 ppm, 10 ppm of 15 ppm). Deze hoeveelheid DON werd aangekocht aan Prof. Dr. Marc Lemmens van de *Universität für Bodenkultur Wien* (BOKU) in Tulln. Het DON werd *in vitro* gesynthetiseerd en daarna opgezuiverd via een preparatieve HPLC.

De dag voor de incubatie werden de stalen afgewogen en de pensbuffer aangemaakt. Er werd 250 mg gespiket maïsgraan afgewogen in incubatieflesjes. Voor de pensbuffer wordt 3,58 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,55 g/l KH_2PO_4 , 0,124 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8,74 g/l NaHCO_3 en 1 g/l NH_4HCO_3 afgewogen en in een maatkolf gebracht. Vervolgens wordt de maatkolf gevuld met gedestilleerd water. Om de component goed te kunnen oplossen wordt de maatcilinder op een magnetische roerder geplaatst, dit in een CO_2 atmosfeer in een warmwater bad van 39 °C. Als alles goed is opgelost, wordt de maatkolf gevuld tot de ijkstreep met gedestilleerd water. Daarna wordt de buffer gevuld met CO_2 , dit gedurende 30 min. Hierna wordt de maatkolf afgesloten met een rubberen stop die in verbinding staat met een gasreservoir dat gevuld is met CO_2 . Dit geheel moet een nacht blijven staan bij een temperatuur van 39 °C.

De dag nadien wordt aan de incubatieflesje met het gespiket maïsgraan 1 ml gedestilleerd water toegevoegd, waarna de flesjes worden afgesloten met een rubberen stop en een aluminium omhulsel. De flesjes worden dan aangesloten op het vacuüm systeem. Hierin worden de flesjes verschillende malen geflusht met CO_2 nadat met behulp van een vacuümpomp de volledige gasfase is verwijderd.

Voor de incubatie wordt gebruik gemaakt van pensvloeistof dat afkomstig is van drie gefistuleerde schapen. De staalname gebeurt 's ochtends vóór het voederen van de dieren. De pensvloeistof wordt in thermosflessen getransporteerd. Eerst wordt de pensvloeistof over een keukenzeef gegoten waarna alle vloeistof verzameld wordt in een beker op een magnetische roerplaat. Aan de beker wordt continu CO_2 toegevoegd. Voor de buffer wordt toegevoegd, wordt eerst de pH van de pensvloeistof en de buffer gemeten met behulp van een pH meter van het merk 'checker by hanna' met een nauwkeurigheid van 0,01. In proef één wordt 1500 ml pensbuffer toegevoegd aan 394,7 ml pensvloeistof. In de tweede proef wordt 2500 ml pensbuffer aan 657,9 ml pensbuffer toegevoegd. Hierna wordt nogmaals de pH gemeten van het mengsel. Bij proef twee wordt dit mengsel eerst gebruikt om alle flesjes te vullen van de reeks op pH 6,8, waarna het mengsel wordt aangelengd met HCl tot een pH van 5,8 wordt bereikt. Alle gemeten pH waarden zijn weergegeven in Tabel 10. Met een plastic spuit van 30 ml wordt 24 ml van het mengsel buffer + pensvloeistof opgezogen en in de incubatieflesje gespoten. Met een smalle naald worden de flesjes 10 s aangeprikt om de druk af te laten. Na 8 flesjes bij de eerste proef en na 6 flesjes bij de tweede proef worden ze in de incubator van het merk edmundbühlee, type GmbH geplaatst dit bij 39 °C en onder afwisselend schudden.

Na 1,3,6 of 24 h werden de flesjes uit de incubator gehaald en gekoeld in een ijsbad om de bacteriële groei te stoppen. Na het openen van de flesjes, werd de pH gemeten. Daarna werd 2 ml pensincubatie vloeistof in plastic proefbuizen overgebracht. De rest werd in kleine flesjes overgegoten. Hierop werd dan een mycotoxine analyse uitgevoerd dit met behulp van de LC-MS/MS technologie. Verder werd bij de 2 ml pensincubatie vloeistof 200 µl EBA/mierenzuur (10 mg EBA/ml mierenzuur) toegevoegd. Dit geheel werd dan in de centrifuge van het merk Beckman, type J2 – HS centrifuge geplaatst gedurende 15 min, dit bij een centrifugaalkracht van 22 000 xg. Hierna wordt de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd en in GC-injectieflesjes gedaan. Deze worden in de koelkast bewaard bij 4 °C tot de vetzuuranalyse wordt uitgevoerd. De vetzuuranalyse wordt uitgevoerd volgens de methode van Castro-Montoya *et al.* (2012).

Tabel 10: De pH van de buffer, pensvloeistof en de buffer+pensvloeistof

	Proef 1	Proef 2 (pH 6,8)	Proef 2 (pH 5,8)
pH buffer	6,75	6,77	
pH pensvloeistof	6,25	6,44	
pH buffer + pensvloeistof	6,57	6,73	5,81

3.3. Statistische verwerking

De data worden statistisch verwerkt met SPSS Statistics 21.

Er werd nagegaan of er een verband bestaat tussen de aanwezigheid van één bepaalde mycotoxine en de andere mycotoxinen in de TMR. Er wordt ook nagegaan of er een verschil is tussen de mycotoxinen concentraties die vast gesteld zijn op de bedrijven in West - en Oost Vlaanderen en tussen de bedrijven in Antwerpen. Tot slot wordt er nagegaan of er factoren zijn die het mycotoxine gehalte in het voeder kunnen verhogen.

Voor de proef met de DON incubatie wordt nagegaan of de verschillende DON concentraties en incubatietijdstippen een effect hebben op de vetzuurproducties en de DON afbraak.

Voor de proef met de DON incubatie bij pensverzuring wordt nagegaan of de verschillende DON concentraties, de verschillende incubatietijdstippen en de twee verschillende pH's een effect hebben op de vetzuurproducties en de DON afbraak.

4. Resultaten

4.1. Het voorkomen van mycotoxinen in de TMR

4.1.1. Het mycotoxine gehalte in de TMR

Het resultaat van de mycotoxinen analyse op de TMR is weergegeven in Tabel 11. In deze tabel is te zien dat het gemiddeld TMR volgende mycotoxinen bevatte: NIV (77,87 µg/kg), DON (371,09 µg/kg), 3-acetyl- deoxy-nivalenol (5,22 µg/kg), 15-acetyl- deoxy-Nivalenol (13,78 µg/kg), 3-ADON + 15-ADON (19,00 µg/kg), ZEN (35,87 µg/kg), FB1 (1,52 µg/kg), FB1+ FB2 (1,53 µg/kg) en alternariol (44,17 µg/kg). Het maximum gehalte voor NIV, DON, 3-acetyl- deoxy-nivalenol, 15-acetyl- deoxy-Nivalenol, 3-ADON + 15-ADON, ZEN, FB1, FB1+ FB2 en alternariol was 518 µg/kg, 1628 µg/kg, 48 µg/kg, 88 µg/kg, 134 µg/kg, 682 µg/kg, 35 µg/kg, 35,1 µg/kg en 637 µg/kg respectievelijk. Op bedrijf 1 werd voor drie van de negen waargenomen mycotoxinen de hoogste concentratie teruggevonden. Verder uit Tabel 11 blijkt dat er een grote variatie is in de concentratie tussen de verschillende mycotoxinen. Ook binnen één mycotoxine is er een sterke variatie, die het grootst is voor DON en het laagst voor FB1 en FB1 + FB2. Bedrijf 17 heeft maar liefst zes verschillende soorten mycotoxinen in het voeder zitten. Gemiddeld over alle TMR's bevat een TMR twee soorten van de geteste mycotoxinen.

Tabel 11: Het mycotoxinen gehalte (µg/kg) van de verschillende mengvoeders

	NIV	DON	3-acetyl- deoxy- nivalenol	15- acetyl- deoxy- nivalenol	3-ADON + 15- ADON	ZEN	FB1	FB1 + FB2	Alternariol
1	0	1628	48	87	134	143	0	0	0
2	0	228	0	0	0	0	0	0	0
3	0	95	0	0	0	0	0	0	0
4	0	230	0	0	0	0	0	0	0
5	0	319	0	0	0	0	0	0	0
6	301	452	0	0	0	0	0	0	0
7	0	347	0	0	0	0	0	0	0
8	0	105	0	0	0	0	0	0	0
9	0	310	0	0	0	0	35	35,1	0
10	0	133	0	0	0	0	0	0	637
11	0	271	0	0	0	0	0	0	0
12	0	199	0	0	0	0	0	0	0
13	440	275	0	0	0	0	0	0	0
14	0	102	0	0	0	0	0	0	0
15	518	778	0	88	88	0	0	0	0
16	270	207	0	0	0	0	0	0	0
17	262	1117	40	69	109	0	0	0	34
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	159	0	0	0	0	0	0	168
20	0	795	0	0	0	0	0	0	0
21	0	621	32	73	106	682	0	0	0
22	0	89	0	0	0	0	0	0	177
23	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Gemid- delde	77,87	371,09	5,22	13,78	19,00	35,87	1,52	1,53	44,17

4.1.2. Enquête

Door de geringe mate van voorkomen van de meeste mycotoxinen in de 23 TMR stalen, kon enkel voor DON een vergelijking gemaakt worden.

In Tabel 12 is het verschil tussen de mycotoxinen concentraties die vastgesteld zijn op de bedrijven in West- en Oost-Vlaanderen en tussen de bedrijven in Antwerpen weergegeven. Uit de tabel blijkt er geen significant verschil (Mann-Whitney U of MWU =0,90) is in de DON concentraties tussen de 2 regio's.

Tabel 12: De gemiddelde, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van DON gehalten in West- en Oost-Vlaanderen en Antwerpen

Regio	Aantal	Gemiddelde DON concentratie	Standaard-deviatie	P-waarde
West-Vlaanderen en Oost-Vlaanderen	14	335,29	386,39	MWU =0,90
Antwerpen	9	426,78	405,13	

Tot slot wordt er per vraag uit de enquête nagaan of de verschillende antwoorden een invloed hebben op de concentratie aan mycotoxinen die is waargenomen op datzelfde bedrijf. Dit gebeurde enkel voor DON omdat de overige mycotoxinen niet voldoende frequent voorkwamen. Hierna volgt dus de interacties tussen de antwoorden op de vragen en de DON concentraties.

