

SPRAWOZDANIE

*z przeprowadzonych w 2018 r. badań podstawowych
na rzecz rolnictwa ekologicznego, pt.:*

„Badania nad źródłem zanieczyszczenia pasz przez GMO z uwzględnieniem problematyki dróg zanieczyszczeń możliwych i niemożliwych do uniknięcia”

Realizowanych przez:

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

w związku z decyzją Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.re.027.11.2018 z dnia 18.04.2018 r., wydaną na podstawie § 8 ust. 1 pkt 1, ust. 2 i ust. 10 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2015r., poz.1170 i z 2016 r. poz. 1614).

Kierownik tematu: *dr hab. Kazimierz Obremski*

Główni wykonawcy:

- *dr hab. Kazimierz Obremski*

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

- *dr hab. Józef Tyburski, prof. UWM*

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

- *dr Paweł Wojtacha*

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

OLSZTYN, 2018 r.

Wprowadzenie

Postępujące na świecie uprzemysłowienie skutkuje wyjałowieniem gleby, skażeniem wód oraz występowaniem w produktach rolnych niepożądanych syntetycznych związków chemicznych (ksenobiotyków). Intensywna produkcja rolna, która jest powodem ujemnych skutków dla całego środowiska, doprowadziła do powstania i rozwoju rolnictwa ekologicznego.

Znaczącym obszarem, który stwarza możliwości poszerzenia oferty produktów ekologicznych jest akwakultura. Dąży się do tego, by żywienie zwierząt akwakultury zapewniało zaspokojenie ich potrzeb gatunkowych, jak również należy spełnić wymóg w zakresie zdrowia, czyli była zbilansowana pasza pod względem ich zapotrzebowania. Ponadto pasza pochodząca od jednego gatunku nie może stanowić pokarmu dla tego samego gatunku. Wymogi prawne stanowią by dla gatunków wymienionych w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 710/2009 podstawą żywienia było środowisko naturalne, a więc to, co jest dostępne w stawach i jeziorach. Niemniej jednak, jeśli naturalne źródła paszy, nie są dostępne w wystarczających ilościach, można stosować ekologiczne pasze pochodzenia roślinnego, najlepiej wyprodukowane na bazie surowców pochodzących z danego gospodarstwa.

Ogólne zasady dotyczące przetwarzania/produkcji pasz ekologicznych określono w art. 7 Rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007. Wytwarzanie takich pasz powinno się odbywać z ekologicznych materiałów paszowych, chyba, że dany materiał paszowy nie jest dostępny na rynku w postaci ekologicznej. Należy ograniczyć do minimum stosowanie dodatków paszowych oraz substancji pomocniczych w przetwórstwie. Nie można stosować do produkcji substancji i metod przetwarzania mogących wprowadzać w błąd w kwestii prawdziwej natury danego produktu. Produkcja paszy powinna być dokonywana najlepiej przy zastosowaniu właściwych metod biologicznych, mechanicznych i fizycznych. Nie można stosować do skarmiania zwierząt organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO), jak i materiałów / substancji wyprodukowanych przez te organizmy.

Bezpieczeństwo produkcji pasz wolnych od modyfikacji genetycznej to bardzo wymagający proces. Wszystkie surowce użyte w procesie technologicznym, muszą być zweryfikowane pod kątem zanieczyszczeń modyfikacjami genetycznymi. Do możliwych dróg rozprzestrzeniania się transgenicznych roślin można zaliczyć rozpylanie przez wiatr, bakterie w glebie, insekty, ptaki czy też inne zwierzęta. Jednak te drogi są realne w przypadku współistnienia rolnictwa wolnego od GMO, z tym stosującym GMO. W przypadku, gdy nie uprawia się roślin GMO, wówczas silosy, transport, czy przemysł paszowy stanowią jedne z wielu miejsc, gdzie pasze wolne od GMO mogą zostać skażone.

Cały proces zakupu surowców i wytwarzania pasz powinien być objęty monitoringiem kontrolnym, a badania obecności modyfikacji wykonywane w akredytowanych laboratoriach. Zasady bezpieczeństwa obejmują również transport pasz z wytwórni do gospodarstwa, jak również badania materiałów paszowych do produkcji (możliwość narażenia) oraz kontrole dotyczące produktu finalnego w postaci gotowych pasz treściwych. Zapewnienie bezpieczeństwa produkcji pasz bez GMO, tzn. wolnych od modyfikacji genetycznej, wymaga szeregu przedsięwzięć. To nie tylko zakup surowców bez modyfikacji, ale również ich

weryfikacja pod kątem zanieczyszczeń modyfikacjami genetycznymi. Gotowe pasze treściwe również są poddawane kontrolnym badaniom.

Żywienie zwierząt akwakultury powinno zapewnić zaspokojenie ich potrzeb gatunkowych, w tym zachowanie dobrej zdrowotności. W ekologicznym chowie karpia warunkiem uzyskania wysokiej wydajności i zdrowotności zwierząt, jest m.in. zapewnienie dobrej jakości pasz. Wymogi prawne stanowią by dla ryb podstawą żywienia było środowisko naturalne, a więc to, co jest dostępne w stawach. Niemniej jednak, jeśli naturalne źródła paszy nie są dostępne w wystarczających ilościach, można stosować ekologiczne pasze pochodzenia roślinnego, najlepiej z danego gospodarstwa. Do karmienia karpi stosuje się głównie pasze pochodzenia roślinnego, rzadziej pasze zwierzęce. Najczęściej stosowanymi paszami w żywieniu karpia są: łubiny, kukurydza, jęczmień, żyto, pszenica oraz otręby, soja i groch. Obecnie wśród wymienionych roślin paszowych kukurydza i soja mogą być modyfikowane genetycznie, a ekologiczny chów ryb wyklucza stosowanie materiałów GMO. Hodowcy powinni w związku z tym świadomie wybierać pasze wolne od GMO. Pojawia się jednak problem dotyczący dopuszczalnej zawartości GMO w paszach bez GMO. Wartość ta wynosi 0,9%, a próg został określony na podstawie Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1829/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności. Jeśli badamy tylko surowce, np. udział soi modyfikowanej w soi, kukurydzy modyfikowanej w kukurydzy, rzepaku modyfikowanego w rzepaku – to 0,9% jest udziałem tych zmodyfikowanych genów do całości genomu soi, kukurydzy czy rzepaku. To odpowiada także zawartości procentowej, w rozumieniu procentu masowego. Czyli na 1000 kg soi może być 9 kg jakiegoś modyfikowanego produktu. Jeżeli nie jest ta norma przekroczona, producent nie jest zobligowany do deklarowania zawartości produktu GMO na etykiecie. W przypadku, kiedy mamy do czynienia z mieszanką to już powstaje pewna komplikacja. Metody badawcze nie pozwalają na stwierdzenie ilościowej zawartości tego przekroczenia. W mieszance paszowej chodzi o to, aby 0,9% (ułamek masowy) nie zostało przekroczone. Metoda badania wykrywa ten zmodyfikowany komponent w odniesieniu do komponentu mieszanki, a nie do całości produktu. Metoda jest czuła i pozwala wykryć, że w 0,9% jest 50% modyfikowanego produktu.

Przed kilkoma laty pasze pełnoporcjowe i koncentraty białkowe w jakości ekologicznej produkowane były w Polsce, ale od momentu wystąpienia problemu z oceną stopnia ich zanieczyszczenia GMO, firmy paszowe zaprzestały produkcji ekologicznych pasz. Od tamtej pory polscy producenci pasz importują certyfikowane pasze/koncentraty z Belgii, Holandii, Niemiec, co jednak nie oznacza dla nich końca kłopotów. Okazało się, że próbki pasz wykonanych w gospodarstwie, na bazie własnego ziarna zbóż z dodatkiem wspomnianych koncentratów, w myśl wyników analiz wykonanych w laboratoriach urzędowych, również wykazują obecność GMO, a co więcej wyniki analiz z poszczególnych laboratoriów różnią się nawet 10-krotnie. W związku z powyższym niezbędnym jest wskazanie potencjalnych źródeł skażenia/zanieczyszczenia ekologicznych pasz przez GMO oraz sposobów przeciwdziałania.

Jeszcze do niedawna głównym surowcem paszowym GMO była śruta sojowa wytworzona z transgenicznej soi. Od kilkunastu lat na rynku europejskim znajduje się nie tylko transgeniczna soja GMO (głównie w postaci śruty), ale również kukurydza, czy rzepak modyfikowane genetycznie. Zanieczyszczenie GMO stwierdzają m.in. zakłady tłuszczowe

przerabiające rzepak. Unia Europejska (UE) ma jedne z najbardziej restrykcyjnych na całym świecie przepisy w odniesieniu do korzystania z organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO). Wynikają one z zachowania zasady przezroczności w większości krajów europejskich, w odniesieniu do spraw bezpieczeństwa żywności i pasz.

