Određivanje mikotoksina u stočnoj hrani – kukuruz u zrnu

Furlan, Ivančica

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:475725

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivančica Furlan, apsolvent

Preddiplomski studij smjera Bilinogojstvo

ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA U STOČNOJ HRANI – KUKURUZ U ZRNU

Završni rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivančica Furlan, apsolvent

Preddiplomski studij smjera Bilinogojstvo

ODREĐIVANJE MIKOTOKSINA U STOČNOJ HRANI – KUKURUZ U ZRNU

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Doc. dr. sc. Sanda Rašić, predsjednik

2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor

3. Jurica Jović, mag. ing. agr., član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. POJAVA MIKOTOKSINA KROZ POVIJEST **3**

3. MIKOTOKSINI I UVJETI NJIHOVE POJAVE **4**

4. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE RODA *FUZARIUM* **6**

4.1. ZEARALENON **7**

4.2. TRIHOTECENI **8**
4.2.1. T-2 TOKSIN 9
4.2.2. DEOKSINIVALENOL (DON) 10

4.3. FUMONIZINI **11**
4.3.1 FUMONIZIN B1 12

5. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE RODA ASPERGILLUS **13**

5.1. AFLATOKSINI **14**
5.1.1. AFLATOKSIN B1 15

6. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE RODA *PENICILLIUM* **16**

6.1. OKRATOKSINI **17**

6.2. CITRININ **19**

7. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU MIKOTOKSINA **21**

8. MIKOTOKSINI KUKURUZA I UTJECAJ NA ISHRANU DOMAĆIH ŽIVOTINJA **24**

8.1. SUZBIJANJE PLIJESNIVOSTI KLIPOVA I ZRNA KUKURUZA **26**

9. SUZBIJANJE MIKOTOKSINA **27**

10. ZAKLJUČAK **29**

11. POPIS LITERATURE **30**

12. SAŽETAK **32**

13. SUMMARY **33**

14. POPIS TABLICA **34**

15. POPIS SLIKA **34**

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

1. UVOD

Riječ mikotoksin dolazi od grčke riječi „mices“, odnosno gljiva i latinske riječi „toksicum“ što znači otrov (Turner i sur.,2009.). Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti plijesni. Bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikotoksikoze. Mikotoksikoze su alimentarna trovanja ljudi i životinja toksičnim proizvodima plijesni (mikotoksinima).

Mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka i životinja izravnom ili neizravnom kontaminacijom. U izravnoj kontaminaciji prehrambeni materijal je osnova rasta toksikogene plijesni. Gotovo sve namirnice mogu biti dobri domaćini za rast plijesni u nekim stadijima u tijeku njihove proizvodnje, prerade, transporta i skladištenja. Nasuprot tome, neizravna će se kontaminacija pojaviti kada su dodaci namirnicama kontaminirani mikotoksinima.

Žitarice mogu biti izložene razvijanju plijesni tijekom njihova rasta u polju, skladištenja i prerade. Žitarice malog zrna (pšenica, sirak, zob, raž, ječam i riža) sve do skladištenja i prerade slabo su podložne za tvorbu mikotoksina, u odnosu na žitarice velikog zrna, poput kukuruza. Kontaminacija mikotoksinima općenito je povezana sa žitaricama niskog stupnja kakvoće.

Rasprostranjenost i pojavljivanje mikotoksina varira u ovisnosti o klimatskim uvjetima, osobito o vremenu žetve, transportu i skladištenju. Sadržaj vode zrna u žetvi važan je parametar za naknadni porast plijesni. Žitarice malog zrna žanju se u pravilu kada im je sadržaj vode nizak pa se tako smanjuje mogućnost rasta plijesni. Jedino se kukuruz ubire sa sadržajem vode koji potpomaže porast plijesni pa se prije skladištenja zrnje suši. Nakon kikirikijeva brašna, kukuruz je najveći izvor ulaska mikotoksina u krmu. Pri tome je iznimno važna i zemlja podrijetla kukuruza, jer je u zemljama Dalekog istoka kukuruz redovito kontaminiran aflatoksinom.

Orasi i sjemenke uljarica najviše su istraženi supstrati povezani s mikotoksinima, naročito s aflatoksinima. Budući da ima visok sadržaj proteina, kikiriki je glavna stavka u krmnim smjesama. Statiskički podaci o prisutnosti aflatoksina u kikirikijevom brašnu redovito pokazuju opasne razine aflatoksina. Mnoge zemlje sada ograničavaju ili čak zabranjuju uvoz krmnog kikirikijevog brašna.

Radi smanjenja razine mnogih mikotoksina primjenjuju se različiti postupci prerade čitavog niza proizvoda. U najtoplijim zemljama s visokim sadržajem vode u zraku i gdje su postupci u tijeku i nakon žetve nezadovoljavajući, situacija je bitno različita. U takvim je zemljama utjecaj mikotoksina na mnoge bolesti u ljudi i životinja osobito izražen.

Kriteriji koji se moraju primjenjivati u svim sustavima u kojima se provodi dobivanje namirnica i krme, upotreba sirovog materijala bez mikotoksina, sprečavanje kontaminacije hrane sporama plijesni koje proizvode mikotoksine, upotreba aparature bez onečišćenja mikotoksinima u tijeku berbe, žetve, prerade, transporta i skladištenja proizvoda za dobivanje stočne hrane.

Mikotoksini mogu izazvati niz štetnih učinaka na ljude i životinje (kancerogenost, imunotoksičnost, probavne smetnje, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, reproduktivne i razvojne poremećaje i dr.) pri čemu često mogu istovremeno djelovati na više mjesta u oganizmu i na različite načine što ovisi o vrsti mikotoksina, dozi i vremenu izloženosti.

Tablica 1. Glavne toksinogene vrste plijesni i njihovi glavni mikotoksini

Vrsta plesni	Mikotoksin
Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus	Aflatoksini
Aspergillus flavus	Ciklopiazonična kiselina
Aspergillus ochraceus, Penicillium viridicatum, Penicillium cyclopium	Ohratoksin: A
Penicillium expansum	Patulin
Fusarium culmorum, Fusarium. graminearum, Fusarium sporotrichioides	Deoxynivalenol (DON)
Fusarium sporotrichioides, Fusarium poae	T -2
Fusarium sporotrichioides, Fusarium graminearum, Fusarium poae	Diacetoxyscirpenol (DAS)
Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium sporotrichioides	Zearalenon
Fusarium moniliforme	Fumonisini
Acremonium coenophialum	Ergot alkaloidi
Acremonium lolii	Lolitrem B
Phomopsis leptostromiformis	Fomopsini
Pithomyces chartarum	Sporidesmini

.

Izvor: http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/mikotoksini

2. POJAVA MIKOTOKSINA KROZ POVIJEST

U povijesti se nailazi, iako rijetko, na podatke o masovnim trovanjima ljudi i životinja, koja su povezana s uživanjem pljesnive hrane i krme. Jedna od poznatih mikotoksikoza je ergotizam, bolest povezana s ergot-alkaloidima. Ergotizam je bio odgovoran uzročnik smrti tisuća ljudi u Europi u srednjem vijeku.