Het eerste deel van enquête bevatte vragen voor bedrijven die vroeger vermoedelijk last hebben gehad van mycotoxinen, namelijk welke symptomen ze toen vaststelde. Dit deel was van toepassing voor 8 van de 23 bedrijven (34,8 %), waarvan 5 van de 8 (62,5 %) bedrijven een mycotoxine analyse hadden laten uitvoeren. 7 van de 8 (87,5 %) bedrijven maakte toen gebruik van mycotoxine binders. 2 van de 8 (25 %) bedrijven opende een nieuwe kuil of indien de oude kuil verder werd verstrekt, werd gebruik gemaakt van propionzuur. De statistische verwerking van de interactie tussen het DON gehalte en de symptomen, alsook de gemiddelden en standaardafwijkingen zijn terug te vinden in Tabel 13.

Tabel 13: Gemiddelden, standaardafwijkingen en de resultaten van de verwerking van de symptomen

Vraag	Antwoord	Aantal	Gemiddelde DON concentratie (µg/kg)	Standaard - deviatie	P-waarde
Uierontsteking of stijging celgetal	Nee	3	289	100,72	P
	Ja	5	579,40	618,04	=0,469
Platte mest	Nee	5	295,80	231,02	MWU
	Ja	3	761,67	750,49	=0,297
Productiedaling	Nee	2	103,50	2,12	MWU
	Ja	6	592,83	526,83	<0,046
Stijging melkureum	Nee	7	488,14	536,89	MWU
	Ja	1	347,00	-	=0,827
Slechtere vachtconditie	Nee	6	494,17	587,87	MWU
	Ja	2	399,50	74,25	=0,505
Meer klauwproblemen	Nee	4	666,00	675,51	P
	Ja	4	275	155,15	=0,302
Transitie-problemen	Nee	7	488,14	536,89	MWU
	Ja	1	347	-	= 0,827
Vruchtbaarheids-problemen	Nee	4	701,50	326,97	P
	Ja	4	239,50	55,58	=0,213

Na de verwerking kon geen significante interactie vastgesteld worden tussen het DON gehalte en volgende symptomen: mastitis (MWU=0,378), platte mest (KW=0,342), stijging melkureum (MWU=0,827), slechtere vachtconditie (MWU=0,827), meer klauwproblemen (P=0,302), transitieproblemen (MWU=0,827) en vruchtbaarheidsproblemen (P=0,213). Enkel voor de productiedaling kon een significante interactie (MWU <0,046) teruggevonden worden met het DON gehalte. Gemiddeld bevatte deze bedrijven 592,83 µg/kg DON.

De volgende reeks vragen uit de enquête houden verband met het inkuilproces. De gemiddelden, standaardafwijkingen als de statistische verwerking zijn hiervan weergegeven in Tabel 14.

Tabel 14: Gemiddelden, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van vragen in verband met inkuilproces

Vraag	Antwoord	Aantal	Gemiddelde DON concentratie	Standaard-deviatie	P-waarde
Schimmel aantasting op perceel	Nee	16	459,19	434,89	MWU =0,053
	Ja	7	169,71	95,59	
In welk jaar is de maïs geoogst	2013	19	295,63	355,08	MWU <0,035
	2014	4	729,50	368,92	
In welke periode is de maïs geoogst	September	5	598,60	433,30	KW =0,122
	Oktober	8	168,38	88,56	
	November	10	419,50	457,39	
Type kuil	Molshoop	3	412,67	342,73	MWU =0,523
	Sleufsilos	20	364,85	401,24	
Hoe de kuil aanrijden	Tractor	12	447,67	471,93	MWU =0,460
	Bull	11	287,55	265,09	
Toebehoren bij aanrijden van kuil	Niks	8	343,50	398,95	KW=0,443
	Extra gewichten	8	529,88	494,13	
	Brede banden	3	217	94,30	
	Beiden	4	224,25	176,47	
Kuiladditieven in graskuil	Nee	17	382,53	420,66	MWU =0,889
	Ja	6	338,67	303,27	
Maïskuil laagsgewijs inkuilen	Nee	17	255,71	229,45	MWU <0,021
	Ja	6	698,00	563,89	
Graskuil laagsgewijs inkuilen	Nee	12	378,25	357,23	MWU =0,902
	Ja	11	363,27	435,28	
Aantal lagen plastic op maïskuil	1	3	131,33	28,54	KW =0,147
	2	16	310,75	239,12	
	Meer dan 2 l	4	792,25	707,16	
Aantal lagen plastic op graskuil	1	3	459,33	570,27	KW =0,970
	2	18	374,06	387,47	
	Meer dan 2 lagen	2	212,00	151,32	
Eigenschappen van het plastic	Nieuw	9	149,44	102,40	MWU <0,008
	Oud en nieuw	14	513,57	437,61	

Gebruikt u beschermzeilen	Nee	4	285,75	230,68	MWU =0,685
	Ja	19	389,05	415,32	
Gebruikt u banden op de kuil	Nee	3	116,67	37,23	MWU =0,068
	Ja	20	409,25	402,21	
Gebruik u linten op de kuil	Nee	14	332,43	310,72	MWU =0,850
	Ja	9	431,22	498,90	
Gebruikt u grond op u kuil	Nee	17	422,47	413,36	MWU =0,069
	Ja	6	225,50	280,66	
Gebruikt u zandzakken op de kuil	Nee	6	303,5	410,97	MWU =0,327
	Ja	17	394,76	388,76	

Uit de enquête bleek dat er een significant verschil was tussen het DON gehalte van de TMR stalen met maïs die werd geoogst in 2013 en in 2014. TMR stalen met maïs van 2013 bevatte gemiddeld 295,63 µg/kg DON, terwijl TMR stalen met maïs uit 2014 maar liefst 729,50 µg/kg DON bevatte. Verder werd er een significant verschil (MWU<0,021) gevonden tussen TMR stalen waarvan maïs niet of wel laagsgewijs werd ingekuuld, met een gemiddelde concentratie van 255,71 µg/kg DON en 698 µg/kg DON respectievelijk. Er werd geen significante interactie (MWU=0,902) gevonden tussen TMR stalen waarvan de graskuil niet of wel laagsgewijs werd ingekuuld. Tot slot werd er een significantie interactie gevonden tussen het DON gehalte en de eigenschappen van het plastic (MWU<0,008). Op bedrijven waar de kuilen enkel nieuwe plastic werden gedekt bevatte de TMR stalen gemiddeld 149,44 µg/kg DON, terwijl op bedrijven waar de kuilen zowel nieuw als oud plastic werd gebruikt het TMR staal gemiddeld 513,57 µg/kg DON bevatte. Voor alle andere inkuil eigenschappen werden geen significante interacties gevonden: schimmel aantasting op perceel (MWU=0,053), de periode waarin de maïs geoogst werd (KW=0,122), het type kuil (MWU=0,523), hoe de kuil werd aangereden (MWU=0,460), de toebehoren bij het aanrijden van de kuil (KW=0,443), het gebruik van kuiladditieven in de graskuil (MWU=0,889), het aantal lagen plastic van de maïs- (KW=0,147) en graskuil (KW=0,970), het gebruik van beschermzeilen (MWU=0,685) en het gebruik van banden (MWU=0,068), linten (MWU=0,850), grond (MWU=0,069) en zandzakken (MWU=0,327) op de kuil.

Het derde luik uit de enquête bevatte vragen in verband met het uitkuilen. De gemiddelden, standaardafwijkingen als de statistische verwerking zijn hiervan weergegeven in Tabel 15.

Tabel 15: Gemiddelden, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van de vragen in verband met het uitkuilproces

Vraag	Antwoord	Aantal	Gemiddelde DON concentratie	Standaard-deviatie	P-waarde
Heeft u nu last van schimmelgroei in kuilen	Nee	10	459,60	525,66	MWU =0,804
	Ja	13	303,00	237,04	
Wat doet u met beschimmelde zones in kuil	Afvoeren naar mesthoop	19	377,05	371,47	MWU =0,040
	Opzij leggen in de kuil	3	159,00	84,67	
Krijgen u kuilen warm	Nee	8	245,38	238,86	KW =0,283
	Ja	3	492,33	284,65	
	Enkel bij warm weer	12	424,58	479,91	
Uitkuilsnelheid: maïskuil	$\leq 1,5$ m/week	12	388,33	313,75	KW =0,076
	$1,5 < x < 2$ m/week	4	207,00	103,75	
	≥ 2 m/week	7	494,29	547,44	
Uitkuilsnelheid: graskuil	$\leq 1,5$ m/week	13	439,77	451,31	KW =0,076
	$1,5 < x < 2$ m/week	4	1140	38,87	
	≥ 2 m/week	6	393,67	323,19	

Er werd een significante interactie (MWU=0,040) teruggevonden tussen het DON gehalte en wat de melkveehouder doet met de beschimmelde delen in de kuil. Zo bevatte de TMR stalen waar de beschimmelde delen uit de kuil onmiddellijk werden afgevoerd naar de mest hoop 377,05 µg/kg DON en de TMR stalen waar de beschimmelde delen eerst opzij werden gelegd in de kuil 159,00 µg/kg DON. Voor de andere uitkuileigenschappen werd geen significante interacties teruggevonden: schimmelgroei in de kuil (MWU=0,804), kuilen die broeierig worden (KW=0,283) en de uitkuilsnelheid van de maïs- (KW=0,076) en graskuil (KW=0,076).

Het vierde deel van de enquête bevatte vragen in verband met de eigenschappen van het rantsoen. De gemiddelden, standaardafwijkingen als de statistische verwerking zijn hiervan weergegeven in Tabel 16.