Metody stosowane w detekcji GMO

Aktualnie stosowane są różne metody detekcji GMO w żywności i paszach. W przypadku białek zasadniczą techniką stosowaną do ich identyfikacji jest test immunoenzymatyczny ELISA (ang. enzyme linked immunosorbent assay). Zmiany na poziomie sekwencji DNA monitorowane są poprzez reakcję łańcuchową polimerazy PCR (ang. polymerase chain reaction), powszechnie stosowaną technikę biologii molekularnej, pozwalającą na detekcję określonych fragmentów DNA wprowadzonych do genomu badanej rośliny. Spotykane są również połączenia obu metod, tzw. PCR-ELISA i należy je traktować bardziej jako komplementarne, niż wykluczające się analizy (Liu i wsp. 2004). Zestawy analityczne testów immunoenzymatycznych bazują na wykorzystaniu przeciwciał selektywnych wobec określonego – w tym przypadku genetycznie zmodyfikowanego (GM) białka – i następującej po rozpoznaniu antygeny reakcji barwnej. Tego rodzaju oznaczenia są powszechnie stosowane i akceptowane w wielu rodzajach analiz dotyczących kontroli obecności witamin, antybiotyków, patogenów, czy też substancji specyficznych w produktach żywnościowych (Ibanez i Cifuentes 2001, Bonwick i Smith 2004). Ostatecznym potwierdzeniem obecności GMO jest reakcja barwna, której intensywność – w przypadku dysponowania standardami o znanej zawartości GMO – jest podstawą do ilościowego oznaczenia białka. Przykładowy limit detekcji białka sojowego CP4 EPSPS w przypadku nasion soi wynosi 0,25% (Kuiper 1999).

Konwencjonalny PCR jest techniką stosowaną do analizy jakościowej oraz półilościowej, wskazując głównie na obecność bądź nieobecność poszukiwanych sekwencji w próbce. Finalny etap identyfikacji produktów stanowi rozdział elektroforetyczny na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Równocześnie z produktami PCR rozdzielane są markery mas molekularnych w celu precyzyjnego określenia wielkości amplikonu (MacCormick i wsp. 1998). Zidentyfikowanie takiej sekwencji w finalnym produkcie PCR świadczy o zanieczyszczeniu GMO, ale nie jest to dowód ostateczny, bowiem nie daje odpowiedzi na temat charakteru wprowadzonej zmiany.

PCR w czasie rzeczywistym to alternatywna wersja PCR (ang. Real-Time PCR), która pozwala na ilościową analizę dzięki aparaturze monitorującej przyrost powielanej sekwencji w trakcie kolejnych cykli reakcji. Detekcja produktów amplifikacji może być realizowana przez zastosowanie barwników fluorescencyjnych interkalujących się w sekwencji DNA np. Sybr Green™ (Hernandez i wsp. 2003), sond hybrydacyjnych komplementarnych do powielanej matrycy DNA wywodzących się z technologii rezonansowego przeniesienia energii FRET (ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Garcia-Canas i wsp. 2004) i sond podlegających hydrolitycznej degradacji, np. TaqMan™, lub specyficznie oddziaływujących z amplikonem, np. startery Skorpion, czy systemu Molecular Beacons™ (Deisingh i Badrie 2005). RT-PCR przy wykorzystaniu certyfikowanych standardów GMO

zyskał powszechną akceptację w skali światowej i jest w chwili obecnej uznawany za najdokładniejszą metodę analizy GM żywności i pasz.

Jednak jak pokazuje praktyka kontrolna w zakresie obecności występowania białek roślin GMO, wyniki analiz próbek pasz z różnych laboratoriów często się różnią, często wykazując bardzo duże rozbieżności. Fakt ten ma ogromne znaczenie praktyczne – na podstawie wyników tych analiz jednostki certyfikujące muszą zdecydować, czy dana partia paszy (a w konsekwencji produktów zwierzęcych) spełnia wymogi rolnictwa ekologicznego, czy też nie. W tym drugim przypadku należy wycofać daną partię produktów z rynku i wdrożyć postępowanie naprawcze, w tym ograniczyć certyfikat danemu producentowi rolnemu. Tak, więc obok samego faktu zanieczyszczenia pasz GMO, występuje problem wiarygodności (powtarzalności) wyników oznaczania GMO. Jest to tym ważniejsze, że w Rozporządzeniu Komisji WE nr 1829 z 22 września 2003 r., dopuszczono maksymalne zanieczyszczenie ekologicznych pasz surowcami GMO na poziomie do 0,9%. Przy rozbieżnych wynikach analiz z różnych laboratoriów, trudno będzie podjąć trafną decyzję o wycofaniu lub nie danej partii pasz z uwagi na jej zanieczyszczenia GMO.

Technologia produkcji pasz dla ryb jest wymagająca nie tylko z punktu widzenia osiągnięcia optymalnego składu kompletnej racji, ale również pod względem delikatnego opracowania paszy w ten sposób, by osiągnięta została optymalna rozpuszczalność w środowisku wodnym. Pasze, które stosuje się w żywieniu zwierząt mogą występować w postaci mieszanek sypkich lub w postaci granulowanej, a ich dobór zależy od gatunku, wieku oraz produktywności zwierząt. Pasza granulowana może być stosowana dla różnych grup zwierząt, w różnym wieku i w różnym stanie fizjologicznym, w miejsce paszy sypkiej. Wykorzystanie przez ryby paszy w postaci granul, w porównaniu do pasz sypkich, związane jest z wieloma zaletami: większymi wartościami odżywczymi, lepszymi walorami smakowymi. Ponadto pasza granulowana zawiera mniejszą liczbę bakterii i grzybów, jest chętniej zjadana przez zwierzęta oraz posiada dłuższy okres przechowywania.

Paszę granulowaną można produkować z mieszanki paszowej o różnym stopniu rozdrobnienia. Z tego względu w różnych ośrodkach naukowych przeprowadza się analizę wpływu stopnia rozdrobnienia mieszanki paszowej, z której produkuje się paszę granulowaną na: wytrzymałość kinetyczną, dzienne przyrosty u zwierząt, zapotrzebowanie na paszę, zużycie energii w trakcie rozdrabniania składników mieszanek paszowych i wiele innych.

W przypadku wykorzystywania tych samych linii technologicznej do produkcji pasz konwencjonalnych, a następnie w standardzie ekologicznym, może dojść do sytuacji, że śladowe ilości danej paszy z zawartością GMO mogą pozostać w linii technologicznej i dostać się do paszy w standardzie ekologicznym. Jest to definiowane, jako przenikanie się partii produkcyjnych zwane „efektem przenoszenia” lub „zanieczyszczeniem krzyżowym”.

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań była ocena skuteczności różnych metod czyszczenia linii technologicznej do produkcji ekologicznej paszy dla karpia, w kontekście obecności białka modyfikowanej genetycznie soi i kukurydzy, w produkcie finalnym.

Metodyka badań

Masa produkowanych mieszanek pasz konwencjonalnych dla karpia na tucz z udziałem kukurydzy i soi GMO oraz paszy w jakości EKO wynosiła po 1500 kg, natomiast próbki pierwotnej po ok. 2,0 kg. Próbki paszy sypkiej pobierano przed granulatorem, a paszy granulowanej z workownicy. Masa materiału czyszczącego wynosiła po 200 kg. Układ doświadczenia przedstawiono poniżej.

Etap I. Analiza procesu technologicznego pod względem możliwości wystąpienia efektu przeniesienia białka modyfikowanej soi i kukurydzy, pomiędzy produkowanymi mieszankami paszowymi (Rys. 1).

Etap II. Produkcja paszy konwencjonalnej dla karpia na tucz z udziałem kukurydzy i soi GMO, 1500 kg (Tab.1).

Etap III. Czyszczenie linii do produkcji paszy sypkiej.

Etap IV. Czyszczenie linii paszy granulowanej.

Etap V. Produkcja paszy dla karpia w jakości EKO (NON-GMO), 1500 kg (Tab. 2).

Etap VI. Analizy laboratoryjne.