Opisana je pojava nekih mikotoksikoza u mnogima zemljama kao bolest u konja i svinja, a povezivala se s uživanjem raži kontaminirane s plijesni u SAD-u, stahibotrisa konja i ovaca u bivšem SSSR-u i ovaca u Slovačkoj i Mađarskoj, facijalni egzem ovaca na Novom Zelandu, tumori jetre inducirani žutim rižinim toksinom u Japanu nakon II. Svjetskog rata i dr.

Toksični učinci počeli su se znatnije proučavati od 1960. godine kada je akutno otrovanje aflatoksinom poznato kao „X bolest purana“ uzrokovalo uginuće 100.000 purića u Engleskoj od akutne nekroze jetre i hiperplazije žučnih kanala. Identifikacijom i izolacijom aflatoksina 1960. godine započeo je znanstveni rad na otkrivanju više od 400 danas poznatih toksičnih sekundarnih metabolita plijesni.

Najvažnijim mikotoksinima stočne hrane smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*.

Od 100.000 vrsta plijesni, koliko ih je do danas poznato, preko 200 vrsta ima sposobnost proizvoditi mikotoksine.

3. MIKOTOKSINI I UVJETI NJIHOVE POJAVE

Razvoj i intenzitet pojavljivanja mikotoksina uvjetovan je mikroklimatskim čimbenicima u različitim dijelovima svijeta, te uz pogodne ekološke prilike trajno ugrožavaju proizvodnju i skladištenje stočne hrane.

Geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana je uz klimatske uvjete rasta pojedinih vrsta plijesni. Tako se npr., aflatoksini (koje uglavnom sintetiziraju *Aspergillus* spp.) nalaze češće i u većim koncentracijama u krmivima u tropskom i suptropskom području (Južna Amerika, Oceanija, Indonezija) a okratoksini , zearalenon i trihoteceni (koje uglavnom sintetiziraju *Penicillium* i *Fusarium* spp.) nalaze se u umjerenom klimatskom području (Sjeverna Amerika, Europa, Azija i Rusija).

Tijekom vlažnijih godina bilježe se znatno veće koncentracije mikotoksina kao što je bila 1978. godina u RH. U posljednje vrijeme u RH uočena je smanjena učestalost mikotoksina u žitaricama što se pripisuje sušnijim periodima tijekom vegetacije.

Za pojavu plijesni i njihovih metabolita odgovorni su:

- odgovarajući sadržaj vlage (slobodna ili aktivna voda);

- pogodna temperatura;

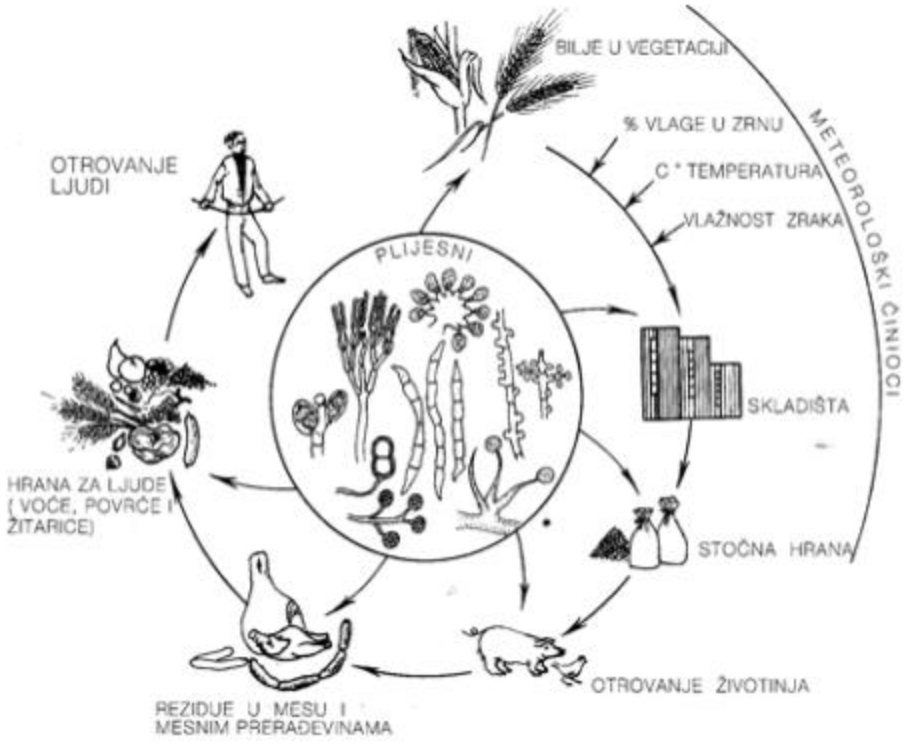
- prisutnost kisika;

- oštećenja na usjevima (fizička ili kukaca);

- prisutnost spora gljiva.

Pogodni čimbenici za pojačani razvoj mikotoksina su pojava toksinogenih plijesni na odgovarajućoj podlozi kao što su žitarice ili neka druga ugljikohidratna podloga i učestale godine sa izraženim promjenama temperature i količine oborina tijekom vegetacije. Nadalje, današnji hibridi selekcionirani su na visoke prinose, a smanjena im je biološka otpornost na stres i zbog toga su dobri domaćini za razvoj mikotoksina. Loša agrotehnika obuhvaća reduciranu osnovnu obradu, povećanu gustoću sklopa, nepoštivanje plodoreda, često uzgoj u monokulturi, povećana zakorovljenost, a to sve pogoduje povećanom razvoju mikotoksina još na polju.

Zatim mehanizirana žetva pri povećanoj vlazi kultura, osobito kukuruza i povećani lom zrna čine „ulazna vrata„ za izvor zaraze mikotoksinima. Skladištenje usjeva u velikim skladišnim prostorima i velikoj masi kultura dovode do miješanja zdrave i zaražene kulture. Nije rijetko ni korištenje improviziranih skladišta s povećanim naseljavanjem štetnika.



Slika 1. Put mikotoksina u hranidbenom lancu.

Izvor: Ožegović i Pepeljnjak, 1995.

4. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE RODA *FUZARIUM*

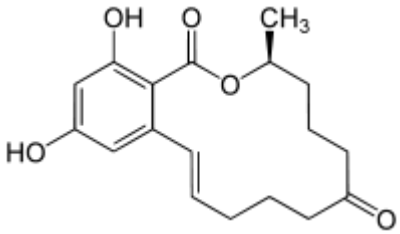
Plijesni iz roda *Fusarium* najčešće se nalaze kao kontaminanti na biljnim namirnicama i u krmi, osobito na onim proizvedenim iz žitarica. Životinje koje se hrane sa krmivima dobivenim od visokog udjela žitarica češće trpe od štetnih djelovanja toksina tih plijesni nego ljudi (podrijetlo krme, skladištenje, rukovanje krmom). Osim toga, izlaganje životinja koje služe za ishranu ljudi može imati štetan učinak na prehranu ljudi zbog odlaganja toksina u mesu, mlijeku i jajima. Mnoge *Fusarium* vste su biljni patogeni, a ostale su saprofiti, te ih najviše obitava u zemlji (Chelkowski, 2011.). Najčešće kontaminiraju zrnja žitarica, sjemenje uljarica i grahoricu. Kukuruz, pšenica i proizvodi načinjeni od njih vrlo su često kontaminirani vrstama mikotoksinima iz roda *Fusarium*. Od ostalih kultura mogu još kontaminirati ječam, raž, proso i rižu.