Tabel 16: Gemiddelden, standaardafwijkingen en de statistische verwerking van vragen in verband met de rantsoeneigenschappen

Vraag	Antwoord	Aantal	Gemiddelde DON concentratie	Standaard-deviatie	P-waarde
DS % maïskuil	≤ 34	9	285,56	232,62	P=0,322
	34 < x < 37	7	377,00	374,09	
	≥ 37	5	623,80	612,08	
DS % graskuil	≤ 40	12	367,83	444,84	KW =0,512
	40 < x < 50	4	258,00	155,13	
	≥ 50	5	576,40	576,4	

Verder werd er geen significante interactie teruggevonden tussen het DS % van de maïskuil (P=0,322) en de graskuil (KW=0,512).

Het laatste luik uit de enquête bevatte vragen in verband met het teeltsysteem. De gemiddelde, standaardafwijkingen als de statistische verwerking zijn hiervan weergegeven in Tabel 17.

Tabel 17: Gemiddelden, standaardafwijkingen en statistische verwerking van de vragen in verband met het teeltsysteem

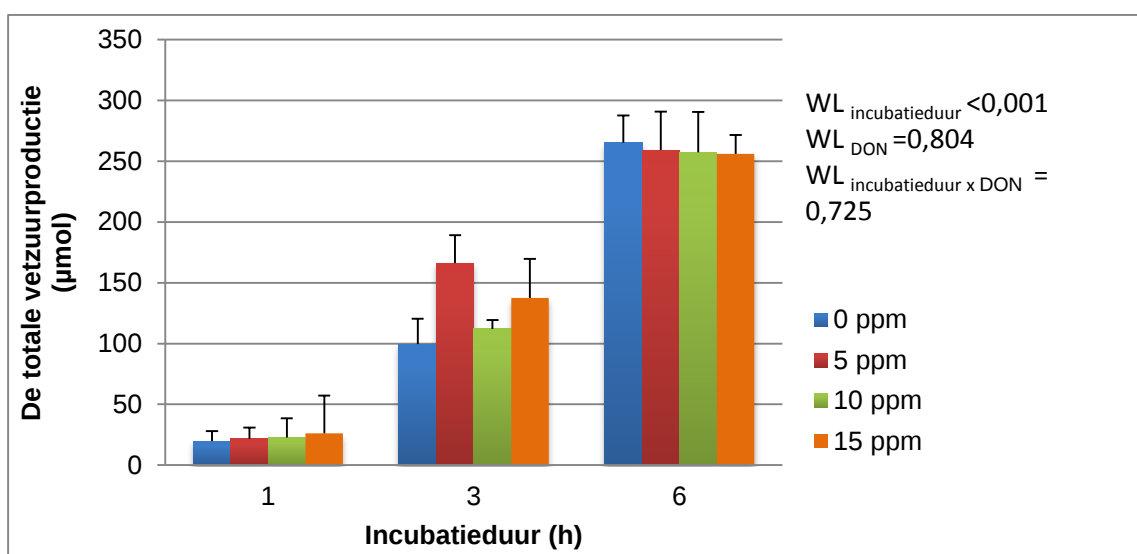
Vraag	Antwoord	Aantal	Gemiddelde DON concentratie	Standaard-deviatie	P-waarde
Vrucht-wisseling	Nee	6	483,33	398,41	KW =0,470
	Ja, rotatie met 2 tussenteelten, daarna maïs	3	650,33	849,29	
	Ja, rotatie 2 jaar gras, daarna maïs	4	250	356,32	
	Ja, gras - maïs	10	621	268,40	
Alle percelen ploegen	Nee	2	239,00	113,14	MWU =1
	Ja	21	383,67	403,03	

Tot slot werd er geen significante interacties tussen het DON gehalte en vruchtwisseling (KW=0,470) en tussen het DON gehalte en ploegen (MWU=1).

4.2. Incubatie met DON

4.2.1. De invloed van DON op de vetzuurproductie

Bij het uitvoeren van een *Two-Way ANOVA* was niet voldaan aan de voorwaarden van normaliteit en gelijkheid van varianties. Daarom wordt een niet parametrische *kruskal wallis* test uitgevoerd, gevolgd door een *Mann whitney U* test. Hier werden alle vetzuurproducties binnen 1 incubatieduur vergeleken. Om de interacties tussen het DON gehalte, incubatieduur en vetzuurproductie na te gaan worden de resultaten geanalyseerd met behulp van de Wilks's Lambda (WL) parameter. In Figuur 2 worden de gemiddelde totale vetzuurproducties en de standaarddeviatie weergegeven in functie van de incubatieduur en het DON gehalte.



Figuur 2: De gemiddelde en standaarddeviatie van de totale vetzuurproductie in functie van de incubatieduur en het DON gehalte en de resultaten van de verwerking

In Figuur 2 is te zien dat de incubatieduur, de vetzuurproductie significant beïnvloedt ($WL < 0,001$). Hoe langer de incubatie duurt, hoe meer vetzuren er worden gevormd. Verder is er geen significant verband ($WL = 0,804$) vastgesteld tussen de DON concentratie en de vetzuurproductie. Het DON gehalte heeft dus geen invloed op de pensfermentatie. Tot slot werd geen significantie interactie ($WL = 0,725$) vastgesteld tussen de vetzuurproductie, incubatieduur en DON gehalte.

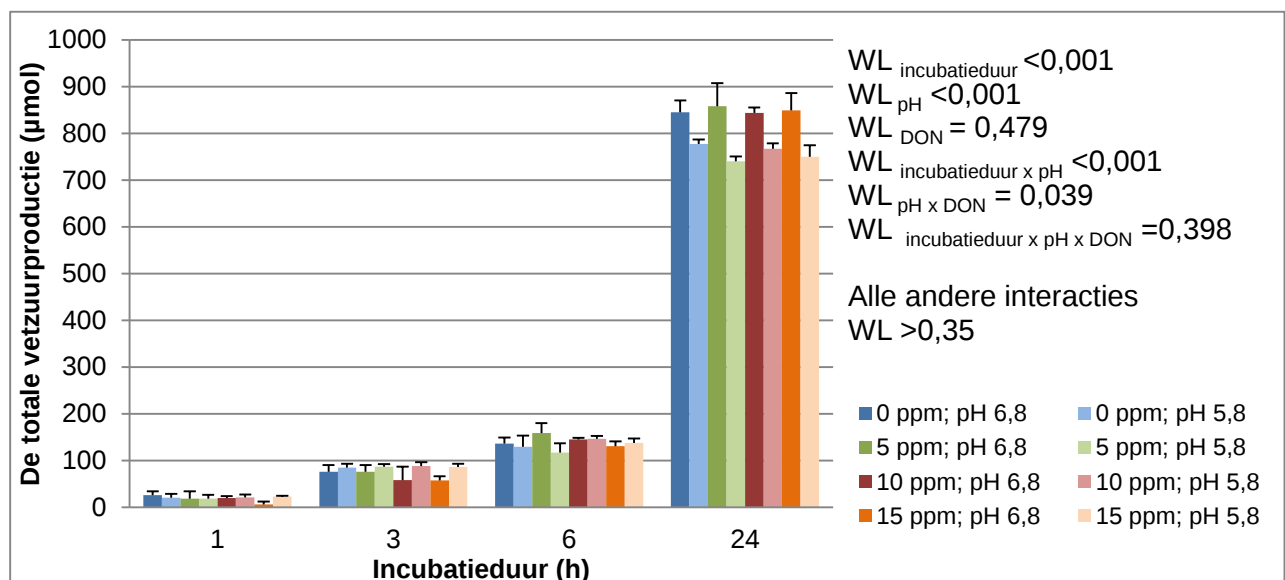
4.2.2. De afbraak van DON

De resultaten van de DON afbraak waren niet binnen, waardoor deze gegevens niet konden verwerkt worden.

4.3. Incubatie met DON bij pensverzuring

4.3.1. De invloed van DON op de vetzuurproductie bij pensverzuring

Proef 2 wordt geanalyseerd met behulp van een *Two-Way ANOVA* maar omdat aan de voorwaarden van normaliteit en de gelijkheid van de varianties niet wordt voldaan, wordt de proef geanalyseerd met behulp van de Wilks's Lambda (WL) parameter. Op Figuur 3 zijn de resultaten van deze verwerking weergegeven alsook de totale vetzuurproducties per incubatieduur, DON concentratie en pH en de standaarddeviatie van de vetzuurproductie.



Figuur 3: De gemiddelde en standaarddeviatie van de vetzuurproductie in functie van de incubatieduur, DON concentratie en pH en resultaten van de statistische verwerking

Op Figuur 3 is te zien dat de incubatieduur, de vetzuurproductie significant beïnvloedt ($WL < 0,001$). Hoe langer de incubatie duurt, hoe meer vetzuren er worden gevormd. Dit verschil is het grootst tussen incubatieduur 24 h en de rest. Tussen de vetzuurproductie en pH is er een significant verband ($WL < 0,001$) vastgesteld. Op de figuur is te zien dat vetzuurproducties bij de lagere pH (5,8) vaak lager liggen dan bij een normale pens pH (6,8). De vetzuurproductie wordt niet significant ($WL = 0,479$) beïnvloedt door de DON concentraties. DON heeft dus geen effect op de pensfermentatie. Verder is er een significant verband ($WL < 0,001$) tussen de vetzuurproductie, incubatieduur en de pH. Hoe langer de incubatie duurt, hoe groter het verschil in vetzuurproductie tussen de 2 verschillende pH's. Wanneer de interactie vetzuurproductie, pH en DON concentratie wordt nagegaan, wordt een significant verband ($WL < 0,039$) vastgesteld. Om hier een beter zicht op te krijgen werd Tabel 18 opgesteld.