W przebiegu doświadczeniu wykonano dwa niezależne eksperymenty z udziałem różnych metod czyszczenia linii do produkcji pasz:

Eksperyment 1

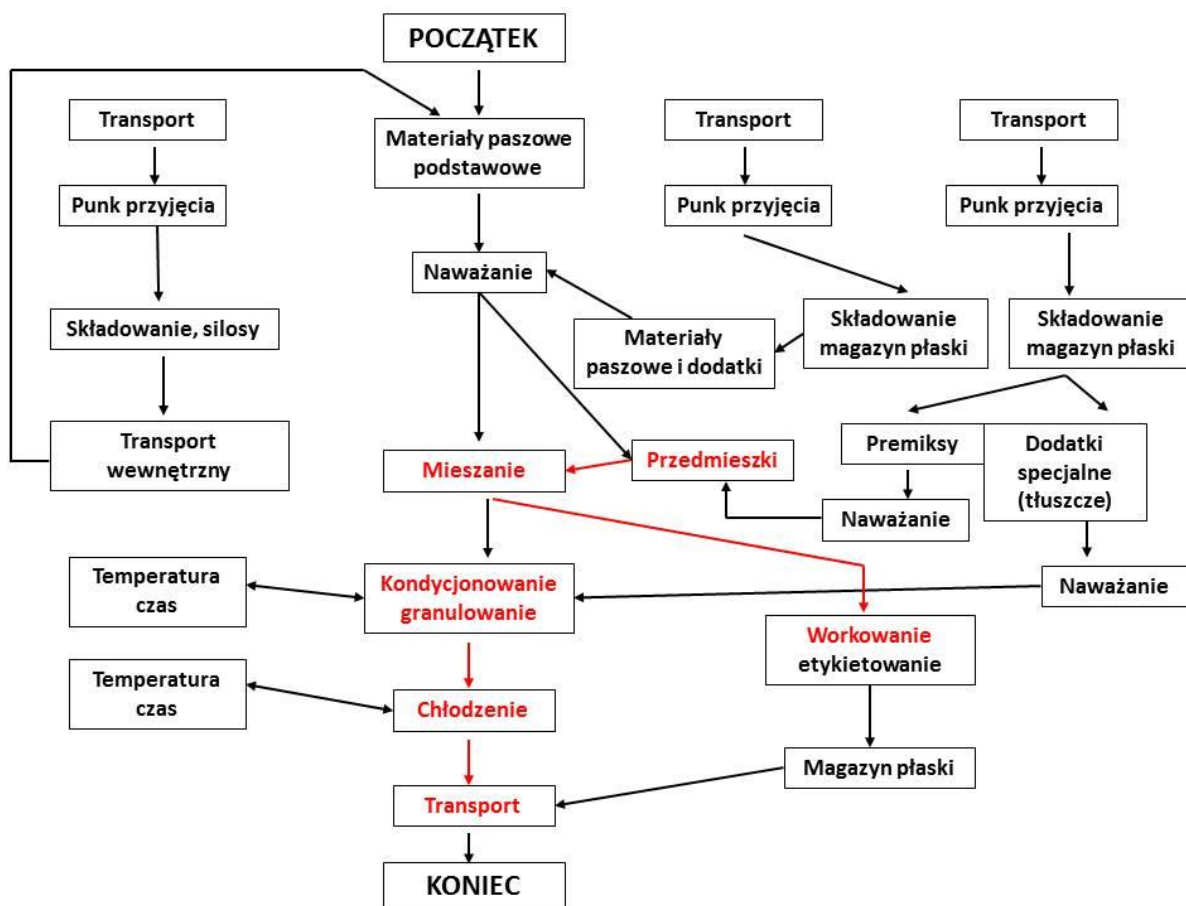
Do czyszczenia linii produkcyjnej do produkcji paszy sypkiej (włącznie z workownicą) użyto śruty pszennej grubo mielonej w ilości 200 kg/czyszczenie (Czyściwo I).

Do czyszczenia linii produkcji paszy granulowanej użyto mieszaniny śruty pszennej drobno mielonej i ekstrudowanych nasion soi NON-GMO w ilości 200 kg/czyszczenie (Czyściwo II).

Eksperyment 2

Do czyszczenia linii produkcyjnej do produkcji paszy sypkiej włącznie z workownicą użyto mieszaniny śruty pszennej grubo mielonej (50%) i grysłu wapiennego (50%) frakcji 2 - 4 mm w ilości 200 kg/czyszczenie (Czyściwo III).

Mieszanina śruty pszennej drobno mielonej i ekstrudowanych nasion soi NON – GMO - w ilości 200 kg/ czyszczenie – czyszczenie linii produkcyjnej paszy granulowanej (Czyściwo IV).



Kolorem czerwonym zaznaczono możliwe drogi zanieczyszczeń krzyżowych

Rys. 1. Schemat procesu technologicznego produkcji mieszanki paszowej – przykład

Tab. 1. Receptura wykorzystana w badaniach do produkcji paszy konwencjonalnej dla karpia (1500 kg)

Rodzaj surowca	Udział procentowy surowców [%]	Udział wagowy surowców [kg]
Premiks 5% Karp	5,00	25,00
Śruta sojowa 46%	26,00	260,00
Śruta rzepakowa 34%	12,00	120,00
Susz z lucerny 17%	6,00	60,00
Pszenżyto	20,50	205,00
Pszenica	15,00	150,00
Olej sojowy	2,00	20,00
Kukurydza	10,00	100,00
Lepiszczce ligninowe	1,00	10,00
Monobent	2,50	25,00

Tab. 2. Receptura wykorzystana w badaniach do produkcji paszy w standardzie EKO dla karpia (1500 kg)

Rodzaj surowca	Udział procentowy surowców [%]	Udział wagowy surowców [kg]
Premiks 5% Karp	5,00	25,00
Susz z lucerny 17%	5,00	25,00
Pszenica	39,50	197,50
Kukurydza	10,00	100,00
Lepiszczce ligninowe	1,00	10,00
Monobent	2,50	25,00
Soja nasiona tostowane	22,00	110,00
Łubin wąskolistny	15,00	75,00

W celu oznaczenia zawartości materiału GMO w paszach wykorzystano testy ELISA firmy Romer Labs:

- I. Agra Quant Cry 1 Ab Plate - nr kat. 7110000, służy do oznaczania białka Cry 1Ab, produktu genu pochodzącego z *Bacillus thuringensis*, mającego działanie owadobójcze. Gen ten został zastosowany do modyfikacji odmian kukurydzy – Monsanto - MON 810 oraz Syngenta Bt 11.
- II. Agra Quant RUR Soya Grain Plate – nr kat. 7100000, służy do oznaczenia białka CP4 EPSPS* pochodzenia bakteryjnego (*Agrobacterium tumefaciens*), którego gen został zastosowany do modyfikacji soi w celu uzyskania jej odporności na glifosat, tym samym na Roundup**. Test jest przeznaczony do oznaczania odmian soi modyfikowanych przez gen CP4 EPSPS, a tym samym do oznaczania udziału soi GMO w produktach żywnościowych i paszach. Najlepiej nadaje się do oznaczania niemodyfikowanego termicznie białka CP4 EPSPS, produktów sojowych nie traktowanych wysoką temperaturą np. ekstruzja. Podczas oznaczania udziału GMO zastosowano standard: Soya full-fat fluor(FFF) Standards (nr kat. 7100001).
- III. AgraQuant Toasted Meal Plate – nr kat. 7099999, jest testem ELISA opracowanym do detekcji białka CP4 EPSPS, produktu genu modyfikującego soję odporną na Roundup, pochodzącego z *Agrobacterium tumefaciens*. Jest przeznaczony do oznaczania białka i materiału GMO (zawierającego odpowiedni gen), w produktach traktowanych temperaturą w procesach technologicznych, także w izolatach białkowych. Jako standard zastosowano Soya Defatted Flour (DF) Standards (nr kat. 7100002).

* EPSPS - 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, syntaza 5-enolopirogroniano-szikimo-3-fosforanu

Wykorzystane do oznaczeń zestawy ELISA służą do oznaczania poziomu materiału GMO, którego zawartość przedstawiono w %. W testach standardami do krzywej kalibracyjnej była mąka sojowa lub kukurydziana o określonej zawartości materiału GMO:

- Agra Quant CRY1 Ab (Maize) – 0% non GMO corn flour, 0,15% MON810 corn flour, 0,5% MON810 corn flour, 2,0% MON810 corn flour
- AgraQuant Toasted Meal Plate - GMOCheck Soya Standards 0%, 0,3%, 1,25% i 2,5% (soya defated flour)

Przygotowanie materiału do badań

Próby surowców, pasz sypkich, pasz granulowanych oraz czysciw pobierano w ilości 1 – 2 kg z linii produkcyjnej do pasz (w przypadku surowców – przed linią produkcyjną) do sterylnych worków polietylenowych. Następnie mielono w młynku (FoSS, Cemotec 1090) przez 5 minut. Czynność tą powtórzono 2 krotnie. Zmieloną próbę przesiewano przez sito o ziarnistości 40 mesh oraz 100 mash i przenoszono do polipropylenowych naczyń zbiorczych.