Postoji 12 skupina unutar roda Fusarium, od kojih su 4 sekcije koje imaju najtoksičnije vrste, a to su: *Sporotrichiella* (*F. sporotrichioides*, *F. poae*), *Gibbosum* (*F. equiseti*), *Discolor* (*F. graminearum*, *F. culmorum*) i *Liseola* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutienans*) (Nelson i sur., 1983.).

Predstavnici roda *Fusarium* proizvode mnoštvo bioloških aktivnih spojeva koji su strukturno i po načinu djelovanja vrlo razlikuju. Vjeruje se da mnogi od tih spojeva mogu štetno djelovati na imunološki sustav potiskujući imunološke funkcije.

4.1. ZEARALENON

Mikotoksin zearalenon (F-2 toksin) je dobio naziv prema plijesni *Giberella zeae* iz koje je izoliran 1962. godine (Delaš, 2010.). Metabolit je toksikogenih plijesni roda *Fusarium*, prvenstveno *F. graminearum* i nekih izolata *F. moniliforme*, *F. oxysporium*, *F. culmorum* i dr. Nesteroidni je estrogeni mikotoksin s kemijskom strukturom laktona rezorciklične kiseline.



Slika 2. Struktura zearalenona.

Izvor: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/db/Zearalenone.svg/400px-Zearalenone.svg.png

Zearalenon pripada skupini fitoestrogena. Fitoestrogeni su komponente prirodno prisutne u biljkama kojima je zajednička karakteristika kemijska sličnost sa prirodnim i sintetskim hormonima estrogenima.

Produkciji zearalenona naročito pogoduju vlažnija klimatska podneblja s nižim temperaturama od 10 do 15 °C. Danas je poznato preko 150 derivata zearalenona, među kojima je vrlo značajan α – zearalenol koji je 3 do 4 puta toksičniji od zearalenona te β izomer čija je aktivnost približno jednaka zearalenonu.

Zearalenon je termostabilan, a stabilan je i u različitim organskim otapalima poput acetonitrila, etil-acetata, metanola kloroforma i acetona. Nije topiv u vodi, ugljik-disulfidu i ugljik-tetrakloridu, a topiv je u vodenim alkalijama, eteru i alkoholima (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). Prisutnost zearalenona dokazana je u različitijim žitaricama i to kukuruzu, ječmu, pšenici, raži, soji i njihovim proizvodima (Duraković i Duraković, 2000., Ožegović i Pepeljnjak, 1995., Mitak, 1998.). Do kontaminacije dolazi na polju ali se rast plijesni i tvorba toksina nastavlja i tijekom skladištenja, osobito ako je ono neprikladno. Zearalenon i produkti njegova metabolizma mogu se naći i u plijesnima onečiščenoj silaži, kikirikiju, stočnoj hrani i proizvodima fermentacije kukuruza kao što je pivo, a i u hrani životinjskog podrijetla. Nađen

je u mlijeku, mišićima, organima, tkivima i jajima životinja koje su bile hranjene kontaminiranom hranom.

Toksični učinak zearalenona ovisi o koncentraciji, vremenu izlaganja i općem fiziološkom stanju organizma. Djeluje estrogeno uzrokujući poremećaj urogenitalnog sustava, a kronična trovanja ili jača akutna otrovanja ostavljaju trajne posljedice na reproduktivnim organima kao degenerativne promjene (Ožegović i Pepeljnjak, 1995., i Hussein i Brasel, 2001.). Simptomi izloženosti zearalenonom su upala rodnice (vulvovaginitis), a u životinja koje nisu spolno zrele prolaps rektuma i rodnice. Estrus može biti produljen, smanjen je spolni nagon, životinje su neplodne, dolazi do mumifikacije fetusa, pobačaja, mrtvorođenosti i smanjenog okota. Kod muških životinja može uzrokovati atrofiju sjemenika i povećanje mliječnih žlijezda. Na pokusnim je životinjama dokazano da zearalenon prolazi kroz placentu u fetus. Osim estrogenog djelovanja zearalenon inhibira lučenje folikulstimulirajućeg hormona zbog čega potiskuje razvoj folikula ovarija i inhibira proces ovulacije te ima luteotropan efekt pa izaziva retenciju žutog tijela, pseudotrudnoću i anestriju. Vezanjem za estrogene receptore zearalenon uzrokuje hormonsku neravnotežu i dovodi do hiperestrogenizma kod domaćih životinja. Svinje su najosjetljivija vrsta i kod njih su mikotoksikoze zearalenonom najčešće.

IARC je 1993. godine svrstao zearalenon u skupinu 3 (nema kancerogena svojstva za ljude) zbog nedostatnih istraživanja na ljudima i ograničenih istraživanja na pokusnim životinjama.

4.2. TRIHOTECENI

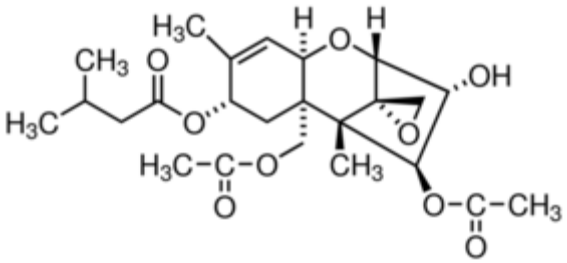
Trihotecene sintetiziraju plijesni roda *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides* i dr.). Do sada je izolirano i karakterizirano 170 trihotecena, a tek je za njih nekoliko potvrđen toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja (Bennet i Klich, 2003.). Na osnovu kemijske strukture dijele se u 4 skupine: A, B, C i D. Trihoteceni iz skupine A i B nalaze se kao kontaminanti i to najčešće na pšenici, kukuruzu, ječmu i zobi, a mogu se naći i u prerađenim proizvodima: brašnu, sladu i pivu.

Najvažniji trihoteceni su: A skupine (T-2 toksin) i B skupine (deoksinivalenol)

.

4.2.1. T-2 TOKSIN

T-2 toksin, prirodni seskviterpen, prvi je puta izoliran iz plijesni *Fusarium tricinctum*. Pripada tipu A trihotecenskih mikotoksina, a produciraju ga plijesni iz roda Fusarium u širokom temperaturnom intervalu od 0 - 32 °C uz maksimalnu produktivnost ispod 15 °C (Creppy, 2002., Richard, 2007., Sokolović i sur., 2008.). T-2 toksin je nehlapivi spoj, nije topiv u vodi, a dobro je topiv u etil-acetatu, acetonu, kloroformu, dimetil-sulfoksidu, etanolu, metanolu i propilen glikolu. Termostabilan je i teško ga je suzbiti u proizvodnji hrane. Inaktivira ga zagrijavanje 30 - 40 minuta na 200 - 210 °C (Sokolović i sur., 2008.). Od svih žitarica najčešće kontaminirani ovim mikotoksinom su kukuruz, pšenica, ječam, zob i raž. Ukoliko se unese hranom, u buragu životinja T-2 toksin metabolizira u manje toksične HT-acetil-2 i HT-2 toksine. Ostaci T-2 toksina i njegovi metaboliti pronađeni su u mlijeku.