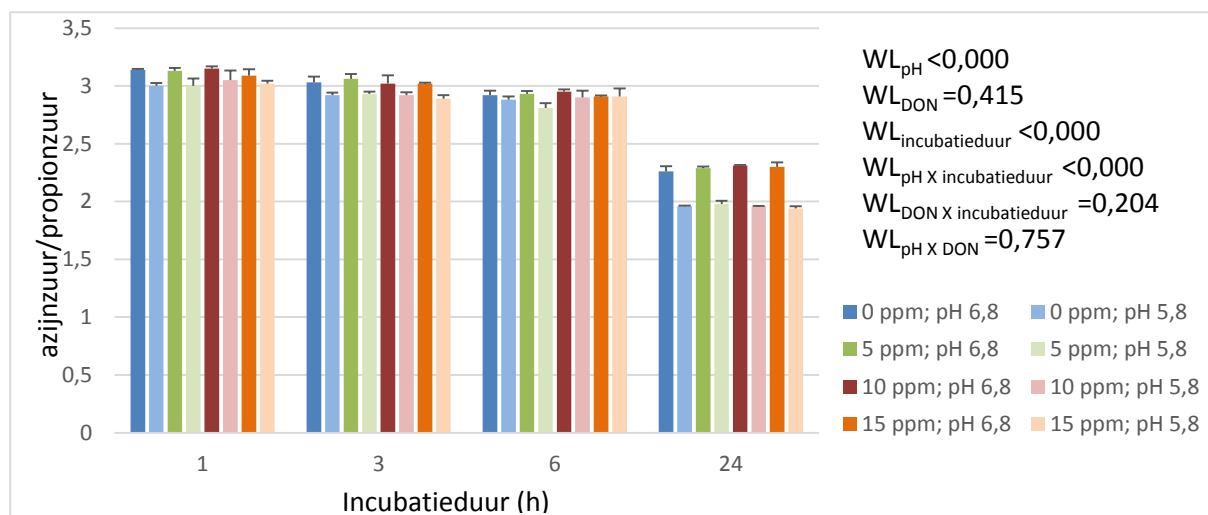
Tot slot is er geen significante invloed ($WL = 0,398$) van de interactie tussen incubatieduur, pH, DON concentratie op de vetzuurproductie waar te nemen. Bij alle andere interacties wordt geen significant verband ($WL > 0,35$) vastgesteld.

Tabel 18: Het effect van de pH en DON concentratie op de totale vetzuurproductie (μmol)

pH	6,8	5,8
0 ppm DON	270,72	253,05
5 ppm DON	277,34	240,68
10 ppm DON	266,61	255,70
15 ppm DON	260,99	249,27

Uit tabel 18 blijkt dat bij pH 6,8 de vetzuurproducties bij de hoger concentraties (10 en 15 ppm DON) duidelijk lager liggen ten opzichte van de lage concentratie (5 ppm DON). Bij 5 ppm DON was de concentratie waarschijnlijk te laag om een invloed te hebben op de vetzuurproductie. Bij pH 5,8 was de variatie niet gerelateerd met de DON-concentratie. Zo werd de laagste vetzuurproductie vastgesteld bij 5 ppm DON.

Om een beter beeld te krijgen op het feit de samenstelling van de pens al dan niet wordt gewijzigd, werd een statistische verwerking gedaan van de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding op analoge wijze als voorgaande analyse. In Figuur 4 zijn de resultaten van deze verwerking weergegeven alsook de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding per incubatieduur, DON concentratie en pH en de standaarddeviatie van de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding.



Figuur 4: De gemiddelde en standaarddeviatie van de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding in functie van de incubatieduur, DON concentratie en pH en resultaten van de statistische verwerking

In Figuur 4 is te zien dat de pH en de incubatieduur, de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding significant beïnvloedt ($WL < 0,001$). De verhouding kent een dalend verloop naarmate de incubatieduur langer wordt en ligt bij pH 5,8 telkens lager ten opzichte van de waarden bij pH

6,8. Dit alles wijst op een verandering van de microbiële samenstelling van de pens bij een pH van 5,8.

4.3.2. De afbraak van DON bij pensverzuring

De resultaten van de DON afbraak waren niet binnen, waardoor deze gegevens niet konden verwerkt worden.

5. Discussie

5.1. Het voorkomen van mycotoxinen in de TMR

5.1.1. Het mycotoxine gehalte in de TMR

Een verschil met Tabel 8 uit de literatuurstudie (Driehuis *et al.*, 2008b; Zachariasova *et al.*, 2014) en de geteste mycotoxinen is het feit dat MPA, CIT en patuline niet werd bepaald in de TMR stalen maar wel DON derivaten en alternariol. ROC werd wel bepaald, maar werd in geen enkel staal teruggevonden. Een belangrijke opmerking hierbij is dat het grootste deel van de stalen in het najaar genomen zijn. In deze periode is het minder warm dan in de zomer waardoor je dus ook minder kans hebt op bewaarschimmels.

Zowel het gemiddelde (77,87 µg/kg) NIV gehalte als het maximale (518 µg/kg) waargenomen NIV gehalte liggen een stuk lager dan wat Zachariasova *et al.* (2014) gevonden heeft, namelijk 307 µg/kg en 1175 µg/kg respectievelijk. In maar liefst 22 van de 23 TMR stalen wordt DON gedetecteerd (95,7 %), wat een heel stuk hoger is dan wat Driehuis *et al.* (2008b) heeft bepaald (81 %). Het gemiddelde DON gehalte (371,09 µg/kg) ligt tussen de gevonden waarden in de literatuur, namelijk 273 µg/kg (Driehuis *et al.*, 2008b) en 524 µg/kg (Zachariasova *et al.*, 2014). Het maximale waargenomen DON gehalte (1628 µg/kg) ligt wel een stuk hoger dan wat wordt teruggevonden in de literatuur, namelijk 939 µg/kg (Driehuis *et al.*, 2008b) en 1262 µg/kg (Zachariasova *et al.*, 2014). ZEN werd slechts in 2 van de 23 stalen waargenomen (8,7 %). Dit is een heel stuk lager dan de 46 % van Driehuis *et al.* (2008b). Het gemiddelde ZEN gehalte in de voederstalen bedraagt 35,87 µg/kg, wat goed overeenkomt met de 28 µg/kg die Driehuis *et al.* (2008b) heeft teruggevonden. Het maximale ZEN gehalte (682 µg/kg) dat werd teruggevonden in de stalen is een heel stuk hoger dan maximale waarde uit de literatuur (203 µg/kg) (Driehuis *et al.*, 2008b). Zowel de gemiddelde als maximumwaarden FB1, FB2 als FB1 + FB2 komen relatief goed overeen met de resultaten uit de literatuur.

Met andere woorden is de gemiddelde en maximum concentratie van NIV lager ten opzichte van de resultaten in de literatuur. De maximale waarden van DON en ZEN waren daarentegen hoger. Een belangrijke opmerking hierbij is dat deze mycotoxinen afkomstig zijn van de veldschimmel *Fusarium spp.* De aanwezigheid van deze schimmel en de productie van mycotoxinen wordt sterk beïnvloed door weersomstandigheden waardoor de

concentratie van jaar tot jaar zeer sterk kan uiteenlopen (Audenaert *et al.*, 2013b; Yiannikouris & Jouany, 2002). Dit kan ook een verklaring zijn voor de verschillende resultaten uit de literatuur onderling.

Wanneer de resultaten van de mycotoxinen bepaling vergeleken worden met de toegelaten maximale gehalten van FAO en OVOCOM, blijkt enkel de grenswaarde van ZEN (500 µg/kg) overschreden te zijn op bedrijf 21 (682 µg/kg). Alle andere waargenomen mycotoxinen gehalten liggen onder de grenswaarden. Op het moment dat de enquête werd afgenomen, melde deze melkveehouder geen problemen in verband met de vruchtbaarheid. Bij nader navraag aan deze melkveehouder melde hij dat er in de periode na de staalname (oktober) tot maart er heel veel problemen waren om koeien drachtig te krijgen. Ook volgens Jouany & Diaz (2005) en Upadhaya *et al.* (2010) leiden hoge gehalten aan ZEN tot minder drachten. Het rantsoen van dit bedrijf bevat volgende ingrediënten: maïskuil, graskuil, pulp, draf, tarwe, eiwitkernen en proficron. Eerst en vooral kan het voor het bedrijf interessant zijn om het ZEN gehalte in deze voedermiddelen te bepalen. Indien ZEN enkel aanwezig is in de aangekochte voedermiddelen, kan geadviseerd worden om andere voedermiddelen in het rantsoen te gebruiken. Indien de ZEN contaminatie vooral afkomstig is van de maïskuil, wordt geadviseerd om eerst en vooral gebruik te maken van anorganische mycotoxinen binder met verschillende lagen smectiet, vermits dit het best ZEN bindt (Mil *et al.*, 2015). Een andere optie is het gebruik van organische binders zoals gistencelwanden of melkzuurbacteriën (Devreese *et al.*, 2013). Toch is het beheersen van schimmels die instaat zijn mycotoxinen te produceren voor en tijdens de oogst van de maïs de belangrijkste methode om het ZEN gehalte te beheersen (Upadhaya *et al.*, 2010). Dit kan gerealiseerd worden door het toepassen van goede landbouwpraktijken zoals vruchtwisseling (Alltech, 2008; Devreese *et al.*, 2013; Landschoot *et al.*, 2012), ploegen (Alltech, 2008; Audenaert *et al.*, 2013b; Devreese *et al.*, 2013; Landschoot *et al.*, 2013) en niet te laat oogsten (Van Asselt *et al.* 2012; Upadhaya *et al.*, 2010).

5.1.2. Enquête

Uit de enquête blijkt dat 34,8 % van de melkveehouders vermoedelijk ooit al last hebben gehad van mycotoxinen. Er werd geen significant verschil gevonden in het DON gehalte tussen bedrijven in West - en Oost Vlaanderen en tussen de bedrijven in Antwerpen. Dit kan er op wijzen dat zowel het teeltmanagement, grondbewerkingen en weersomstandigheden te weinig verschillen tussen beiden regio's om een duidelijke invloed te hebben op het DON gehalte.

Op de bedrijven die vroeger al eens het vermoeden hebben gehad van een mycotoxine besmetting, werd enkel een interactie gevonden tussen het DON gehalte en een lagere melkproductie. Ook Jouany & Diaz (2005) en Rodrigues (2014) stelden dit vast na de vervoeding van zeer hoge concentraties DON (440 000 µg/kg). Deze werden echter niet vastgesteld in de TMR stalen.