Oznaczanie zawartości soi GMO (CP EPSPS) niezmodyfikowanej wykonano AgraQuant
RUR Soya Grain Plate

W celu ekstrakcji materiału paszowego i pozostałych prób naważano po 0,5g do sterylnych probówek typu falcon o objętości 15 ml (Eppendorf, Niemcy). Następnie dodawano 4,5 ml buforu do ekstrakcji (Extraction Buffer, ELISA). Próbę poddano mieszanii za pomocą wortexu (IKA, Niemcy) przez 10 sekund. Próby następnie wirowano przy prędkości 5000 rpm przez 15 min. (Eppendorf, Centrifuge 5804R). W analogiczny sposób traktowano również standardy do krzywej kalibracyjnej. Jako standard stosowano Soya full-fat standards nr kat. 7100001. Po wirowaniu prób i standardów uzyskany supernatant został użyty do oznaczenia zawartości materiału GMO. Bezpośrednio na płytkę titracyjną nakładano próby i standardy rozcieńczone 1:300 w buforze do ekstrakcji.

Oznaczanie zawartości soi GMO (CP EPSPS) zmodyfikowanej termicznie AgraQuant
Toasted Meal Plate

W celu ekstrakcji materiału paszowego i pozostałych prób naważano po 1g do sterylnych probówek typu falcon o objętości 15 ml (Eppendorf, Niemcy). Następnie dodawano po 10 ml buforu do ekstrakcji (Extraction Buffer, ELISA). Mieszano za pomocą wortexu przez 1 minutę. Próbę pozostawiono do rozdzielenia się nadsącza i osadu przez 5 minut. Jeśli w próbce nie wydzieliał się nadsącz, próbę wirowano przez 5 minut przy prędkości 5000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5804R). Uzyskany nadsącz został użyty do oznaczeń. W

analogiczny sposób potraktowano standardy do krzywej kalibracyjnej, którymi były wystandaryzowane próby soi traktowanej termicznie Soya Defted Flour Standards. Bezpośrednio po ekstrakcji próby i standardy poddawano pomiarowi testem ELISA.

Oznaczanie zawartości kukurydzy GMO (Cry1 Ab) w próbach AgraQuant Cry1Ab Plate

W celu ekstrakcji materiału paszowego i pozostałych prób naważano po 1g do sterylnych probówek typu falcon o objętości 15 ml (Eppendorf, Niemcy). Następnie dodawano po 4 ml buforu do ekstrakcji (Extraction Buffer, ELISA). Mieszano za pomocą worteksu przez 1 minutę. Próby pozostawiono na 5 minut a następnie wirowano przez 5 minut przy prędkości 5000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5804R). Uzyskany nadsącz został użyty do oznaczeń. W ten sam sposób potraktowano standardy do krzywej kalibracyjnej, którymi były wystandaryzowane próby kukurydzy GMO. Bezpośrednio po ekstrakcji próby i standardy poddawano pomiarowi testem ELISA.

Analiza statystyczna

Uzyskane w pomiarach wyniki zawartości materiału GMO zostały poddane analizie statystycznej, polegającej na wyliczeniu statystyk tabelarycznych: średniej, odchylenia standardowego oraz błędu standardowego. Następnie wykonano porównanie wartości średnich za pomocą testu Anova z post-testem wielokrotnych porównań Tukey'a przy $P=0,05$. Wyniki analiz zaznaczono na wykresach słupkowych i zaznaczono istotności statystyczne.

Wyniki i omówienie

W przypadku łączenia w tym samym przedsiębiorstwie paszowym wytwarzania pasz konwencjonalnych i w standardzie ekologicznym może dojść do sytuacji, że śladowe ilości danej paszy z zawartością GMO mogą pozostać w linii technologicznej i dostać się do produkcji paszy w standardzie ekologicznym. Takie przenikanie się partii produkcyjnych zwane jest „efektem przenoszenia” lub „zanieczyszczeniem krzyżowym”. Jednym z głównych powodów zanieczyszczeń krzyżowych są właściwości fizyczne materiałów paszowych, premiksów i innych substancji, które przyczyniają się do niekontrolowanego ich pozostawiania w linii technologicznej. Do najistotniejszych możemy zaliczyć właściwości adhezyjne (adhezja do ścian), wielkość cząstek i gęstość (zarówno nośnika, jak i substancji czynnej) i właściwości elektrostatyczne.

Zróźnicowanie składu granulometrycznego surowców, gęstości, itp. powoduje powstawanie procesów segregacyjnych na każdym etapie produkcji. Niektóre z rodzajów segregacji stwarzają duże zagrożenie dla bezpieczeństwa produkcji mieszanek paszowych. Ich negatywne oddziaływanie można zmniejszyć m.in. przez odpowiednio prowadzony proces rozdrabniania surowców mający na celu redukcję frakcji pylistej mieszanki. Zwiększenie jednorodności wymiarowej cząstek mieszanek skutkuje zmniejszeniem segregacji cząstek mieszaniny w czasie przemieszczania jej w drogach technologicznych, sprzyja dokładniejszemu dozowaniu, umożliwia właściwe wymieszanie, zapobiega

zawieszaniu się materiału w komorach silosów lub dozownikowych i tym samym redukuje efekt przeniesienia pomiędzy mieszankami.

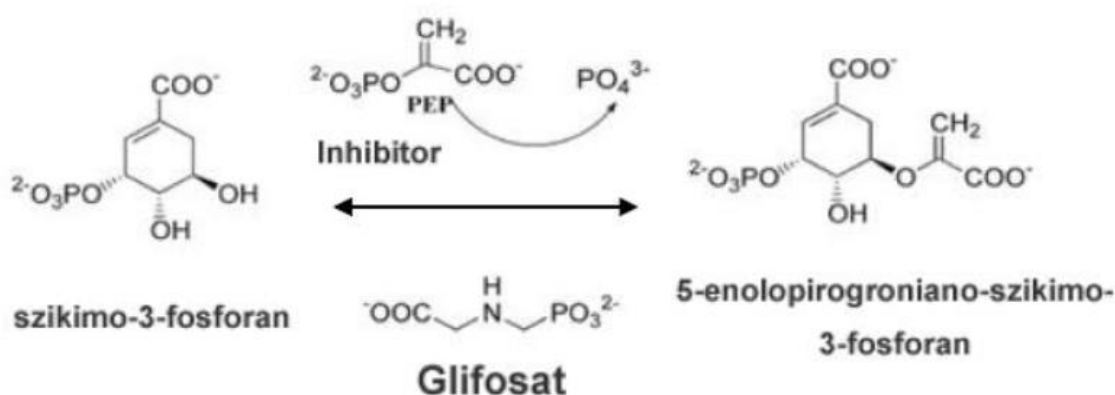
Zanieczyszczenia krzyżowe mogą być w dużym stopniu zminimalizowane przez specyficzne następstwo produkcji i czyszczenie dróg technologicznych za pomocą przemieszczania przez nie „mieszanki czyszczącej” (otrąb pszennych, śrut zbożowych, itp.) lub nawet ręczne usuwanie pozostałości mieszanek z niektórych dostępnych fragmentów linii.

W założeniach projektu było:

- a/ sprawdzenie przydatności metody ELISA do oznaczania GMO w paszach
- b/ sprawdzenie efektywności czyszczenia linii produkcyjnej pasz z pozostałości GMO.

Podczas eksperymentu produkowano paszę konwencjonalną dla karpia w okresie tuczu, zawierającą materiały z GMO (soja i kukurydza). Zastosowana do produkcji paszy konwencjonalnej (z GMO) soja zawierała gen oporności na glifosat (kodujący białko CP4 EPSPS), dając tym samym możliwość stosowania tego herbicydu w uprawie soi. Gen oporności koduje enzym syntazę 5-enolopirogronianio-szikimowo-3-fosforanową, niezbędną do syntezy aminokwasów aromatycznych i jest on pochodzenia bakteryjnego (Rys. 2).

Kukurydza zawierała gen oporności na szkodniki Cry 1 ab, również pochodzenia bakteryjnego, uzyskanego z bakterii *Bacillus thuringensis*, kodujące białko o tej samej nazwie, mające właściwości owadobójcze.



Rys. 2. Reakcja kodowana przez enzym syntazę 5-enolopirogronianio-szikimowo-3-fosforanową.

Oba białka, będące produktem genów bakteryjnych wprowadzonych do soi i kukurydzy, są możliwe do oznaczenia za pomocą metody immunometrycznej ELISA z dużą precyzją, zarówno ilościowo jak i jakościowo. Jednocześnie poziom stężenia tych białek jest proporcjonalny do zawartości materiału GMO, oznaczanego w paszach.

