

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Titlul tezei de doctorat: ”Aprecierea calității substraturilor vegetale administrate în hrana vacilor de lapte într-o fermă zootehnică din zona de Est a Podișului Moldovei prin investigații micologice și micotoxice”.

Cuvinte cheie: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, micotoxine, sănătate animală.

Teza de doctorat intitulată „*Aprecierea calității substraturilor vegetale administrate în hrana vacilor de lapte într-o fermă zootehnică din zona de Est a Podișului Moldovei prin investigații micologice și micotoxice*” este structurată conform metodologiei academice și cuprinde două părți principale: prima parte este dedicată studiului bibliografic, iar a doua parte redă cercetările proprii și rezultatele obținute în perioada studiilor doctorale. Pe lângă aceste două părți, teza conține cuprinsul, introducerea, rezumatul, lista surselor bibliografice, lista abrevierilor, lista figurilor, lista tabelelor și lista publicațiilor. Lucrarea prezintă conține 43 de figuri și 34 tabele și face referire la 216 surse bibliografice.

PARTEA I - Studiu bibliografic - Această primă parte este organizată în trei capitole și oferă o sinteză riguroasă a principalelor genuri de fungi micotoxigeni implicați în contaminarea substraturilor vegetale, precum și a caracteristicilor generale ale micotoxinelor produse. Sunt analizate genurile *Aspergillus*, *Penicillium* și *Fusarium*, cu accent pe micotoxinele frecvent întâlnite: aflatoxine, ochratoxine, deoxinivalenol, trichotecene și zearalenona, evidențiindu-se mecanismele de acțiune și efectele asupra sănătății animalelor. Ultimul capitol al acestei secțiuni oferă o perspectivă actuală asupra incidenței micotoxinelor la nivel mondial și național, evidențiind implicațiile acestora asupra siguranței alimentare și sănătății animalelor, precum și provocările în ceea ce privește prevenția și controlul acestui risc biologic.

PARTEA A II-A - Cercetări proprii și rezultatele obținute - Această secțiune conține 7 capitole experimentale, precedate de descrierea cadrului instituțional, scopul și obiectivele studiului, materialul biologic și metodologia utilizată. Cercetările au fost desfășurate în cadrul unor instituții și unități specializate, dotate corespunzător pentru activități de nutriție animală și micotoxicologie veterinară, oferind suport tehnic și științific adecvat desfășurării studiului.

Capitolul 4 descrie cadrul instituțional al cercetării, incluzând unități de profil zootehnic, laboratoare publice și private, în care s-au realizat analizele fizico-chimice, micologice, micotoxicologice și biochimice, evidențiind dotarea modernă, expertiza interdisciplinară și rolul lor în asigurarea calității științifice și etice a studiului.

Capitolul 5 prezintă scopul și obiectivele tezei, precum și metodologia aplicată pentru evaluarea calității nutriționale și a riscului micotoxicologic asociat furajelor administrate bovinelor din cadrul SCDCB Dancu-Iasi. Obiectivele au inclus: caracterizarea fizico-chimică a furajelor, evaluarea contaminării fungice, determinarea conținutului de micotoxine prin metoda ELISA, identificarea micotoxinei M_1 în lapte provenit de la animale hrănite cu furaje contaminate și analiza parametrilor biochimici serici. Pe lângă analiza diferențelor între probe, studiul a integrat o componentă corelativă, urmărind relațiile dintre umiditatea furajelor și încărcătura fungică, între nivelul fungilor și conținutul de micotoxine, între concentrația de aflatoxine totale din furaje și prezența aflatoxinei M_1 în lapte, precum și între valorile micotoxinelor și modificările parametrilor biochimici din serul bovin. Analiza statistică a fost realizată utilizând pachetul SPSS, aplicând teste de tip ANOVA, corelație Pearson și test LSD, în vederea evidențierii semnificațiilor statistice ale relațiilor investigate.

Capitolul 6 - "*Evaluarea fizico-chimică a furajelor*" prezintă analiza nutrițională detaliată a furajelor administrate bovinelor din cadrul SCDCB Dancu, cu scopul de a caracteriza compoziția acestora în vederea optimizării rațiilor alimentare. Evaluarea fizico-chimică a principalelor categorii de furaje evidențiază diferențe clare între tipurile de furaj, variațiile inter-anuale fiind secundare. Umiditatea este maximă la silozul de porumb (61,24-61,40%) și la rația mixtă (54,28-54,59%), în timp ce furajele uscate (porumb, grâu, șroturi) se mențin între 9,97 și 13,36%. Conținutul proteic este predominant de șrotul de soia (46,35-46,60%) și șrotul de rapiță (35,28-35,41%), comparativ cu cerealele care prezintă un nivel mai redus (6,67-12,34%). Lipidele sunt mai bine reprezentate în premix (5,53-5,56%) și scad ușor în porumb (2,91-3,05%). Conținutul de fibră este maxim în fânul de lucernă (27,41-27,50%) și siloz (24,37-24,39%), iar cenușa în lucernă (9,74-9,81%). Diferențele sunt determinate preponderent de natura furajului.