Slika 3. Struktura T-2 toksina.

Izvor: http://static.enzolifesciences.com/fileadmin/files/formula/630-101.gif

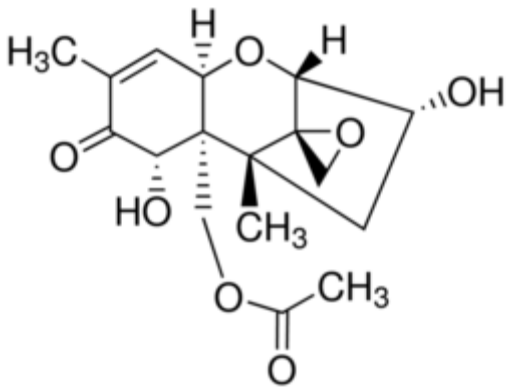
T-2 toksinu se pripisuju vrlo jaka citotoksična i imunosupresijska svojstva koja mogu uzrokovati akutne intoksikacije i kronične bolesti i kod ljudi i kod životinja. Simptomi akutne intoksikacije su: mučnina, drhtavica, abdominalna bol, proljev i gubitak tjelesne mase, a kod životinja simptomi uključuju i crijevna krvarenja, smanjenu produkciju mlijeka pa i uginuće goveda.

T-2 toksin inhibira sintezu proteina što uzrokuje sekundarne poremećaje u sintezi DNK i RNK (Richard, 2007.). Također negativno utječe i na imunološki sustav, rezultirajući promjenom broja leukocita i pojačanom hipersenzitivnošću (Creppy, 2002.).

Zbog nedovoljnog postojanja relevantnih dokaza za karcinogenost kod ljudi i životinja IARC je T-2 toksin svrstao u skupinu 3 tj. skupinu tvari koja nije kancerogena za ljude.

4.2.2. DEOKSINIVALENOL (DON)

Deoksinivalenol (DON, vomitoksin), tetraciklički epoksi-seskviterpen, pripada tipu B trihotecenskih mikotoksina (Türker i Gümüs, 2009.), a prvi je puta izoliran iz oštećenih zrna ječma 1972. godine. Javlja se uglavnom kod žitarica poput pšenice, ječma i kukuruza, a rjeđe kod zobi, raži i riži. Produkcija deoksinivalenola primarno je povezana s *Fusarium graminerarum* i *Fusarium culmorum*, a naročito mu pogoduju vlažnija klimatska podneblja (aktivitet vode od 0,97) i temperatura od 25 - 28 °C .



Slika 4. Struktura deoksinivalenola.

Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Deoxynivalenol.png

DON je bezbojan sitan prah, topiv je u polarnim otapalima poput vode, metanola, etanola, acetonitrila i etil-acetata. Stabilan je tijekom skladištenja, mljevenja, prerade i toplinske obrade hrane. Pretpostavlja se da može biti prisutan i u proizvodima životinjskog podrijetla poput mesa i mlijeka. Međutim, u buragu preživača DON metabolizira u DOM-1 koji je znatno manje toksičan od izvorne forme.

DON i njegovi metaboliti brzo se izlučuju iz organizma prije svega putem urina, ali i u vrlo malim koncentracijama putem mlijeka (Whitlow i sur., 2006.).

Iako se smatra jednim od manje toksičnih trihotecena, DON je važan zbog kontaminacije hrane diljem svijeta (Valpotić i Šerman, 2006.). Kod životinja akutna izloženost DON-u izaziva smanjeni unos hrane (anoreksiju) i povraćanje, a kod duže izloženosti uzrokuje smanjeni prirast te promjene na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri. Najosjetljivije životinje na ovaj mikotoksin su svinje. Razina DON-a u hrani za svinje od 5mg/kg smanjuje iskorištavanje hrane za 30-50% jer svinje odbijaju ishranu takvom hranom. Pretpostavlja se da da odbijaju hranu zbog mirisa i okusa. DON se brzo i djelotvorno apsorbira pa se više od 95% unesenog DON-a izluči mlijekom, urinom i fecesom krava i svinja. Ostaci DON-a se mogu naći u organima svinja koje su hranidbom dobivale onečišćenu hranu (srcu, jetri, bubrezima i dr.), ali se ne mogu detektirati ukoliko se DON ukloni iz hrane 12 sati prije klanja (Whitlow i sur., 2006.).

IARC je 1993. godine zaključila da ne postoji dovoljno dokaza na eksperimentalnim životinjama koji ukazuju na kancerogenost DON-a te ga je svrstala u skupinu 3. Međutim, dokazano je sinergističko djelovanje DON-a u kombinaciji s drugim mikotoksinima. U kombinaciji s aflatoksinom B1, DON ima izražajnije mutageno djelovanje.

4.3. FUMONIZINI

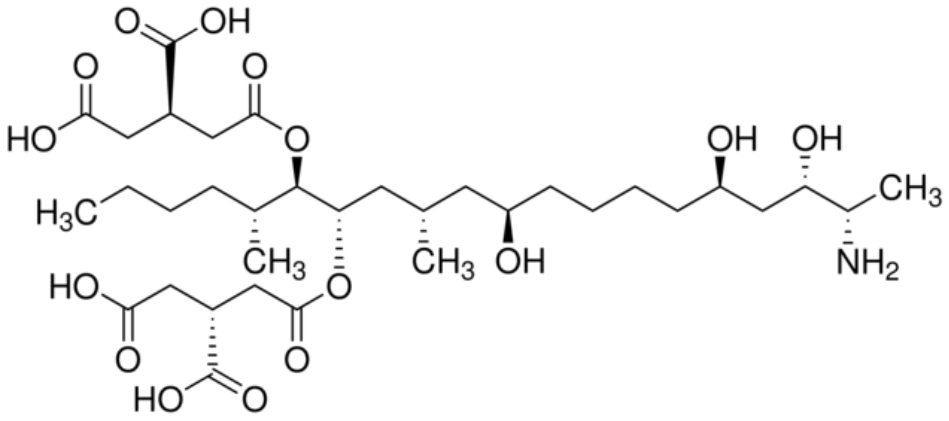
Fumonizini su mikotoksini koje sintetiziraju plijesni: *Fusarium verticilloides*, *F. proliferatum* i *F. moniliforme*. Prvi puta su opisani 1988. godine. Najčešće nalazimo plijesan *F. moniliforme* koja se sintetizira još u tijeku rasta kukuruza u polju.