Uit de enquête bleek dat de TMR stalen waarin maïs werd gebruikt die gehakseld was in 2014 significant meer DON bevatte dan de stalen die maïs bevatte uit 2013. Ook volgens BEMEFA (2014) bevatte de maïs van 2014 meer DON ten opzichte van de maïsogst van 2013, wat de sector toeschrijft aan het vochtige en warme weer tijdens de bloeiperiode. Ook volgens Audenaert *et al.* (2013b) leiden deze klimatologische omstandigheden tot een verhoogd DON gehalte.

Ook werd een verband gevonden tussen het laagsgewijs inkuilen van maïs en het DON gehalte van de TMR stalen. Een belangrijke opmerking hierbij is dat de schimmels die DON produceren, namelijk *Fusarium* schimmels, slecht in uitzonderlijke gevallen een bewaarschimmel zijn (Haesaert, 2014). Hieruit kan besloten worden dat de gevonden significantie interactie waarschijnlijk te wijten is aan het toeval. Dit wordt ook bevestigd door het feit dat er geen significante interactie werd gevonden tussen het niet en wel laagsgewijs inkuilen van de graskuil en dat hier de antwoorden wel beter verdeeld waren (dus meer waarnemingen per antwoord) ten opzicht van de antwoorden bij het laagsgewijs inkuilen van de maïskuil.

Tot slot werd op bedrijven waar de kuilen gedekt werden met enkel nieuw plastic, minder DON teruggevonden in de TMR stalen, dan op bedrijven die nieuw en oud plastic gebruiken. Oud plastic bevat veelal gaten. Wanneer er dan ook in nieuw plastic een gat zit, kan er gemakkelijk lucht in de kuil. Als dit gebeurt tijdens het dekken van de kuil worden geen anaerobe omstandigheden bereikt en wordt de kuil niet aangezuurd. In deze omstandigheden kunnen de *Fusarium* schimmels toch nog verder groeien en ook DON produceren, ondanks dat het veldschimmels zijn. Om deze veronderstelling te bevestigen, kan een onderzoek uitgevoerd worden waarbij maïs ingekuild wordt in kuilen met gaten. Op deze plaatsten kan dan het DON gehalte tijdens het inkuilen als bij het uitkuilen bepaald worden en nagaan of deze stijgt tijdens het inkuilproces.

Voor alle andere inkuil eigenschappen werd geen significant verband gevonden met het DON gehalte: schimmel aantasting op perceel, de periode waarin de maïs geoogst werd, het type kuil, hoe de kuil werd aangereden, de toebehoren bij het aanrijden van de kuil, het gebruik van kuiladditieven in de graskuil, het aantal lagen plastic van de maïs- en graskuil, het gebruik van beschermzeilen en het gebruik van banden, linten, grond en zandzakken op de kuil. Toch zou volgens Alltech (2008) en Devreese *et al.* (2013) goede landbouwpraktijken rond het inkuilen tot een verminderd mycotoxine gehalte moeten leiden. Ook hier kan het verschil verklaard door het feit dat vooral DON werd teruggevonden en dit toxine geproduceerd wordt door een veldschimmel die slechts in uitzonderlijke gevallen een bewaarschimmel is (Haesaert, 2014).

Er werd een significant verband teruggevonden tussen het DON gehalte en wat de melkveehouder doet met de beschimmelde delen van de kuil. Hier had de groep waar de beschimmelde delen onmiddellijk werden afgevoerd naar de mest hoop een hoger DON concentratie dan op de bedrijven waar de beschimmelde delen eerst opzij werden gelegd in de kuil. Zoals eerder al vermeld wordt DON geproduceerd door *Fusarium* schimmels die

hoofdzakelijk veldschimmels zijn. Tijdens in het inkuilen komen deze in de kuil terecht maar overleven wellicht het inkuil proces niet waardoor ze niet meer kunnen sporuleren en opnieuw infecteren. Het gehalte aan *Fusarium* toxinen kan dus niet beïnvloed worden door de manier waarop de beschimmelde delen worden afgevoerd. Het kleine aantal herhalingen (3) zal voor een toevallige significantie hebben gezorgd.

Voor de schimmelgroei in de kuil, kuilen die warm krijgen en uitkuilsnelheid werd geen verband gevonden met DON wat opnieuw kan verklaard worden door het feit dat DON geproduceerd wordt door veldschimmels (Haesaert, 2014).

Tussen het DS % van de maïskuil en de graskuil werd geen verband gevonden met het DON gehalte, alsook het oogstmoment van de maïs. Dit is in tegenstelling met Van Asselt *et al.* (2012) en Upadhaya *et al.* (2010) die veronderstellen dat maïs die langer op het veld heeft gestaan, meestal een hoger DS % heeft en meer kans bezit op een *Fusarium* besmetting en een hoger DON gehalte.

Er werd geen significante interacties gevonden tussen het DON gehalte en vruchtwisseling. Dit is in tegenstelling tot de bevindingen van Alltech (2008), Devreese *et al.* (2013) en Landschoot *et al.* (2012) die veronderstellen dat teelrotatie belangrijk is om inoculumopbouw te voorkomen, zeker wanneer maïs in de rotatie zit, wat van toepassing is op melkveebedrijven.

Tot slot werd er geen significante verband gevonden tussen het DON gehalte en ploegen, wat in tegenstelling is met de bevindingen van Audenaert *et al.* (2013b), Devreese *et al.* (2013) en Landschoot *et al.* (2013). Ploegen zorgt er volgens hen voor dat door een zuurstofgebrek in de grond het inoculum zich niet verder ontwikkeld. Ook hier kan het verschil verklaard worden door het lage aantal herhalingen (2) van het niet ploegen.

5.2. Incubatie met DON

5.2.1. De invloed van DON op de vetzuurproductie

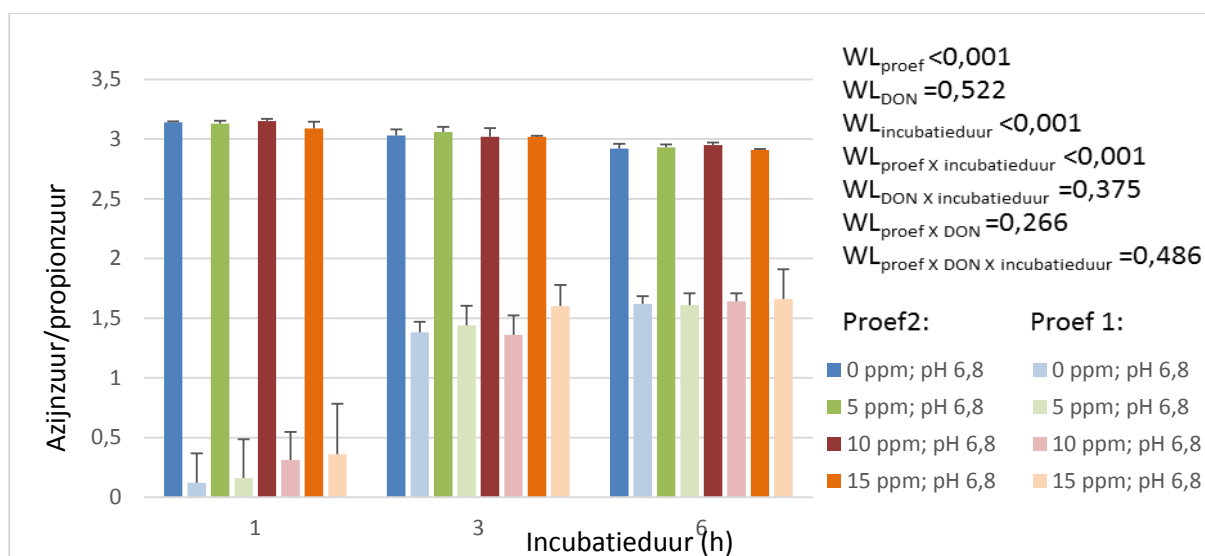
Uit de *in vitro* incubatie proef kan besloten worden dat DON een effect heeft op de vetzuurproductie, dit bij een pH 6,8 in de tweede proef. Bij eenzelfde pH in de eerste proef werd geen effect vastgesteld van DON, alsook bij een pH 5,8 bij proef 2. Uit de literatuur blijkt dit vooral bij hogere concentraties (40 ppm) (Jeong *et al.*, 2010), terwijl hier al een significant effect zichtbaar is bij beduidend lagere concentraties (10 ppm). Toch is dit effect zeer klein wat een verklaring kan zijn waarom er bij de eerste incubatieproef, waar dezelfde pH werd gehanteerd, geen effect werd waargenomen.

Hoewel een statistisch effect wordt waargenomen, is het duidelijk dat de biologische relevantie van dit effect minimaal is, meer bepaald een maximale daling van gemiddeld 10 μmol (3,7 %). In dit opzicht zijn beide experimenten niet tegengesteld.

Op Figuur 3 is te zien dat de verschillen vooral bij de eerste incubatietijdstippen voorkomen, waarbij de combinatie van 1 h incubatie met 15 ppm DON nagenoeg geen vluchtige vetzuren (VVZ) geproduceerd worden en ook na 3 h zijn er duidelijk minder VVZ geproduceerd. Dit zou er op kunnen wijzen dat de activiteit van de bacteriën die bij pH 6,8 worden gestimuleerd, tijdelijk onderdrukt worden in het begin van de incubatie door aanwezigheid van DON, dit mogelijk tot het moment dat DON is gemetaboliseerd. Toch blijkt uit de literatuur dat herkauwers in hun pens slechts 5 tot 10 ppm DON kunnen omzetten zonder enige nadelige gevolgen op de gezondheid en de prestaties van de runderen (Abidin & Khatoon, 2012; Dänicke *et al.*, 2002). Door deze omzetting ontstaat de-epoxy DON, wat veel minder toxisch is (Abidin & Khatoon, 2012; Jeong *et al.*, 2000; Jouany & Diaz, 2005; Seeling *et al.*, 2006).