Capitolul 7 - "*Evaluarea contaminării fungice a furajelor*" abordează analiza încărcăturii fungice a furajelor utilizate în hrana bovinelor, ca etapă esențială în evaluarea riscului de contaminare micotoxicologică. Determinarea numărului total de fungi s-a realizat prin metoda diluțiilor seriate, utilizând medii selective și temperaturi de incubare de 25°C și 37°C. Datele cumulate pentru perioada 2022–2023 au evidențiat menținerea structurii relațiilor dintre genurile fungice, diferențele inter-anuale fiind predominant cantitative, fără modificări ale tiparului ecologic. Analiza corelativă a demonstrat relații pozitive constante între *Aspergillus spp.* și încărcătura fungică totală ($r = 0.40-0.69$), precum și între *Fusarium spp.* și nr. total fungi (până la $r = 0.76$), ceea ce confirmă contribuția majoră a acestor genuri la biomasa fungică globală, în special în matricile cu umiditate ridicată. Au fost identificate și relații antagoniste, precum *Penicillium spp.* – *Fusarium spp.* (până la $r = -0.38$) și *Aspergillus spp.* - alte specii (până la $r = -0.40$), sugerând o competiție ecologică între fungii higrofilii și cei adaptați depozitării. În ansamblu, rezultatele indică faptul că umiditatea și tipul de matrice furajeră reprezintă

factorii structurali dominanți ai contaminării fungice, conturând tipare ecologice stabile și reproductibile.

Capitolul 8 - "*Screening micotoxicologic al furajelor*" prezintă evaluarea gradului de contaminare cu micotoxine a furajelor utilizate în alimentația bovinelor, cu scopul de a preveni riscurile pentru sănătatea animalelor și de a asigura calitatea produselor de origine animală. Analizele au fost realizate pe parcursul anului 2023, folosind metoda imunoenzimatică ELISA, pentru patru clase majore de micotoxine: aflatoxine totale (AFLA-T), ochratoxină A (OTA), zearalenonă (ZEA) și deoxivalenol (DON).

Contaminarea cu micotoxine a fost omniprezentă în categoriile de furaje analizate, fiecare tip prezentând, în diverse luni, niveluri detectabile din cel puțin una dintre micotoxinele investigate. Cea mai semnificativă abatere a fost înregistrată în cazul rației mixte furajere, unde concentrația de aflatoxine totale a depășit pragul estimativ de 10 ppb - limită relevantă pentru furajele destinate bovinelor de lapte - în mai multe luni, cu un vârf marcat în decembrie ($37,86 \pm 4,89$ ppb), dar și depășiri notabile în februarie, iulie și octombrie. Situații similare au fost observate și în silozul de porumb, unde valorile au depășit limita legală de 20 ppb pentru AFLA-T în septembrie ($20,70 \pm 1,60$ ppb) și decembrie ($21,86 \pm 1,60$ ppb), aspecte ce pot indica fermentație deficitară, ventilație inadecvată sau durate mari de stocare, transformând silozul într-un punct critic al lanțului furajer. De asemenea, au fost înregistrate depășiri ale limitelor pentru aflatoxine în porumb (decembrie – $34,07 \pm 0,57$ ppb), grâu (octombrie – $20,79 \pm 0,63$ ppb) și premixuri (februarie – $10,67 \pm 1,73$ ppb; octombrie – $17,12 \pm 1,51$ ppb), limitele maxime admise fiind de 20 ppb pentru majoritatea furajelor, respectiv 10 ppb în cazul rației și al premixului. Această distribuție sezonieră a valorilor ridicate, în special în lunile reci și de tranziție, sugerează o influență accentuată a condițiilor de depozitare asupra contaminării.