U povijesti se njihovo otkriće povezuje sa istraživanjem pojave encefalomalacije (ELEM) u konja. Osniva se na lezijama tkiva povezanima s kliničkim znakovima i izolacijom *F. moniliforme* iz sumnjive krme.

Po kemijskoj strukturi su alifatski ugljikovodici s terminalnom amino skupinom i dva lanca trikarboksilnih kiselina. Ovisno o broju i smještaju hidroksilnih skupina razlikujemo fumonizin B1, B2 i B3.

4.3.1 FUMONIZIN B1

Fumonizin B1 je najtoksičniji predstavnik mikotoksina iz grupe fumonizina.



Slika 5. Struktura fumonizina B1.

Izvor: http://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/02159925.png

Fumonizin B1 je bijeli higroskopni prah topiv u vodi, acetonitrilu i vodi odnosno metanolu. Stabilan je u otopini acetonitril:voda (1:1), dok je u metanolu nestabilan. Također, stabilan je na temperaturama tijekom pripreme hrane i nije fotosenzibilan. Zbog drastičnih promjena u živčanom sustavu dolazi do razvoja brze progresivne neurotoksikoze koja se manifestira kroz depresiju, nemir, sljepoću, ataksiju, facijalnu paralizu, prisilne kretnje, propulzije, komu i smrt.

U znatnim koncentracijama fumonizin B1 je prinađen u kukuruzu i proizvodima na bazi kukuruza, riži i ječmu, a vrlo često ga se pronalazi i u kombinaciji s drugim mikotoksinima. Fumonizin B1 nije prisutan u mlijeku, mesu ili jajima životinja hranjenih hranom kontaminiranom fumonizinima u koncentracijama koje bi narušavale ljudsko zdravlje (World Health Organization, 2000.). Međutim, prisutnost fumonizina u hrani za životinje može imati negativan učinak na kakvoću mesa, koji se odnosi prije svega na povećan udio masti i smanjeni udio mesa, što će kod proizvođača rezultirati velikim ekonomskim gubitcima (Valpotić i Šerman, 2006.).

Malo je pouzdanih podataka koji se odnose na metabolizam fumonizina B1 kod ljudi no budući da su u nekim dijelovima Afrike, gdje je kukuruz osnovna namirnica, utvrđene njegove visoke koncentracije povezuje ga se sa viskom učestalošću tumora jednjaka.

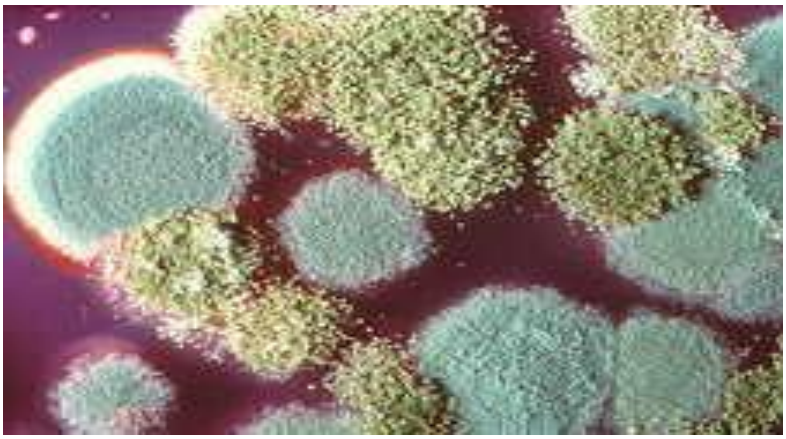
Kod eksperimentalnih životinja apsorpcija je vrlo slaba te je brza eliminacija urinom i fecesom. Vrlo male količine fumonizina zaostaju u jetri i bubregu (World Health Organization, 2000.). Literaturni podatci navode da se fumonizini mogu povezati s rakom jednjaka kod ljudi, dok kod štakora uzrokuju rak jetre, a kod svinja plućni edem (Valpotić i Šerman, 2006.).

IARC je fumonizin B1 uvrstio u skupinu 2B kao moguće kancerogene tvari za ljude. Razlog tome je premalo epidemioloških studija na ljudima i veliki broj dokaza kancerogenosti na životinjama (IARC, 1993).

5. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE RODA ASPERGILLUS

Rod *Aspergillus* bio je prvi put opisan prije gotovo 300 godina i smatra se iznimno važnim rodom plijesni u namirnicama. Iako se neke vrste toga roda upotrebljavaju za proizvodnju nekih osobitih namirnica (sojin umak), najveći broj *Aspergillus* vrsta dolaze kao onečišćivači i sudjeluju u razgradnji i kvarenju namirnica i krme.

Toksini koje proizvode plijesni iz roda *Aspergillus* nazivaju se aflatoksini.



Slika 6. Aflatoksini – metaboliti plijesni.

IZVOR: www.mef.unizg.hr/society/hdze/hr/download/mikotoksini.ppt

5.1. AFLATOKSINI

Aflatkoksini su najpoznatiji i najtoksičniji mikotoksini. Prvi puta su opisani u Engleskoj 1960. godine (Prasanna i sur., 1975., Hussein Brasel, 2001.). Metaboliti su gljivica iz roda *Aspergillus* (*A. flavus* , *A. parasiticus* , *A. nomius* , *A. niger* , *A. ruber* , *A. ohraceus*), gljivica iz roda *Penicillium* (*P. puberulum* , *P. variable*) te nekih pripadnika iz roda *Rhizopus*. Te plijesni su vrlo često kontaminiraju velik broja namirnica i krme.

U ljudi i u životinja aflatoksini se opisuju kao odgovorni uzročnici velikog broja bolesti, često sa smrtonosnim ishodom, izazvanih korištenjem plijesnivih namirnica. Aflatoksikoze u životinja i ljudi mogu biti uzrokovane unošenjem namirnica ili krme koja sadrži aflatoksine. Kontaminacija se može zbiti u tijeku rasta biljaka u polju, tijekom žetve ili uskladištenja i prerade.

A. flavus široko je rasprostranjena plijesan u prirodi, dok je *A. parasiticus* mnogo manje rasprostranjena. *A. flavus* i *A. parasiticus* očituju veliku sklonost rastu na orasima i uljaricama. Kukuruz, kikiriki i pamučno sjeme najvažnije su žitarice koje te plijesni napadaju.

Za rast im pogoduju temperature od 26 – 38 °C i sadržaj vlage veći od 18%. *Aspergillus flavus* sintetizira aflatoksine B1 i B2 na žitaricama poput kukuruza, dok *Aspergilllus parasiticus* može sintetizirati aflatoksine B1, B2, G1 i G2 na uskladištenim uljaricama (Valpotić i Šerman, 2006.).