Procesy czyszczenia i dezynfekcji są operacjami o kluczowym znaczeniu dla jakości i bezpieczeństwa produkowanych pasz. Dobrze zaprojektowane czyszczenie i dezynfekcja linii produkcyjnej zmniejszają ryzyko wystąpienia skażenia paszy w przypadku produkcji równoległej i zmieszania produktów ekologicznych z konwencjonalnymi. Punktem wyjścia wszelkich działań jest przygotowanie projektu procedury czyszczenia. Z tego powodu w

pierwszym etapie doświadczenia przeanalizowano proces technologiczny pod względem możliwości wystąpienia efektu przeniesienia białka modyfikowanej soi i kukurydzy pomiędzy produkowanymi mieszankami paszowymi.

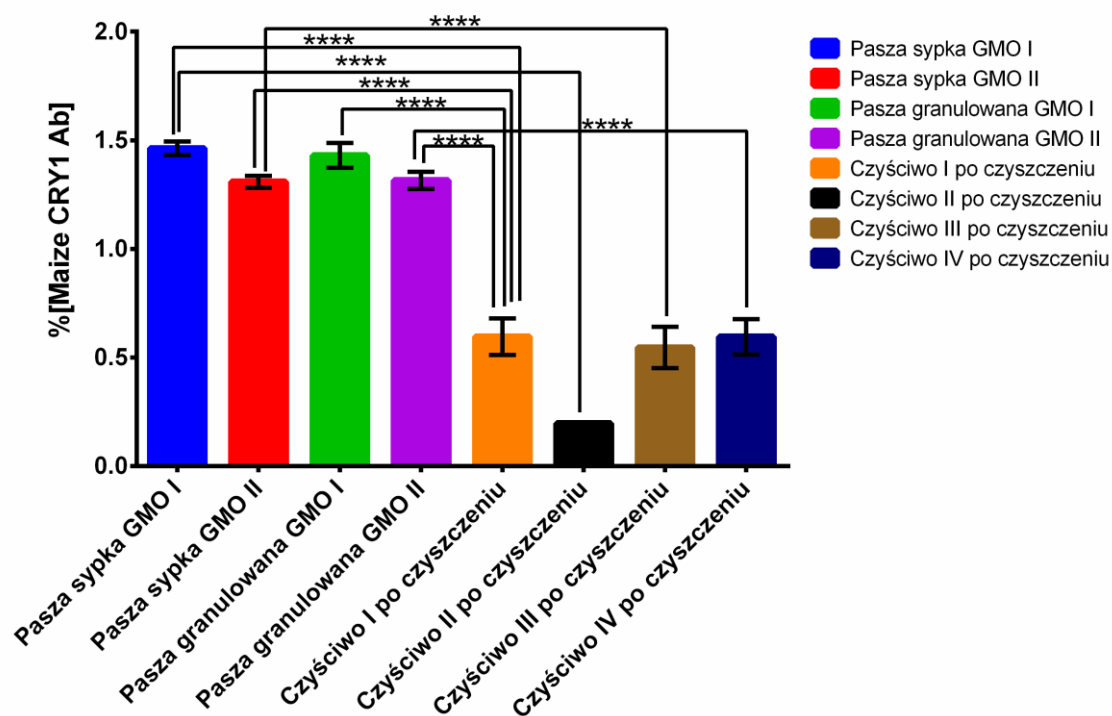
Przeprowadzone badania umożliwiły ocenę efektu przeniesienia materiału GMO soi i kukurydzy pomiędzy produkowanymi mieszankami konwencjonalnymi, a mieszankami w standardzie EKO, na przykładzie krajowego zakładu wytwarzającego pasze konwencjonalne. Uzyskane wyniki zamieszczono na rycinach (Rys. 3 – 8) i w tabelach (Tab.3 – 8).

W eksperymencie 1 do czyszczenia linii produkcyjnej do produkcji paszy sypkiej (włącznie z workownicą), użyto śruty pszennej grubo mielonej w ilości 200 kg/czyszczenie (czyściwo I), natomiast do czyszczenia linii produkcji paszy granulowanej użyto mieszaniny śruty pszennej drobno mielonej i ekstrudowanych nasion soi NON-GMO w ilości 200 kg/czyszczenie (czyściwo II). Z kolei w eksperymencie 2 do czyszczenia linii produkcyjnej paszy sypkiej (włącznie z workownicą), użyto mieszaniny śruty pszennej grubo mielonej (50%) i grysu wapiennego (50%) frakcji 2 - 4 mm w ilości 200 kg/czyszczenie (czyściwo III), do czyszczenia linii produkcyjnej paszy granulowanej użyto mieszaniny śruty pszennej drobno mielonej i ekstrudowanych nasion soi NON-GMO w ilości 200 kg/czyszczenie (czyściwo IV).

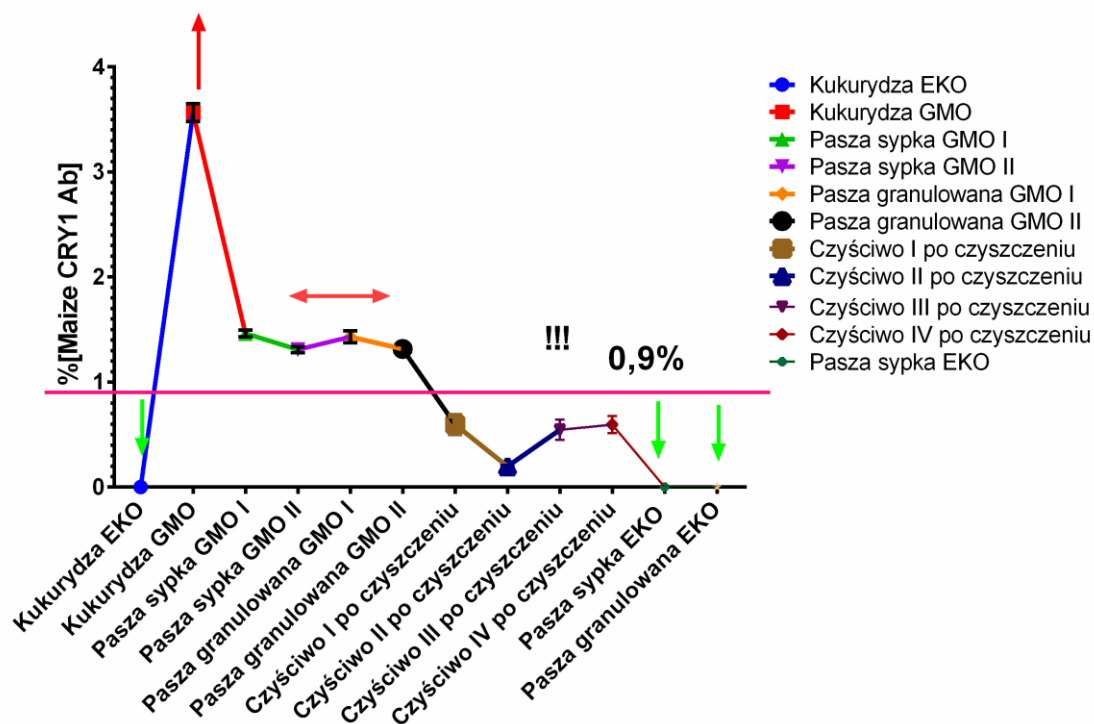
Wykonane oznaczenia wykazały, że procentowy udział białka Cry 1Ab, produktu genu pochodzącego z *Bacillus thuringensis* w kukurydzy GMO wynosił 3,56 %, a w kukurydzy NON-GMO 0 %. Zawartość materiału GMO soi CP4 EPSPS produktu genu pochodzenia bakteryjnego z *Agrobacterium tumefaciens* wyniosło 2,12 % i 0,52 % w soi oznaczanym odpowiednio testami AgraQuant Toasted Meal Plate i Agra Quant RUR Soya Grain Plate. W paszy sypkiej pobranej przed granulatorem wykryto 1,46 % i 1,31 % białka Cry 1Ab oraz 0,57 % i 0,64 % białka CP4 EPSPS w teście Agra Quant RUR Soya Grain Plate oraz 0,15 % i 0,16 % białka CP4 EPSPS w teście AgraQuant Toasted Meal Plate. W paszy granulowanej w eksperymencie 1 i 2 białka CP4 EPSPS kukurydzy stwierdzono na poziomie odpowiednio 1,43 % i 1,32 %. Analiza stężenia Agra Quant RUR Soya Grain Plate i AgraQuant Toasted Meal Plate w wyprodukowanej paszy granulowanej wykazała odpowiednio obecność białka CP4 EPSPS w stężeniu odpowiednio 0,15 % i 0,37 % w eksperymencie 1 oraz 0,41 % i 0,97 % w eksperymencie 2.