Bij een lagere pH lijkt de invloed van DON minder groot wat in tegenstrijd is met de literatuur die vermeldt dat pensverzuring leidt tot een lagere DON afbraak (Abidin & Khatoon, 2012; Fink-Gremmels, 2008b; Haesaert, 2014), dit in een *in vivo* studie (Abidin & Khatoon, 2012). Een lagere DON afbraak zorgt er voor dat DON langer een nadelig effect kan uitoefenen op de pensflora waardoor de samenstelling ervan wijzigt (Jeong *et al.*, 2010; Rodrigues, 2014). Hierdoor verandert ook de productie van VVZ en wordt pensfermentatie capaciteit gereduceerd (Jeong *et al.*, 2010). Een verklaring voor deze tegenstrijdigheden, is dat er eventueel andere groepen van de microbiële gemeenschap worden gestimuleerd bij deze lagere pH (5,8), die minder gevoelig zijn voor DON. Een wijziging van de samenstelling van de microbiële gemeenschap in pens wordt gesuggereerd door de lagere Azijnzuur/propionzuur-verhouding bij pH 5,8 ten opzichte van pH 6,8. Ook uit de literatuur blijkt dat de pH het microbieel systeem van de pens beïnvloedt waardoor ook de productie van VVZ wordt beïnvloed (Colman *et al.*, 2012) zoals een verminderde azijnzuurproductie en een hogere propionzuurproductie bij een lagere pH (Colman *et al.*, 2015). Hierdoor wordt een lagere Azijnzuur/Propionzuur-verhouding bekomen, wat overeenkomt met het verloop van Figuur 4.

Het tegenstrijdig resultaat van proef 1 en 2 kan ook verklaard worden door het feit dat in proef 1 waarschijnlijk een minder gevoelige populatie in het inoculum zat, een populatie die meer lijkt op de populatie van proef 2 bij een pH 5,8, waardoor er in proef 1 geen effect te zien was van DON. Dit wordt ook gesuggereerd uit Figuur 5 waaruit blijkt dat de Azijnzuur/propionzuur-verhouding significant ($WL < 0,001$) lager was bij proef 1. Verder kent de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding bij proef 1 een stijgend verloop naarmate de incubatie langer duurt, terwijl voor proef 2 deze verhouding afneemt naarmate de incubatie langer duurt. Hoewel het inoculum van dezelfde schapen op hetzelfde rantsoen wordt bekomen, zou dit kunnen te wijten zijn aan 'dagverschillen' tussen het aangeleverde inoculum.



Figuur 5: De gemiddelde en standaarddeviatie van de Azijnzuur/Propionzuur-verhouding van in functie van de incubatieuur, DON concentratie en de proef en resultaten van de statistische verwerking

Het feit dat de hogere gevoeligheid voor DON onder de meer acidotische *in vitro* omstandigheden niet werd waargenomen, kan eveneens verband houden met de manier waarop de acidotische omstandigheden *in vitro* werden gesimuleerd, die niet volledig overeenstemmen met de *in vivo* omstandigheden van pensacidose. Op basis van de acidose-definitie, bijvoorbeeld pH < 5,8 gedurende 8 h (Colman *et al.*, 2015) werd een *in vitro* simulatie opgesteld waarbij de pH gedurende 24 h op 5,8 werd gehouden. Dit wijkt echter mogelijk af van wat zich *in vivo* afspeelt waar schommelingen van de pH worden vastgesteld (Colman *et al.*, 2012; Colman *et al.*, 2015). Deze schommelingen zorgen ervoor dat de pH op bepaalde momenten veel lager kan zijn dan 5,8 en op andere momenten kan de pH dan weer ruim boven 6 vallen. Dergelijke schommelingen kunnen mogelijk een andere stress veroorzaken op de microbiële populatie dan een constante lage pH zoals toegepast in de incubaties. Het zou dus interessant zijn om dergelijke situaties *in vitro* te gaan simuleren om zo een beter beeld te krijgen van de werkelijkheid.

Uit de literatuur blijkt dat bewaarschimmels mycotoxinen produceren met antimicrobiële, antiprotozoaire of antifugale activiteit (Fink-Gremmels, 2008b; Rodrigues, 2014) waardoor ze de penswerking kunnen drukken. Hierdoor wordt het potentieel van de pens om andere mycotoxinen af te breken sterk verminderd (Abidin & Khatoon, 2012; Alltech, 2008; Fink-Gremmels, 2008b; Rodrigues, 2014) waardoor mycotoxinen zelf in lagere gehalten kunnen 'samenwerken' en problemen veroorzaken bij het rund (Alltech, 2008). Om dit te onderzoeken kan deze proef opnieuw uitgevoerd worden, maar deze keer in combinatie met een mycotoxine dat geproduceerd wordt door een bewaarschimmel.

Wanneer nu beide onderzoeken, namelijk de mycotoxine samenstelling van de TMR stalen en de *in vitro* incubaties met elkaar worden vergeleken, kan besloten worden dat er in praktijk

waar een gemiddelde concentratie van 371,09 µg/kg (0,371 ppm) wordt vastgesteld er geen problemen op pens niveau zullen optreden.

6. Algemeen besluit

De TMR stalen hadden in vergelijking met de literatuur een lagere gemiddelde en maximum concentratie aan NIV, terwijl de maximale concentraties van DON en ZEN hoger lagen. Er werden geen maximale grenswaarden overschreden, behalve voor één mycotoxine (ZEN) op één bedrijf.

Tussen het DON gehalte van bedrijven in West - en Oost Vlaanderen en van de bedrijven in Antwerpen, werd geen significant verschil gevonden.

Op de bedrijven die vroeger al eens het vermoeden hebben gehad van een mycotoxine besmetting, werd een significant verband gevonden tussen het DON gehalte en een lagere melkproductie. Dit wijst er op dat DON de melkproductie kan reduceren, wat ook vastgesteld wordt in de literatuur. Hierbij dient wel opgemerkt te worden dat bij contaminatie proeven zoals vermeld in de literatuur vaak zeer hogere concentraties worden gebruikt. TMR stalen waarin maïs werd gebruikt die gehakseld was in 2014, bevatte significant meer DON dan de stalen die maïs bevatte uit 2013. Dit komt overeen met de vaststelling uit de literatuur. De oorzaak van het hoger DON gehalte in 2014 is te wijten aan het warme weer tijdens de bloei periode.

Op bedrijven waar nieuw en oud plastic werd gebruikt om de kuil af te dekken, werd significant meer DON teruggevonden dan op bedrijven waar enkel nieuw plastic werd gebruikt.

Tussen het droge stof gehalte van de maïs- en graskuil werd er geen significant verband gevonden met het DON gehalte van de TMR stalen, ook het oogstmoment van de maïs beïnvloed het DON-gehalte niet. Dit is in tegenstelling met de literatuur, waarbij wordt gesuggereerd dat maïs die langer op het veld heeft gestaan, meestal een hoger droge stof gehalte heeft en meer kans op een *Fusarium* besmetting en een hoger DON gehalte. Ook voor zowel vruchtwisseling als ploegen werd geen significant verband gevonden met het DON gehalte van de TMR stalen. Dit is in tegenstelling met de literatuur waar deze goede landbouwpraktijken worden aangehaald als belangrijke maatregelen om inoculumopbouw te voorkomen. Deze tegenstrijdige resultaten kunnen verklaard worden door het lage aantal herhalingen.

Uit de *in vitro* incubatie proef werd besloten dat DON concentraties tot 15 ppm geen tot een minimaal effect hadden op de pensfermentatie, dit bij een pH van 6,8. Bij langere incubatieduur werd geen effect waargenomen, terwijl enige onder vermindering van de fermentatieduur werd vastgesteld. Bij een lagere pH was geen invloed van DON zichtbaar.

Wanneer beide onderzoek (de enquête en de *in vitro* incubaties) met elkaar werden vergeleken, kon besloten worden dat in praktijk, waar een gemiddelde concentratie van 0,371 ppm DON werd vastgesteld, geen problemen op pensniveau kan worden verwacht.

Referentielijst

- Abidin, Z.U. & Khatoon, A. (2012). Ruminal microflora, mycotoxin inactivation by ruminal microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: A review. *International Journal of Veterinary Science*, 1(1), pp. 37-44.
- Alltech. (2008). Mycotoxine gids rundvee. Geraadpleegd op 2 februari 2015.
- Alltech. (z.j.). Mycotoxin Hazard Analysis Program: Mycotoxin impact on Dairy cows. Geraadpleegd op 2 februari 2015.
- Audenaert, K., De Boevre, M., Vanheule, A., Callewaert, J., Bekaert, B., Höfte, M., DeSaeger, S. & Haesaert, G. (2013a). Mycotoxin glucosylation in commercial wheat varieties: impact on resistance to *Fusarium graminearum* under laboratory and field conditions. *Food Control*, 34, pp. 756-762.
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte M. & Haesaert, G. (2013b). Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxin*, 6(1), pp. 1-19.
- BEMEFA. (2014). Maïsoogst 2014 gekenmerkt door verhoogde mycotoxinegehalten. Geraadpleegd op 7 mei 2014 via http://www.bemefa.be/BEMEFA_Persberichten.aspx?lang=nl
- Caloni, F., Spotti, M., Op den Camp, H., Fink Gremmels, J. & Pompa, G. (2000). In vitro metabolisme of fumonisin B1 by ruminal microflora. *Veterinary Research Communications*, 24(6), pp. 379-387.
- Castro-Montoya, J., De campeneere, S., Van Ranst, G. & Fievez, V. (2012). Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on in vitro methane and VFA production. *Animal Feed Science and Technology*, 176, pp. 47-60.
- Colman, E., Tas, B.M., Waegeman, W., De Baets, B. & Fievez, V. (2012). The logistic curve as a tool to describe the daily ruminal pH pattern and its link with milk fatty acids. *Journal Dairy Science*, 95, pp. 5845-5865.
- Colman, E., Waegeman, W., De Baets, B. & Fievez, V. (2015). Prediction of subacute ruminal acidosis based on milk fatty acids: a comparison of linear discriminant and support vector machine approaches for model development. *Computers and Electronics in Agriculture*, 111, pp. 179-185.
- Dänicke, S., Gädeken, D., Ueberschär, K.H., Meyer, U. & Scholz, H. (2002). Effects of *Fusarium*-toxincontaminated wheat in ruminant nutrition. *Mycotoxin Research*, 18, pp. 24-27.