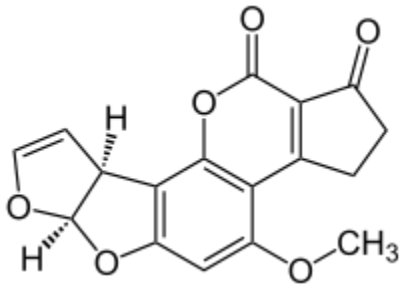
Aflatoksini su smjese kemijskih srodnih spojeva, derivata difurokumarina. Prirodni su fluorescirajući spojevi, vidljivi u UV-spektru pri valjnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G nastala su upravo na njihovom fluorescirajućem svojstvu; B za plavu i G za zelenu fluorescenciju. Termostabilni su i u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih utjecaja. Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, aceton, kloroform), a gotovo ne topivi u vodi. Dokazana je kontaminacija žitarica, mesa, iznutrica svinja i peradi te jaja (Ožegović i Pepeljnjak, 1995., Richard, 2007., Husain i sur., 2010.).

Aflatoksini B2 i G2 su dihidroderivati (roditeljskih) aflatoksina B1 i G1. Aflatoksini M1, M2 i P1 su dihidroderivati (roditeljskih) aflatoksina B1 i B2 a izlučuju se u mlijeku,

urinu i u stolici kao proizvodi metabolizma aflatoksina B1 i B2. Aflatoksini M1 i M2 produkti su biološke pretvorbe aflatoksina B1 i B2 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja je sadržvala aflatoksine spomenute B-skupine. Oni su izolirani iz mlijeka (stoga su i nazvani aflatoksinima M-skupine) i urina takvih životinja i mogu se nalaziti i u mliječnim proizvodima. Aflatoksin B1 najsnažniji je karcinogem, a prema opadajućoj kancerogenosti slijede: G1, M1, B2, G2, M2, B2a, G2a i P1. Aflatoksin B1 je prisutan u najvećoj količini, koncentracija aflatoksina G1 ima srednje vrijednosti dok su B2 i G2 zastupljeni u relativno malim količinama.

5.1.1. AFLATOKSIN B1

Od mikotoksina iz skupine aflatoksina najtoksičniji je aflatoksin B1 (Domljan i Peraica, 2010.). Organ na koji on najviše utječe su jetra, a izraženost promjena ovisna je o količini, dužini izloženosti, vrsti životinje, načinu uzgoja i uhranjenosti životinje. Otrovanje s velikim dozama aflatoksina B1 može imati i smrtni ishod. Subletalne doze uzrokuju kronično otrovanje, a dugotrajna kronična izloženost niskim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno karcinom jetre. Aflatoksin B1 inhibira sintezu DNK, polimerazu RNK ovisnu o DNK, sintezu glasničke RNK i sintezu proteina.



Slika 7. Struktura aflatoksina B1.

Izvor: http://www.fgsc.net/fgn/sterig.gif

Istraživanja načina djelovanja aflatoksina B1, otkrila su njegov inhibicijski učinak na replikaciju DNK i RNK i sintezu proteina, ali su dokazani učinci na citoplazmene membrane i na put oksidativne fosforilacije. Nasuprot mnogim mikotoksinima, aflatoksini moraju biti biološki transformirani prije nego što izazovu reakcije u živom organizmu. Kao rezultat biotransformacije stvara se derivat aflatoksina B1, aflatoksin B1-2,3-epoksid, koji je visoko reaktivan metabolit i koji reagira s nukleofilnim mjestima u makromolekulama. Kovalentno povezivanje s DNK rezultira inhibicijom replikacije DNK, a također i inhibicijom sinteze RNK i mutagenim djelovanjem.

Međunarodna agencija (International Agency for Research on Cancer-IARC) aflatoksin B1 je uvrstila na osnovu dokaza u skupinu 1. kancerogena (IARC, 2012.).

6. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE RODA *PENICILLIUM*

Penicillium je veliki rod sa 150 poznatih vrsta. Najmanje 50 vrsta pojavljuju se zajednički. Unutar roda *Penicillium* nalaze se četiri podroda: *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Bivarticillium* i *Penicillium*. Glavne i najvažnije toksikogene vrste koje su odgovorne i za kvarenje namirnica pripadaju podrodu *Penicillium*.

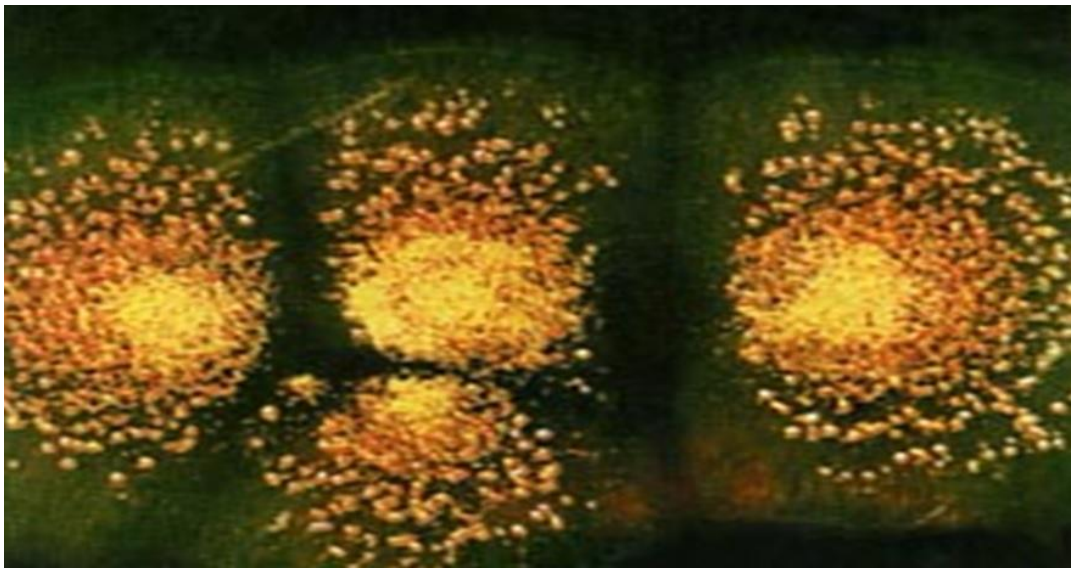
Istraživanja i eksperimentalna otkrića roda *Penicillium* započela su oko 1861. godine kada je japanski istraživač Sakai opisao da je etanolni ekstrakt pljesnive „požutjele“ riže smrtonosan za pse, zečeve i zamorčad sa simptomima koji su upućivali na paralizu središnjeg živčanog sustava. Kao posljedica toga 1910. godine u Japanu je zabranjena prodaja žute riže. Otkriće penicilina 1929. godine dalo je poticaj za istraživanje i drugih metabolita plijesni iz roda *Penicillium* i prepoznavanja citrinina, patulina i dr. mikotoksina iz roda *Penicilllium*. Raspon vrsta mikotoksina proizvedenih s pomoću plijesni iz roda *Penicillium* širi je nego u bilo kojeg drugog roda. Molekularni im je sastav izvanredno različit. Vrlo su različite toksičnosti. Mogu se svrstati u dvije velike skupine: oni koji štetno djeluju na jetrene i bubrežne funkcije i na neurotoksine. Najvažniji mikotoksini ovog roda koji mogu uzrokovati toksičnost žitarica i stočne hrane su: okratoksin A, B, C i citrinin.