Pentru ochratoxina A, valorile au rămas sub pragul orientativ de 250 ppb, cu excepția lunii octombrie în silozul de porumb, când s-a înregistrat un vârf de $245,22 \pm 21,74$ ppb, situat chiar la limita maximă, indicând o influență importantă a umidității și temperaturii asupra biosintezei acestui compus. Zearalenona a prezentat o tendință sezonieră de creștere în lunile calde (iulie-septembrie), însă valorile s-au menținut sub limitele orientative (2000-3000 ppb), chiar și în furaje cu risc crescut precum porumbul, șroturile sau rația mixtă. În ceea ce privește deoxivalenolul (DON), valorile determinate au fost constant scăzute, cuprinse între 0,27 și 1,19 ppm, în toate probele analizate. Cele mai mari concentrații au fost observate în lunile de vară și toamnă, dar fără a depăși limitele reglementate (8-12 ppm), ceea ce indică o contaminare minimă și o stabilitate bună a furajelor în raport cu această micotoxină.

Dincolo de corelațiile fung - micotoxină, monitorizarea lunară a evidențiat momente clare de vârf și episoade de instabilitate sezonieră. Zearalenona (ZEA) a atins concentrații maxime în silozul de porumb în august (268 $\mu\text{g/kg}$), după valori deja ridicate în aprilie (223 $\mu\text{g/kg}$), iar în rația mixtă a prezentat un maxim în septembrie (174 $\mu\text{g/kg}$), confirmând sensibilitatea acestei micotoxine la perioadele calde și umede. Ochratoxina A (OTA) a evidențiat două episoade distincte de reacumulare în siloz: un prim vârf în mai

(185 ppb) și un maxim pronunțat în octombrie (245 ppb), sugerând instabilitate microclimatică și redistribuire a umidității în timpul depozitării. Aflatoxinele totale (AFLA-T) au prezentat creșteri spre finalul anului, cu valori maxime în decembrie în rația mixtă (38 ppb), compatibile cu o contaminare secundară progresivă. În contrast, DON s-a menținut relativ stabil ($<1,5$ mg/kg).

Capitolul 9 - "*Screening micotoxicologic al laptelui*" abordează evaluarea contaminării secundare a laptelui cu aflatoxina M_1 (AFM₁), metabolit hepatic al aflatoxinei B_1 (AFB₁), cu potențial carcinogen, rezultat din consumul de furaje contaminate. Având în vedere afinitatea crescută a AFM₁ pentru cazeină și rezistența sa la tratamente termice, monitorizarea periodică a acestui compus în laptele crud este esențială pentru siguranța alimentară. În acest scop, pe parcursul anului 2023 au fost analizate 180 de probe, provenite de la 15 bovine selectate, folosind tehnica ELISA pentru determinarea concentrației de AFM₁. Rezultatele obținute au indicat prezența aflatoxinei M_1 în toate probele analizate, cu valori cuprinse între 0,0020 și 0,0290 ppb, toate sub limita maxim admisă de 0,05 ppb conform legislației europene. Media anuală a fost de $0,0042 \pm 0,0025$ ppb, ceea ce indică un risc micotoxicologic scăzut pentru consumatori.

Cele mai mari valori medii lunare de AFM₁ au fost înregistrate în lunile februarie ($0,0073 \pm 0,0047$ ppb) și martie ($0,0093 \pm 0,0104$ ppb), în timp ce cele mai reduse valori au fost observate în aprilie, iulie și august. Analiza corelatională Pearson dintre AFM₁ din laptele crud și aflatoxinele totale (AFLA-T) din principalele componente ale alimentației furajere a evidențiat o relație liniară slabă, cu coeficienți r sub 0.2 (de la -0.17 la +0.084; $p > 0.05$), pentru toate matricile analizate. Aflatoxina B_1 , componenta principală a aflatoxinelor totale (AFLA-T), este metabolizată hepatic, rezultând AFM₁, care este ulterior excretată în lapte. Rata de transfer raportată (0.3–6%) este suficientă pentru ca creșterile sezoniere ale contaminării în matrici precum porumbul, silozul de porumb și rația mixtă să se reflecte în nivelurile de AFM₁ din lapte. Analiza corelațională Pearson a evidențiat asocieri pozitive puternice pentru siloz de porumb ($r = 0.79$; $p < 0.01$) și rație mixtă furajeră ($r = 0.67$; $p < 0.01$), în timp ce furajele cu nivel scăzut de contaminare au prezentat corelații neglijabile. Aceste constatări confirmă rolul central al matrițelor furajere cu umiditate ridicată în prezicerea transferului de aflatoxină în lapte.