- Declerck, S., Van Hove, F., Bastiaanse, H., Pussemier, L., Tangni, E., Haesaert, G., Daemers, E., Depoorter, J., Blust, R., Robbens, J. & Nobels, I. (2009). Characterization of fungal species and mycotoxins contaminating silages in Belgium. Belgian Federal Science Policy Office.
- De Mil, T., Devreese, M., De Baere, S., Van Ranst, E., Eeckhout, M., De Backer, P. & Croubels, S. (2015). Characterization of 27 mycotoxin binders and the relation with *in vitro* zearalenone adsorption at a single concentration. *Toxins*, 7, pp. 21-33.
- Devreese, M., De Backer, P. & Croubels, S. (2013). Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 82, pp. 181-190.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. & Te Giffel, M.C. (2008a). Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Additives & contaminants: Part B: Surveillance*, 1(1), pp. 41-50.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. & Te Giffel, M.C. (2008b). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal Dairy Science*, 91, pp. 4261-4271.
- Fink-Gremmels, J. (2004). Moulds and mycotoxins in silage. *Meeting the mycotoxin menace*, pp. 269-270
- Fink-Gremmels, J. (2008a). Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk a review. *Food Additives & Contaminants*, 25, pp. 172-180.
- Fink-Gremmels, J. (2008b). The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176, pp. 84-92.
- Foroud, N.A. & Eudes, F. (2009). Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, pp. 147-173.
- Gallo, A., Giuberti, G., Bertuzzi, T., Moschini, M. & Masoero, F. (2015). Study of the effects of PR toxin, mycophenolic acid and roquefortine C on *in vitro* gas production parameters and their stability in the rumen environment. *Journal of Agricultural Science*, 153, pp. 163-176.
- Haesaert, G., Opsomer, G., Fievez, V., De Saeger, S., De Caestecker, E. & Van Den Broeck, I. (2012). Naar een geïntegreerde oplossing voor het mycotoxine-probleem bij melkvee door een participatieve aanpak. *Agentschap voor Innovatie door Wetenschap en Technologie*, pp. 14.
- Haesaert G. (2014). Fytofarmacie and toxicology. Universiteit Gent, faculteit Bio ingenieurswetenschappen.

- Hussein, H.S & Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, pp. 101-134.
- Jeong, J.S., Lee, J.H., Simizu, Y., Tazaki, H., Itabashi, H. & Kimura, N. (2010). Effects of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 162, pp. 144-148.
- Jouany, J.P. & Diaz, D.E. (2005). Effects of mycotoxins in ruminants. In: Diaz, D.E. (Ed.), *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 295- 321.
- Jouany, J.P., Yiannikouris, A. & Bertin G. (2005). The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva zootechnica*, pp. 26-50.
- Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K. & Olsen, M. (1984). Metabolism of aflatoxine, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, pp. 1070-1073.
- Klötzel, M., Gutsche, B., Lauber, U. & Humpf, H.U. (2005). Determination of 12 type A and B Trichothecenes in cereals by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 8904-8910.
- Korosteleva, S.N., Smith, T.K. & Boermans, H.J. (2007). Effects of feedborne Fusarium mycotoxins on the preformance, metabolism, and immunity of dairy cows. *Journal Dairy Science*, 90, pp. 3867-3873.
- Landschoot, S. , Audenaert, K., Waegeman, W., De Baets, B. & Haesaert, G. (2013). Influence of maize-wheat rotation systems on Fusarium head blight infection and deoxynivalenol content in wheat under low versus high disease pressure. *Crop protection*, 52, pp. 14-21.
- Landschoot, S., Waegeman, W., Audenaert, K., Vandepitte, J., Baetens, J.M., De Baets, B. & Haesaert, G. (2012). An empirical analysis of explanatory variables affecting Fusarium head blight infection and deoxynivalenol content in wheat. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), pp. 135-147.
- Mobashar, M., Blank, R., Hummel, H., Westphal, A., Tholen, E. & Südekum, K.-H. (2012). Ruminant ochratoxin A degradation – Contribution of the different microbial populations and influence of diet. *Animal Feed Science and Technology*, 171, pp. 85-97.
- Mohr, A.I., Lorenz, I., Baum, B., Hewicker-Trautwein, M., Pfaffel, M., 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. *Journal Veterinary Medicine*, 54, pp. 76-81.

- OVOCOM. (2014). AT-09- Beheersing van mycotoxines. Geraadpleegd op 22 mei 2015 via <http://www.ovocom.be/GMP-Regulation.aspx?lang=nl>
- Pronk, M.E.J., Schothorst, R.C. & Van Egmond H.P. (2002). Toxicology and occurrence of nivalenol fusarenon X, diacetoxyscripenol, neosolaniol and 3- and 15 acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. RIVM Report 388802024. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, pp. 29
- Rasmussen, R.R., Rasmussen, P.H., Larsen, T.O., Bladt, T.T. & Binderup, M.L. (2011). In vitro cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 31-44.
- Ribelin, W.E., Fukushima, K. & Still, P.E. (1978). The toxicity of ochratoxin A to ruminants. *Can. J. Comp. Med.*, 42, pp. 172-176.
- Richard, J.L. (2007). Some mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, pp. 3-10.
- Rodrigues, L. (2014). A review on the effects of mycotoxines in dairy ruminants. *Animal Production Science*, 54, pp. 1155-1165.
- Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S. & Bauer, J. (2000). Mycophenolic acid in silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), pp. 3639-3641.
- Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S. & Bauer, J. (2001). Metabolites of *Monascus ruber* in silages. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85, pp. 38-44.
- Seeling, K., Boguhn, J., Strobel, E., Dänicke, S., Valenta, H., Ueberschär, K.H. & Rodehutschord, M. (2006). On the effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and wheat chaff on nutrient utilisation and turnover of deoxynivalenol and zearalenone in vitro (Rusitec). *Toxicology in Vitro*, 20, pp. 703-711.
- Singh, J. (1967) Patulin. *Antibiotics: Mechanisms of action*, pp. 621-630.
- Tangni, E. K., Pussemier, L., Bastiaanse, H., Haesaert, G., Foucart, G. & Van Hove, F. (2013). Presence of mycophenolic acid, roquefortine C, citrinin and ochratoxin A in maize and grass silages supplied to dairy cattle in Belgium. *Journal of Animal Science Advances*, 3(12), pp. 598-612.
- Tapia, M.O., Stern, M.D., Koski, R.L., Bach, A. & Murphy, M.J. (2002). Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters. *Animal Feed Science and Technology*, 97, pp. 239-246.

- Upadhava, S.D., Park, M.A. & Ha, J.K. (2010). Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A Review. *Journal Animal Science*, 23(9), pp. 1250-1260.
- Van Asselt, E.D., Azambuja, W., Moretti, A., Kastelein, P., De rijk, T.C., Stratakou, I. & Van der Felsklerx, H.J. (2012). A dutch field survey on fungal infection and mycotoxin concentration in maize. *Food Additives & contaminants: Part A*: 29(10), pp. 1556-1565.
- Vanheule, A., Audenaert, K., De Boevre, M., Landschoot, S., Bekaert, B., Munaut, F., Eeckhout, M., Höfte, M., De Saeger, S. & Haesaert, G. (2014). The compositional mosaic of *Fusarium* species and their mycotoxins in unprocessed cereals, food and feed products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 181, pp. 28-36.
- Van Pamel, E., Verbeken, A., Vlaemynck, G., De boever, J. & Daeseleire E. (2011). Ultrahigh-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric multimycotoxin method for quantitating 26 mycotoxins in maize silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), pp. 9747-9755.
- Yiannikouris, A. & Jouany, J.P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51, pp. 81-99.
- Zachariasova, M., Dzuman, Z., Veprikova, Z., Hajkova, K., Jiru, M., Vacklavikova, M., Zachariasova, A., Pospichalova, M., Florian, M. & Hajslova, J. (2014). Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and technology*, 193, pp. 124-140.

Bijlagen

Bijlage 1: Het voorkomen van mycotoxinen in maïskuil

Tabel 19: Het voorkomen van mycotoxinen in maïskuil

Myco-toxinen	Opmerking	Aantal stalen	Aantal positieve stalen (%)	Gemiddelde (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Bron
DON		140	72	854	3 142	(Driehuis et al., 2008a)
	In het midden van de kuil	16	100	933		(Driehuis et al., 2008b)
	Aan de oppervlakte	16	94	978		(Driehuis et al., 2008b)
	Beschimmeld e delen	7	100	964		(Driehuis et al., 2008b)
		40	70,8	692,6	4 114,6	(Van Asselt et al., 2012)
		11		867	2 950	(Zachariasov a et al., 2014)
ZEN		140	49	174	943	(Driehuis et al., 2008a)
	In het midden van de kuil	16	50	146		(Driehuis et al.,2008b)
	Aan de oppervlakte	16	44	137		(Driehuis et al.,2008b)
	Beschimmeld e delen	7	29	73		(Driehuis et al.,2008b)
		40	64,2	100,2	1 122,2	(Van Asselt et al., 2012)
		11		29	120	(Zachariasov a et al., 2014)
FB1		140	1,4	26,2	26,2	(Driehuis et al., 2008a)
		11		35	190	(Zachariasov a et al., 2014)
FB2		140	1,4	7 800	78 000	(Driehuis et al., 2008a)
		11		26	36	(Zachariasov a et al., 2014)