6.1. OKRATOKSINI

Okratoksini su skupina kemijskih spojeva što ih sintetiziraju plijesni roda *Penicillium* i neki sojevi roda *Aspergillus* kontaminirajući pri tome raznovrsne poljoprivredne usjeve uzrokujući negativne posljedice na zdravlje ljudi i životinja. Najznačajniji predstavnik te skupine je okratoksin A.

6.1.2 OKRATOKSIN A

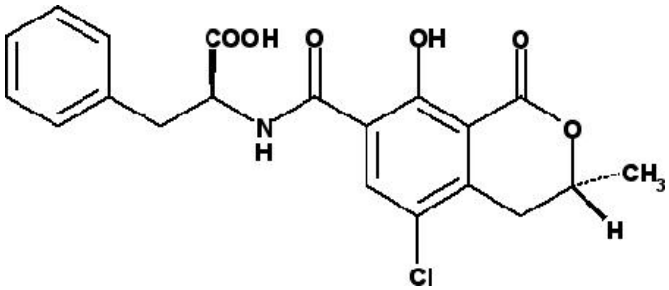
Okratoksin A je izoliran iz plijesni *Aspergillus ohraceus*, a identificiran je 1965. godine. Snažan je mikotoksin koji uzrokuje oštećenje bubrega, a po toksičnosti slijede okratoksin B i okratoksin C. *Aspergillus ochraceus* široko je rasprostranjena plijesan najviše na osušenim namirnicama.



Slika 8. Kolonije vrste *Aspergillus ochraceus*.

Izvor: www.mef.unizg.hr/society/hdze/hr/download/mikotoksini.ppt

Okratoksin A je bezbojan do bijeli prah kristalne strukture, a pod UV svjetlom pokazuje intenzivnu zelenu fluorescenciju u kiselom mediju te plavu fluorescenciju u alkalnom mediju. U kiselom i neutralnom pH području topiv je u organskim otapalima (alkoholi, ketoni, kloroform), slabo je topiv u vodi i netopiv je u petroleju. U alkalnim uvjetima topiv je u vodenoj otopini natrijevog hidrogenkarbonata.



Slika 9. Struktura okratoksina A.

Izvor: http://apelasyon.com/img/userfiles/images/okratoxin904.jpg

Jedna od značajnih osobina okratoksina A je njegova stabilnost pri visokim temperaturama. Kada su namirnice kontaminirane ovim mikotoksinom vrlo ga je teško ukloniti. Industrijski procesi u proizvodnji mesnih proizvoda poput zagrijavanja, soljenja, sušenja i skladištenja nemaju utjecaja na smanjenje okratoksina u konačnom mesnom proizvodu. Jedino, prženjem nekih mesnih proizvoda može rezultirati gubitkom oko 20% okratoksina.

Smatra se da je okratoksin A potencijalni nefrotoksin i smatrao se jedinim uzročnikom odgovornim za bolest balkanske endemske nefropatije, teške kronične obostrane bolesti bubrega i tumora urinarnog trakta, a čija se pojava prati u nekim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije. Osnovni patološki učinci akutne okratoksikoze su nekroza bubrežnoga cjevastog epitela i jetrenih stanica. Okratosin A nađen je u komercijalnom kukuruzu, ječmu, osušenom zrnu bijeloga graha, pljesnivu kikirikiju i u zobi.

Okratoksin A inhibira sintezu proteina u prokariotskih i u eukariotskih stanica, i u sustavima invitro. Kontaminacija namirnica okratoksinom A najviše se zbiva u Skandinaviji i u baltičkim zemljama gdje je njegov izvor plijesan *Penicillium verrucosum*.

Aspergillus ohraceus je kserofil i najbolje se može izolirati na podlogama s reduciranom aw-vrijednošću kao što je agar DG18. Okratoskini se mogu istraživati uobičajenim kromatografskim postupcima. Za detekciju se koristimo UV-svijetlom (333 nm), te imunološki postupci, uključujući ELISA za detekciju okratoksina A.

Okratoksini predstavljaju potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje. Temeljem pokazatelja kancerogenog učinka okratoksina na pokusnim životinjama, IARC ga je uvrstio u skupinu 2B, tj. skupinu spojeva mogućih ljudskih kancerogena.

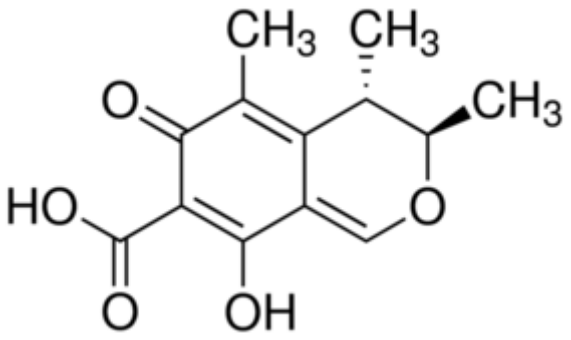
6.2. CITRININ

Citrinin je mikotoksin kojeg prvenstveno sintiteziraju plijesni iz roda *Penicillium*: *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. notatum*. Mogu ga proizvoditi i vrste plijesni iz roda *Aspergillus* kao i neke leguminoze

Prvotno je bio karakteriziran kao antibakterijski antibiotik. Opisan je njegov inhibicijski učinak na praživotinje, kvasce i kvascima slične organizme. Smatra se da je mogao biti uključen u balkansku endemsku nefropatiju. Nađen je u uzorcima krme u Danskoj, pljesnivim žitaricama u Kanadi i u požutjeloj riži u Japanu.

Može se pronaći u namirnicama biljnog podrijetla, prvenstveno u žitaricama malog zrna (pšenica, ječam, raž, zob, riža) i velikog zrna (kukuruz), uljaricama te voću, povrću i voćnim sokovima. Uglavnom nastaje iza žetve prilikom skladištenja.

Citrinin je izraziti nefrotoksin koji uzrokuje čitav niz bolesti u domaćih životinja poput svinja i pasa. To je žuti ciklički spoj sa slobodnom karboksilnom skupinom.



Slika 10. Struktura citrinina.

Izvor: http://www.adipogen.com/media/catalog/product/a/g/ag-cn2-0101.png

Izoliran je iz kulture *Penicillium citrinum* Thom 1931. godine a 1981. je izoliran iz *Monascus purpureus*.

Citrinin se često javlja kao nepoželjan sastojak fermentacijskih produkata dobivenih pomoću *Monascus* vrte (crvena riža) koja se u Aziji stoljećima koristi za očuvanje mesa, kao konzervans i kao prirodno bojilo.

Prema IARC uvršten je u skupinu 3 kancerogenih tvari u koju su uvrštene tvari kojima je dokazana kancerogenost na životinjskim organizmima. Nije dokazano kancerogeno djelovanje na ljude.

7. ANALITIČKE METODE U ODREĐIVANJU MIKOTOKSINA

U svrhu kontrole zdravstvene ispravnosti hrane i hrane za životinje, u okviru Državnog plana službenih kontrola i monitoringa hrane za životinje i Državnog programa monitoringa rezidua Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, provodi se nadzor kontaminacije mikotoksinima.