Analiza pobranych z etapu 1 czyszczenia linii technologicznej do produkcji pasz wykazała w eksperymencie 1 obecność białka kukurydzy Cry 1Ab w czyściwie I i II w stężeniu odpowiednio 0,60 % i 0,20 %, a w eksperymencie 2 w czyściwie III i IV odpowiednio 0,55 % i 0,60 % w eksperymencie 2. Jednocześnie badanie w zakresie metody nie wykazało obecności białka kukurydzy Cry 1Ab w wyprodukowanej w ostatnim etapie paszy granulowanej EKO.

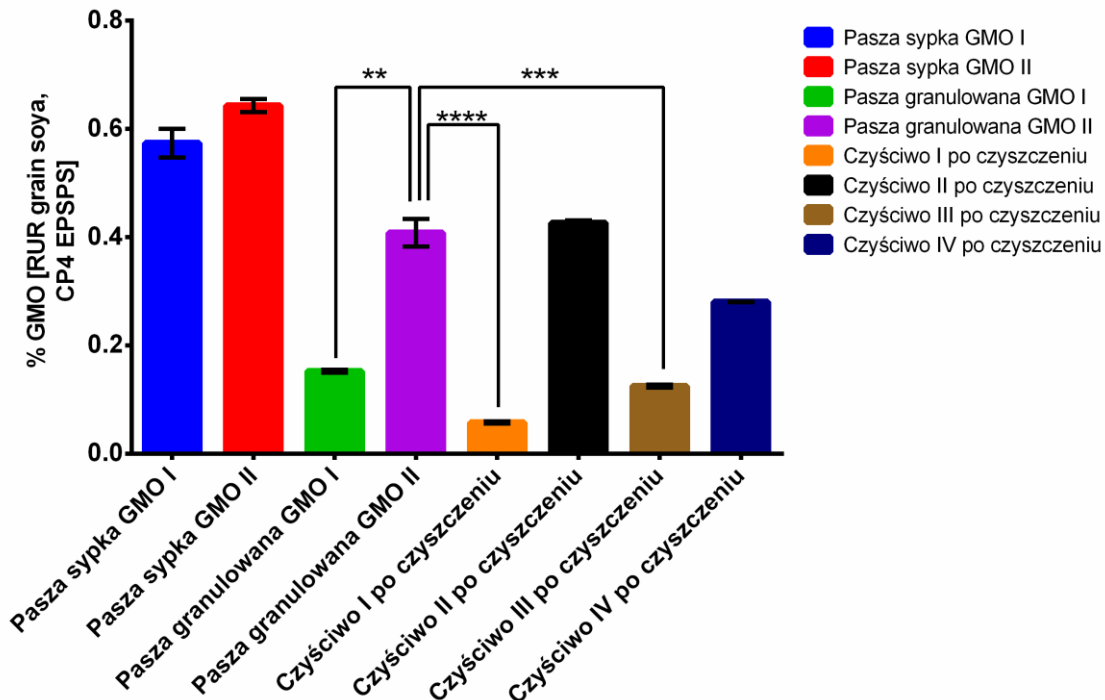
Oznaczenia procentowej obecności białka CP4 EPSPS soi w pobranych z linii produkcyjnej czyściw wykazała jego obecność na poziomie 0,06 % i 0,43 % w eksperymencie 1 i 0,13 % i 0,28 % w eksperymencie 2 (test Agra Quant RUR Soya Grain Plate). Dla oznaczeń wykonanych testem Agra Quant Toasted Meal Plate procentowa zawartość białka CP4 EPSPS soi czyściwie I 0,00 % i czyściwie II 0,15 % (eksperyment 1) oraz 0,00 % w czyściwie III i 0,20 % w czyściwie IV (eksperyment 2). Jednocześnie badanie w zakresie metody nie wykazało obecności białka soi CP4 EPSPS w wyprodukowanej w ostatnim etapie paszy granulowanej EKO.



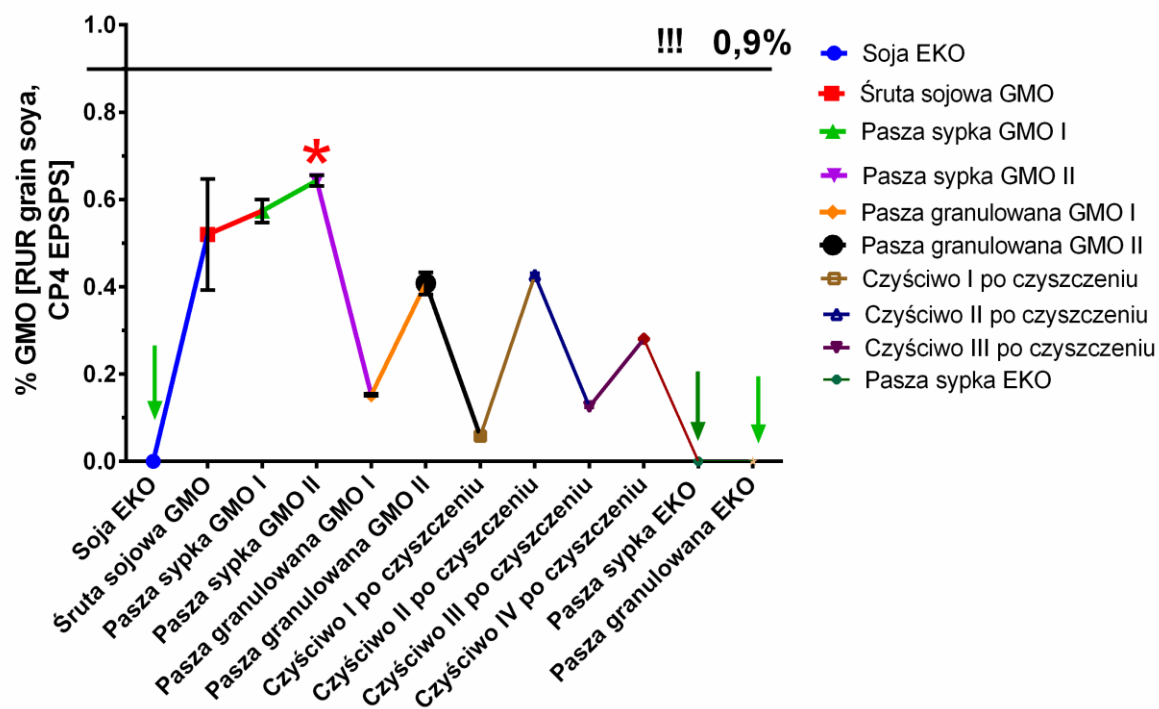
Rys. 3 Pozostałość materiału kukurydzy GMO w próbkach mieszanek czyszczących w porównaniu do zawartości materiału kukurydzy GMO w paszy konwencjonalnej dla karpia (**** $p < 0,0001$).



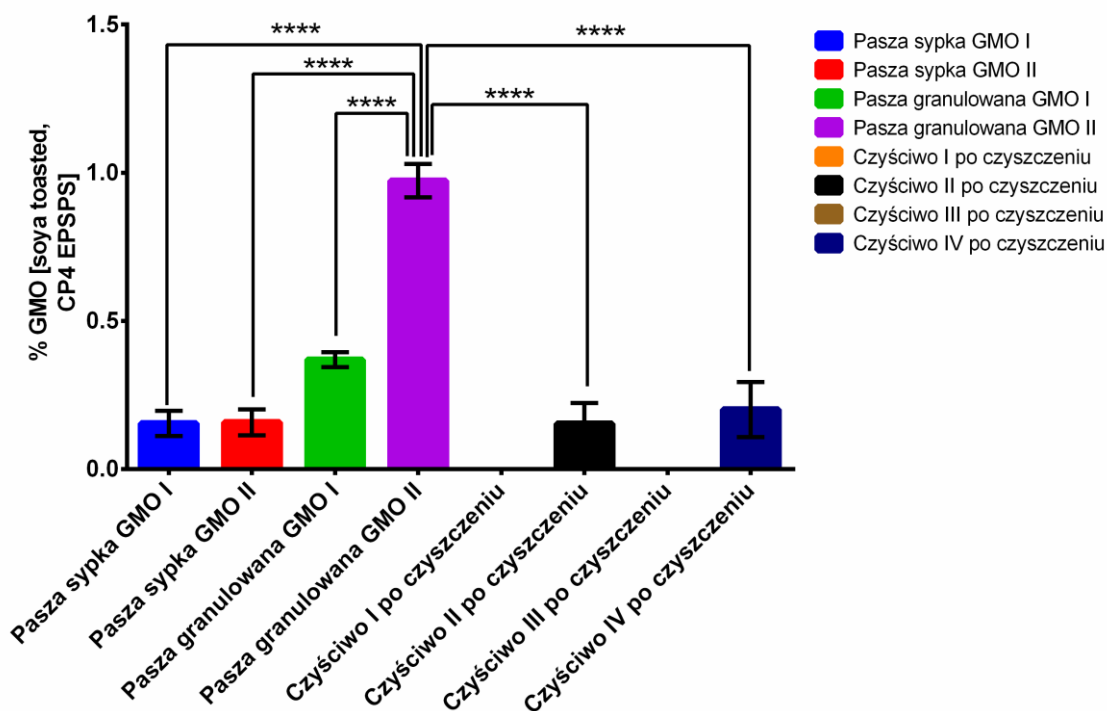
Rys. 4. Procentowa zawartość materiału kukurydzy GMO w materiałach paszowych, paszach dla karpia i materiałach czyszczących linię technologiczną.