Capitolul 10 - "*Influența calității furajelor asupra sănătății animalelor*" abordează efectele posibile ale contaminării furajelor cu micotoxine asupra stării metabolice a bovinelor, prin analiza biochimică a sângelui. Studiul a inclus 15 vaci din rasa Bălțată cu Negru Românească, monitorizate pe parcursul anului 2023, cărora li s-a administrat o rație furajeră compusă din materii prime analizate anterior din punct de vedere nutrițional și micotoxicologic. Lunar au fost prelevate probe de ser sanguin, pentru determinarea a 12 parametri biochimici relevanți (inclusiv ALP, ALT, AST, GGT, albumină, bilirubină totală, proteine totale, trigliceride, uree, creatinină, calciu și colesterol), cu scopul de a evalua starea fiziologică generală și de a identifica eventuale modificări asociate cu contaminarea furajeră.

Rezultatele obținute în cadrul studiului au indicat că majoritatea valorilor biochimice serice s-au încadrat în intervalele fiziologice de referință, ceea ce sugerează un status metabolic general bun al bovinelor analizate. Cu toate acestea, au fost identificate corelații statistice semnificative între anumite micotoxine din furaje și anumiți parametri metabolici, sugerând efecte discrete, dar cuantificabile, asupra sănătății animalelor. Astfel, fosfataza alcalină (ALP), cu o valoare medie de $102,14 \pm 42,37$ U/L, a prezentat corelații pozitive cu aflatoxinele totale și deoxivalenolul (DON), în special din porumb, siloz și șroturi, ceea ce poate indica un stress hepatic cronic de intensitate redusă.

De asemenea, bilirubina totală (BIL-T), cu o medie anuală de $0,22 \pm 0,33$ mg/dL, a fost corelată pozitiv cu AFLA-T și OTA, susținând ipoteza unei afectări hepatobiliare ușoare. Valorile trigliceridelor serice (TRIG), care au variat între $2,80 \pm 2,88$ mg/dL (mai) și $18,60 \pm 5,19$ mg/dL (octombrie), au arătat corelații pozitive cu mai multe micotoxine, în special cu zearalenona (ZEA), sugerând o posibilă adaptare a metabolismului lipidic în condiții de expunere cronică. În contrast, ureea serică (URE), cu o medie anuală de $20,28 \pm 10,23$ mg/dL, a prezentat corelații negative cu AFLA-T și DON, sugerând un impact potențial asupra metabolismului azotat. În același timp, calciul seric, deși s-a menținut în limite fiziologice (media anuală $8,54 \pm 1,02$ mg/dL), a arătat corelații pozitive cu ZEA și negative cu DON și OTA, ceea ce poate reflecta o influență asupra homeostaziei minerale și echilibrului endocrin. În ceea ce privește creatinina, singura corelație semnificativă a fost pozitivă, în asociere cu DON din porumb, fără alte relații notabile. Unii parametri nu au evidențiat corelații semnificative ($p > 0.01$) cu micotoxinele, precum albumina (media: $32,41 \pm 4,86$ g/L), colesterolul ($195,59 \pm 49,89$ mg/dL), GGT ($30,98 \pm 15,64$ U/L) sau enzimele hepatice ALT și AST, ceea ce sugerează o stabilitate relativă a acestor markeri în contextul expunerii moderate.

Rezultatele indică faptul că niciun animal nu a prezentat un profil compatibil cu hepatopatie clinică, majoritatea parametrilor hepatici (ALT, AST, GGT, ALP, bilirubină totală, albumină, proteine totale) încadrându-se în limitele de referință. Abaterile au fost ușoare și izolate, motiv pentru care nu a fost definit un grup patologic. Pentru identificarea variațiilor subclinice, s-a construit un scor hepatic compozit, clasificând animalele în „Normal” (0 abateri) și „La limită” (1-2 abateri). Corelațiile univariate cu aflatoxinele au fost slabe ($r = -0.15$ până la $+0.26$). Totuși, analiza globală (PERMANOVA) a arătat că expunerea internă la AFM₁, nu AFLA-T, se asociază semnificativ cu variația combinată a parametrilor hepatici. MANOVA pe componentele principale (PC1, PC3) a confirmat această asociere multivariantă. LDA a generat un singur discriminant (LD1), care a permis o separare parțială între grupuri, susținând caracterul subclinic și adaptativ al modificărilor.

Ultima parte a tezei sintetizează rezultatele cercetării, oferind o perspectivă integratoare asupra tematicii abordate. Sunt incluse recomandări privind monitorizarea calității furajelor, controlul riscului micotoxicologic și susținerea unei stări optime de sănătate a animalelor. Finalul tezei cuprinde bibliografia de specialitate și prezentarea activității științifice relevante.