Fumonisine		40	17,2	487,8	19 123,4	(Van Asselt <i>et al.</i> , 2012)
OTA	Beschimmeld	42		0,3	3,2	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Niet beschimmeld	42		0,086	0,2	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
15-acetyl-DON		140	5	901	1013	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008a)
AFB1		40	10,4	0,4	13,26	(Van Asselt <i>et al.</i> , 2012)
NIV		11		185	823	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
MPA	In het midden van de kuil	16	0	<25		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Aan de oppervlakte	16	50	660		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Beschimmeld	7	71	9 311		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
		135	28	690	23 000	(Schneeweis <i>et al.</i> , 2000)
	Beschimmeld	42		278,8	1 127	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Niet beschimmeld	42		341,2	1 084	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
ROC	In het midden van de kuil	16	25	96		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Aan de oppervlakte	16	50	1 605		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Beschimmeld	7	100	25 986		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Beschimmeld	42		134,0	1 292	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Niet beschimmeld	42		25	40,4	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
CIT	Beschimmeld	42		2,5	15,2	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Niet beschimmeld	42		2,2	7,7	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)

Bijlage 2: Het voorkomen van mycotoxinen in graskuil

Tabel 20: Het voorkomen van mycotoxinen in graskuilen

Myco-toxinen	Opmerking	Aantal stalen	Aantal positieve stalen (%)	Gemiddelde (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Bron
MPA	In het midden van de kuil	16	0	<25		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Aan de oppervlakte	16	13	40		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
		98	37	2 200	35 000	(Schneweis <i>et al.</i> , 2000)
	Niet beschimmeld	40		1 268	14 026	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Beschimmeld	40		3 587	21 387	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
OTA	Niet beschimmeld	40		41,8	306,4	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Beschimmeld	40		16,6	87,1	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
ZEN		120	6	93	308	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008a)
	In het midden van de kuil	16	6	180		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Aan de oppervlakte	16	13	170		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
ROC		120	0,8	81	81	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008a)
	In het midden van de kuil	16	13	100		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Aan de oppervlakte	16	19	128		(Driehuis <i>et al.</i> , 2008b)
	Niet beschimmeld	40		319	1 114	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
	Beschimmeld	40		852	7 208	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
CIT	Niet beschimmeld	40		50	42	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)

	Beschimmeld	40		283	158	(Tangni <i>et al.</i> , 2013)
--	-------------	----	--	-----	-----	-------------------------------

Bijlage 3: Het voorkomen van mycotoxinen in krachtvoedergrondstoffen

Tabel 21: Het voorkomen van mycotoxinen in krachtvoedergrondstoffen

Myco-toxinen	Grondstof	Aantal stalen	Aantal positieve stalen (%)	Gemiddelde (µg/kg)	Maximum (µg/kg)	Bron
OTA	Tarwe	21		4	56	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
NIV	Maïs	8		153	580	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
FB1	Maïs	8		52	189	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
FB2	Maïs	8		16	64	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
ZEN	Tarwe	21		20	131	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Tarwe	93	5,4	33		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Maïs	8		30	159	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Gerst	16		3	17	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Gerst	65	1,5	18		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Haver	3		7	21	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Havermeel	10	10	16		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Sojaschroot	10		4	17	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)

DAS	Tarwe	93	3,2	87		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Havermeel	10	80	32		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
DON	Tarwe	30	10	621	1165	(Driehuis <i>et al.</i> , 2008a)
	Tarwe	93	87,1	1053		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Tarwe	21		213	1038	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Maïs	8		624	1523	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Gerst	16		264	1582	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Gerst	65	98,5	2029		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Triticale	10	80	1145		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Havermeel	10	60	2385		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Sojaschroot	10		7	25	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
T-2	Tarwe	21		1	10	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Tarwe	93	1,1	123		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
	Haver	3		22	48	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Havermeel	10	90	77		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)
HT-2	Tarwe	93	2,2	70		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)

	Haver	3		40	64	(Zachariasova <i>et al.</i> , 2014)
	Havermeel	10	100	196		(Vanheule <i>et al.</i> , 2014)

Bijlage 4: Het voorkomen van mycotoxinen in bijproducten

Tabel 22: Het voorkomen van mycotoxinen in bijproducten (Zachariasova *et al.*, 2014)

Mycotoxinen	Opmerking	Aantal stalen	Gemiddelde (µg/kg)	Maximum (µg/kg)
FB1	Bietenpulp	6	27	39
	DDGS op basis van maïs	71	675	3719
	DDGS op basis van tarwe	16	40	262
FB2	DDGS op basis van maïs	71	170	542
	DDGS op basis van tarwe	16	8	48
OTA	DDGS op basis van maïs	71	1	20
	DDGS op basis van tarwe	16	3	20
ZEN	Bietenpulp	6	4,1	11
	DDGS op basis van maïs	71	101	258
	DDGS op basis van tarwe	16	12	50
DON	Bietenpulp	6	49	128
	DDGS op basis van maïs	71	1 675	5 981
	DDGS op basis van tarwe	16	262	588
T-2	DDGS op basis van maïs	71	5	36
	DDGS op basis van tarwe	16	3	7
HT-2	DDGS op basis van maïs	71	25	112
	DDGS op basis van tarwe	16	24	54

Bijlage 5: De enquête

Wat zijn u ervaringen met mycotoxinen

1. Heeft u ooit al eens last gehad van mycotoxinen?
 - Nee (Indien geen ervaring, ga naar volgend deel: Inkuilen)
 - Ja
2. In welke jaren heeft u ook vermoedelijk last gehad van mycotoxinen?
.....
3. Wie dacht er aan mycotoxinen:
 - U zelf
 - Dierenarts
 - Andere.....
4. Welke symptomen aan de koeien deed u vermoeden dat u last had van mycotoxinen?
 - Uierontsteking of toename van het celgetal
 - Platte mest
 - Productiedaling
 - Stijging melkureum
 - Minder voederopname
 - Slechte vachtconditie
 - Meer klauwproblemen
 - Problemen rond afkalven (transitieproblemen): lebmaagverplaatsingen, leverproblemen, baarmoederontsteking,...
 - Stijging van vruchtbaarheidsproblemen(cysten, opblijvende nageboorten,..)
 - Slechte reproductie (moeilijkere bronstdetectie en drachtige dieren)
 - Andere.....
 - Niets
5. Heeft ooit eens een kuilanalyse laten doen van een kuil waarvan u vermoedde dat hij besmet was met mycotoxinen?
 - Nee, want ik heb de kuil niet laten controleren.
 - Ja, ik heb een analyse uitgevoerd.
6. Heb je al ooit al iets gedaan tegen mycotoxinen?
 - Nee
 - indien ja:
 - Mycotoxinen binders
 - Besmette kuil mengen met nieuwe kuil
 - Nieuwe kuil openen
 -
 - Andere:.....
7. Heeft u de laatste jaren last gehad van schimmelgroei in u kuilen?
 - Vaak
 - Soms
 - Nee

Inkuilen

8. Werd er een schimmel aantasting waargenomen op de percelen (bv. Fusarium)?

- Ja
- Nee

9. Wanneer is u maïs geoogst dat u nu vervoerd?

- September 2013
- 1 -15 oktober 2013
- 15-31 oktober 2013
- November 2013
- September 2014

10. Type silo:

- Molshoop
- Sleufsilos
- Andere:.....

11. Hoe reinigt u de kuil voor het inkuilen?

- Niet
- Vegen
- Ontsmetten
- Andere:.....

12. Aantal karens per uur + volume van de kar:

.....

13. Met wat worden de silo's aangereden (meer dan één aanduiden is mogelijk)?

- Tractor
- Bulldozer
- Met extra gewicht
- Met extra brede banden
- Met banden die gevuld zijn met water
- Andere:.....

14. Gebruik je kuiladditieven of landbouwzouten?

Maïskuil	Maïskuil + bijproducten	Graskuil
Ja	Ja	Ja
Nee	Nee	Nee

15. Wordt er laagsgewijs ingekuuld (Pulp + maïs of verschillende sneden gras op een verschillend moment in één dezelfde kuil inkuilen)?

Maïskuil	Graskuil
Ja	Ja
Nee	Nee

16. Hoeveel lagen plastic wordt er gebruikt om de kuil af te dichten? En wordt de kuil beschermd met behulp van beschermzeilen?

Maïskuil	Graskuil
1	1
2	2
3	3
4	4
Beschermzeilen	Beschermzeilen

17. Wat zijn de eigenschappen van het plastic dat wordt gebruikt om de kuil af te dichten?

- Enkel nieuw plastic
- Enkel oud plastic
- Nieuw en oud plastic

18. Met wat worden u kuilen afgedekt?

- Halve banden
- Volledige banden
- Linten
- Linten + banden
- Grond
- Zandzakken
- Andere.....

Uitkuilen

19. Merkt u schimmelgroei op in de kuilen, indien ja, in welke?

- Nee
- Ja, in de maïskuil
- Ja, in de graskuil
- Ja, in de drafskuil
- Ja, in de pulpskuil
- Ja, in andere kuilen:.....

20. Wat doet u met beschimmelde zones in de kuil?

- Onmiddellijk afvoeren naar de mesthoop
- Onmiddellijk afvoeren naar perceel
- Opzij in de kuil leggen
- Andere:.....

21. Krijgen u kuilen warm?

- Ja
- Nee
- Enkel bij extreme warmt

22. Wat is de uitkuilsnelheid van u kuil (of geef de afmetingen van u kuil)?

.....

De eigenschappen van u rantsoen

23. Uit wat bestaat u rantsoen?

	Winter	zomer
Mais	25% 35% 50% 65% 75%	25% 35% 50% 65% 75%
Gras	20% 25% 35% 50% 75%	20% 25% 35% 50% 75%

Indien u ook bijproducten geeft, vul dan de aantal Kg per koe in bij het bijproduct:

- Pulp:.....
- Droge pulp:.....
- Draf:.....
- Eiwitkern:
- Krachtvoeder:
- Tarwe:
- Maïsmeel:
- Soja:
- Koolzaadschroot:
- Hooi:
- Stro:
- Koolzaadstro:

Andere:.....

24. Wat is het DS % van u maïskuil?.....

25. Wat is het DS % van u graskuil?.....

Teeltsysteem

26. Doet u aan vruchtwisseling?

Nee, ik teel maïs in monocultuur

Ja, een rotatie met 2 tussenteelten en daarna maïs

Ja, een rotatie van 2 jaar gras en daarna maïs!

Ja , afwisselde gras en maïs

Andere:.....

27. Worden de percelen geploegd?

- Ja

- Nee