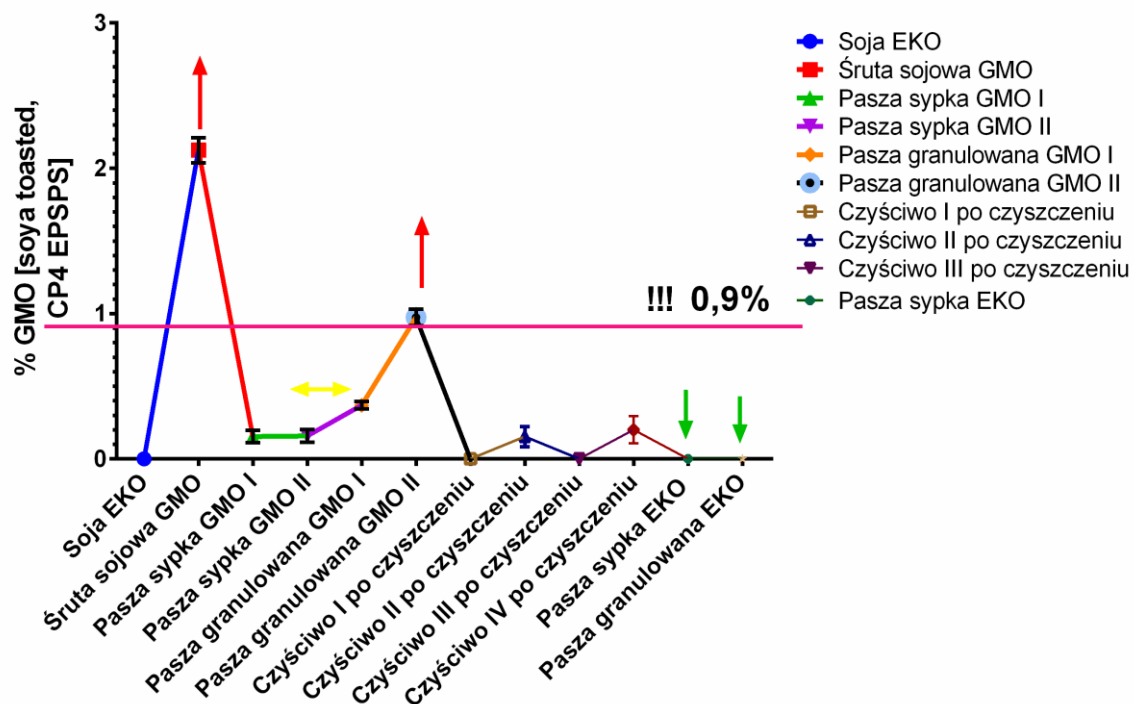
Rys. 5 Pozostałość materiału soi natywnej GMO w próbkach mieszanek czyszczących w porównaniu do zawartości materiału soi natywnej GMO w paszy konwencjonalnej dla karpia (**p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).



Rys. 6. Procentowa zawartość materiału soi natywnej GMO w materiałach paszowych, paszach dla karpia i materiałach czyszczących linię technologiczną.



Rys. 7. Pozostałość materiału soi GMO po obróbce termicznej w próbkach mieszanek czyszczących w porównaniu do zawartości materiału soi GMO po obróbce termicznej w paszy konwencjonalnej ($p < 0,0001$).



Rys. 8. Procentowa zawartość materiału soi GMO po obróbce termicznej w materiałach paszowych, paszach dla karpia i materiałach czyszczących linię technologiczną.

Tab. 3. Zawartość materiału kukurydzy GMO (Cry 1Ab) w materiałach paszowych, wyprodukowanych paszach i materiałach czyszczących.

Kukurydza, Cry 1 AB [%]	Kukurydza EKO [%]	Kukurydza GMO [%]	Pasza sypka GMO I [%]	Pasza sypka GMO II [%]	Pasza granulowana GMO I [%]	Pasza granulowana GMO II [%]	Czyściwo I po czyszczeniu [%]	Czyściwo II po czyszczeniu [%]	Czyściwo III po czyszczeniu [%]	Czyściwo IV po czyszczeniu [%]	Pasza sypka EKO [%]	Pasza granulowana EKO [%]
Średnia	0,00	3,56	1,46	1,31	1,43	1,32	0,60	0,20	0,55	0,60	0,00	0,00
SD	0,00	0,17	0,06	0,06	0,16	0,11	0,17	0,00	0,16	0,16	0,00	0,00
SEM	0,00	0,08	0,03	0,03	0,06	0,04	0,08	0,00	0,10	0,08	0,00	0,00

Tab. 4. Zawartość materiału soi GMO natywnej (CP4 EPSPS) w materiałach paszowych, wyprodukowanych paszach i materiałach czyszczących.

RUR Grain Soya [%]	Soja EKO [%]	Śruta sojowa GMO [%]	Pasza sypka GMO I [%]	Pasza sypka GMO II [%]	Pasza granulowana GMO I [%]	Pasza granulowana GMO II [%]	Czyściwo I po czyszczeniu [%]	Czyściwo II po czyszczeniu [%]	Czyściwo III po czyszczeniu [%]	Czyściwo IV po czyszczeniu [%]	Pasza sypka EKO [%]	Pasza granulowana EKO [%]
Średnia	0,00	0,52	0,57	0,64	0,15	0,41	0,06	0,43	0,13	0,28	0,00	0,00
SD	0,00	0,26	0,05	0,02	0,01	0,05	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
SEM	0,00	0,13	0,03	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 5. Zawartość materiału soi GMO po obróbce termicznej (CP4 EPSPS) w materiałach paszowych, wyprodukowanych paszach i materiałach czyszczących.

Toasted Soya [%]	Soja EKO [%]	Śruta sojowa GMO [%]	Pasza sypka GMO I [%]	Pasza sypka GMO II [%]	Pasza granulowana GMO I [%]	Pasza granulowana GMO II [%]	Czyściwo I po czyszczeniu [%]	Czyściwo II po czyszczeniu [%]	Czyściwo III po czyszczeniu [%]	Czyściwo IV po czyszczeniu [%]	Pasza sypka EKO [%]	Pasza granulowana EKO [%]
Średnia	0,00	2,12	0,15	0,16	0,37	0,97	0,00	0,15	0,00	0,20	0,00	0,00
SD	0,00	0,30	0,15	0,15	0,12	0,28	0,00	0,17	0,00	0,19	0,00	0,00
SEM	0,00	0,09	0,04	0,04	0,03	0,06	0,00	0,07	0,00	0,09	0,00	0,00

Tab. 6. Porównanie wartości średnich zawartości materiału kukurydzy GMO w materiałach paszowych, paszach dla karpia i materiałach czyszczących linię technologiczną za pomocą testu Anova post-testem wielokrotnych porównań Tukey'a przy $p=0,05$

Post-test wielokrotnych porównań Tukey'a	Wartość p	
Kukurydza EKO vs. Kukurydza GMO	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Pasza sypka GMO I	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Pasza sypka GMO II	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Pasza granulowana GMO I	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	0,4421
Kukurydza EKO vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza EKO vs. Pasza sypka EKO	ns	> 0,9999
Kukurydza EKO vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999
Kukurydza GMO vs. Pasza sypka GMO I	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Pasza sypka GMO II	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Pasza granulowana GMO I	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Kukurydza GMO vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza sypka GMO II	ns	0,7735
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana GMO I	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana GMO II	ns	0,6551
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana GMO I	ns	0,8616
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana GMO II	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza granulowana GMO II	ns	0,7199

Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo II po czyszczeniu	**	0,001
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Czyściwo III po czyszczeniu	*	0,0154
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	**	0,001
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	0,4421
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,4421
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Czyściwo IV po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Czyściwo IV po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka EKO vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999

Tab. 7. Porównanie wartości średnich zawartości materiału soi natywnej GMO w materiałach paszowych, paszach dla karpia i materiałach czyszczących linię technologiczną za pomocą testu Anova post-testem wielokrotnych porównań Tukey'a przy $p=0,05$

Post-test wielokrotnych porównań Tukey'a	Wartość p	
Soja EKO vs. Śruta sojowa GMO	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Pasza sypka GMO I	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Pasza sypka GMO II	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Pasza granulowana GMO I	ns	0,2221
Soja EKO vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Czyściwo I po czyszczeniu	ns	0,9948
Soja EKO vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	0,4974
Soja EKO vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	***	0,0005
Soja EKO vs. Pasza sypka EKO	ns	> 0,9999

Soja EKO vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999
Śruta sojowa GMO vs. Pasza sypka GMO I	ns	0,9971
Śruta sojowa GMO vs. Pasza sypka GMO II	ns	0,5215
Śruta sojowa GMO vs. Pasza granulowana GMO I	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza granulowana GMO II	ns	0,6539
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	0,8487
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	**	0,0046
Śruta sojowa GMO vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza sypka GMO II	ns	0,9779
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana GMO I	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana GMO II	ns	0,1368
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	0,2643
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	***	0,0003
Pasza sypka GMO I vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana GMO I	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana GMO II	**	0,0058
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo II po czyszczeniu	*	0,0145
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza granulowana GMO II	**	0,002
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo I po czyszczeniu	ns	0,8355
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo II po czyszczeniu	***	0,0007
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,4621
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza sypka EKO	ns	0,2221
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,2221
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo III po czyszczeniu	***	0,0004
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,4679
Pasza granulowana GMO II vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	0,9816
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	*	0,0105
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	0,9948

Czyściwo I po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,9948
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Czyściwo III po czyszczeniu	***	0,0002
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,2756
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,2001
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	0,4974
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,4974
Czyściwo IV po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	***	0,0005
Czyściwo IV po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	***	0,0005
Pasza sypka EKO vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999

Tab. 8. Porównanie wartości średnich zawartości materiału soi GMO po obróbce termicznej w materiałach paszowych, paszach dla karpia i materiałach czyszczących linię technologiczną za pomocą testu Anova post-testem wielokrotnych porównań Tukey'a przy $p=0,05$

Post-test wielokrotnych porównań Tukey'a	Wartość p	
Soja EKO vs. Śruta sojowa GMO	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Pasza sypka GMO I	ns	0,8869
Soja EKO vs. Pasza sypka GMO II	ns	0,8721
Soja EKO vs. Pasza granulowana GMO I	**	0,002
Soja EKO vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Soja EKO vs. Czyściwo I po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Soja EKO vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	0,957
Soja EKO vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Soja EKO vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,8812
Soja EKO vs. Pasza sypka EKO	ns	> 0,9999
Soja EKO vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999
Śruta sojowa GMO vs. Pasza sypka GMO I	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza sypka GMO II	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza granulowana GMO I	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Śruta sojowa GMO vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO I vs. Pasza sypka GMO II	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana GMO I	ns	0,0659
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001

Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo I po czyszczeniu	ns	0,8869
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	0,9555
Pasza sypka GMO I vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO I vs. Pasza sypka EKO	ns	0,8869
Pasza sypka GMO I vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,8869
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana GMO I	ns	0,0753
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo I po czyszczeniu	ns	0,8721
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	0,9486
Pasza sypka GMO II vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Pasza sypka GMO II vs. Pasza sypka EKO	ns	0,8721
Pasza sypka GMO II vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,8721
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza granulowana GMO II	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo I po czyszczeniu	**	0,002
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	0,3398
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo III po czyszczeniu	*	0,0199
Pasza granulowana GMO I vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,8816
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza sypka EKO	**	0,002
Pasza granulowana GMO I vs. Pasza granulowana EKO	**	0,002
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo I po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo II po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo III po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Pasza sypka EKO	****	< 0,0001
Pasza granulowana GMO II vs. Pasza granulowana EKO	****	< 0,0001
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo II po czyszczeniu	ns	0,957
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,8812
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	> 0,9999
Czyściwo I po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Czyściwo III po czyszczeniu	ns	0,9811
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	> 0,9999
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	0,957
Czyściwo II po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,957
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Czyściwo IV po czyszczeniu	ns	0,9328
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	> 0,9999
Czyściwo III po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999
Czyściwo IV po czyszczeniu vs. Pasza sypka EKO	ns	0,8812
Czyściwo IV po czyszczeniu vs. Pasza granulowana EKO	ns	0,8812
Pasza sypka EKO vs. Pasza granulowana EKO	ns	> 0,9999

Wnioski

W świetle uzyskanych wyników należy stwierdzić, że zastosowane testy ELISA są prawidłowym narzędziem do wykrywania i ilościowego oznaczania materiału kukurydzy i soi GMO (zawierającego odpowiednio białka Cry1 ab i CP4 EPSPS) w badanych materiałach paszowych, paszach i materiałach czyszczących.

Nieskomplikowana procedura wykonania testu ELISA oraz precyzja metody immunoenzymatycznej, pozwalają na wykorzystanie ich do wykrywania materiału GMO nawet w wysoko przetworzonych produktach.

W paszach stwierdzono, większą zawartość białka soi GMO poddanego obróbce, niż białka nie poddanego tej obróbce (natywnego). Oznacza to, że w przypadku oznaczeń zawartości materiału GMO zawierającego białko sojowe, należy zastosować test ELISA przeznaczony do pomiaru materiału z białkiem modyfikowanym termicznie (test AgraQuant Soya Toasted ELISA).

W świetle uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że zaproponowana metoda czyszczenia linii technologicznej używanej do produkcji pasz konwencjonalnych, może być skuteczna w usuwaniu pozostałości materiału kukurydzy i soi GMO, a tym samym może być proponowana, jako prawidłowy sposób zapobiegania zanieczyszczeniu pasz ekologicznych produkowanych na konwencjonalnych liniach technologicznych.

Wszystkie rodzaje testowanych czyściw, zastosowane na liniach technologicznych do produkcji pasz, na których prowadzono badania, w 100% spełniły swoją rolę. Chociaż nie da się wykluczyć, że na liniach technologicznych innej konstrukcji, czy w podczas różnych warunków klimatycznych, efekt nie będzie aż tak dobry, to zdaniem zespołu badawczego najważniejszym czynnikiem warunkującym wysoką skuteczność czyściw jest staranność wykonania procedur czyszczenia linii technologicznej.

Literatura

Bonwick G.A., Smith C.J.: Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2004, 39, 817-827.

Deisingh A.K., Badrie N.: Detection approaches for genetically modified organisms in foods. *Food Res. Intern.*, 2005, 38, 639-649.

Garcia-Canas V., Cifuentes A., Gonzales R.: Detection of Genetically Modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, 44, 425-436.

Hernandez M., Rodriguez-Lazaro D., Esteve T., Prat S., Pla M.: Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal. Biochem.*, 2003, 323, 164-170.

Ibanez E., Cifuentes A.: New Analytical Techniques in Food Science. *Cit.. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2001, 41, 413-450.

Kuiper H.A.: Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, 1999, 10, 339-349.

Liu G., Su W., Xu Q., Long M., Zhou J., Song S.: Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 2004, 15, 303-306.

MacCormick C.A., Griffin H.G., Underwood H.M., Gasson M.J.: Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, 84, 969-980.

Nowe rozporządzenie UE w sprawie żywności ekologicznej i rolnictwa WE nr 834/2007. Kontekst, Ocena, Interpretacja. Międzynarodowa Federacja Rolnictwa Ekologicznego. Grupa Europejska. IFOAM 2009.

Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dn. 22 września 2003r., dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie. *Off. J. Eur. Commun.*, L 268, 1-23.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 710/2009 z dnia 5 sierpnia 2009 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 889/2008 ustanawiające szczegółowe zasady wdrażania rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007 w odniesieniu do ustanawiania szczegółowych zasad dotyczących ekologicznej produkcji zwierzęcej w sektorze akwakultury i ekologicznej produkcji wodorostów morskich.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5.09.2008r., ustanawiające szczegółowe zasady wdrażania rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007 w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych w odniesieniu do produkcji ekologicznej, znakowania i kontroli, L 250.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 834/2007 z dnia 28.06.2007r., w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylające rozporządzenie (EWG) nr 2092/91, L 189.

Ustawa o organizmach genetycznie zmodyfikowanych z dn. 22 czerwca 2001 r. Tekst ujednolicony – Dz. U. 2007 r. Nr 36, poz. 233)