Najveće dopuštene količine (NDK) propisane su Pravilnikom o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (N.N. 80/10.), Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (N.N. 154/08.) te preporukama Europske unije (2006/576/EC).

Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N.N. 02/05.) definira uvjete o primjeni analitičkih metoda, no bez obzira koja se analitička metoda koristi, ista prethodno treba biti ispitana kroz određivanje validacijskih parametara te mora davati točne i precizne podatke, biti dovoljno specifična za određivanje vrlo niskih koncentracija mikotoksina, odnosno imati niske limite detekcije. Od screening metoda u određivanju mikotoksina najviše se koristi imunoenzimska metoda (ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay) kao jednostavna i brza metoda, ekonomski i ekološki prihvatljiva s mogućnošću analize velikog broja uzoraka (Šegović Klarić i sur., 2008.). Nedostatak ove metode je nedovoljna specifičnost i mogućnost cross-reakcija s konjugiranim metabolitima.

Slika 11. Uređaj ELISA - određivanje mikotoksina (orijentacioni test).

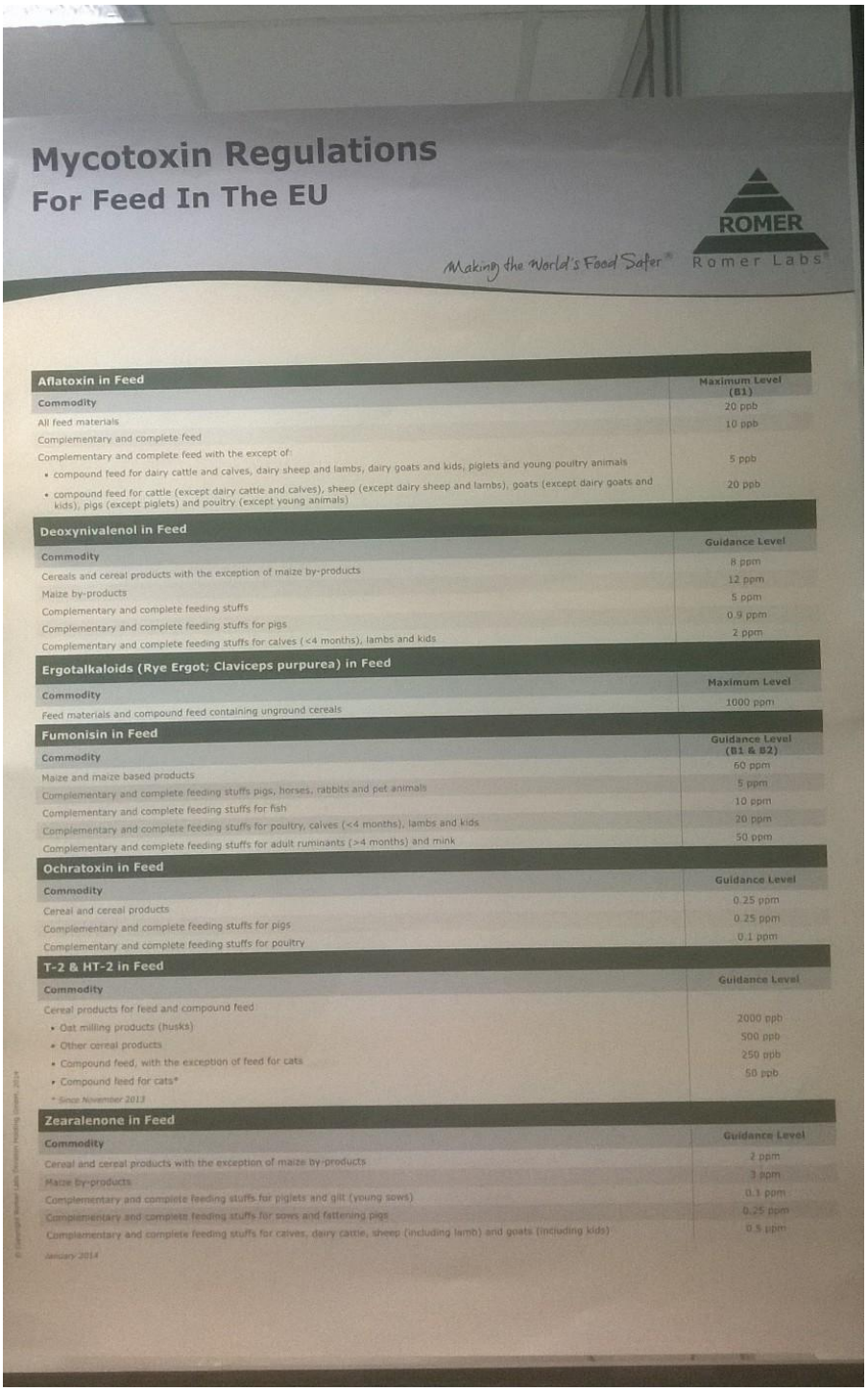
Izvor: Fotografija uređaja iz laboratorija Euroinspekt Croatiakontrole d.o.o.

Kao prikladne potvrdne metode, koje udovoljavaju zadanim kriterijima i omogućavaju selektivno određivanje mikotoksina, mogu se koristiti tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje spektrometrijom masa (MS) te tekućinska kromatografija (LC) ili plinska kromatografija (GC) uz dokazivanje infracrvenom (IR) spektrometrijskom detekcijom. Također, moguća je primjena i LC–fluorescencije za molekule koje pokazuju prirodnu fluorescenciju i molekule koje pokazuju fluorescenciju nakon derivatizacije.

Slika 12. Uređaj MS/MS HPLC - određivanje mikotoksina (uređaj visoke točnosti).

Izvor: Fotografija uređaja iz laboratorija Euroinspekta Croatiakontrole d.o.o.

Literaturni podatci navode da se u posljednje vrijeme sve više koristi MS u kombinaciji s drugim tehnikama koje karakteriziraju niski limiti detekcije, a i mogućnost analiza više vrsta mikotoksina iz jednog matriksa.



Mycotoxin Regulations
For Feed In The EU

ROMER
Making the World's Food Safer®
Romer Labs®

Aflatoxin in Feed	Maximum Level (B1)
Commodity	
All feed materials	20 ppb
Complementary and complete feed	10 ppb
Complementary and complete feed with the except of:	
• compound feed for dairy cattle and calves, dairy sheep and lambs, dairy goats and kids, piglets and young poultry animals	5 ppb
• compound feed for cattle (except dairy cattle and calves), sheep (except dairy sheep and lambs), goats (except dairy goats and kids), pigs (except piglets) and poultry (except young animals)	20 ppb

Deoxynivalenol in Feed	Guidance Level
Commodity	
Cereals and cereal products with the exception of maize by-products	8 ppm
Maize by-products	12 ppm
Complementary and complete feeding stuffs	5 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for pigs	0.9 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for calves (<4 months), lambs and kids	2 ppm

Ergotalkaloids (Rye Ergot; Claviceps purpurea) in Feed	Maximum Level
Commodity	
Feed materials and compound feed containing unground cereals	1000 ppm

Fumonisin in Feed	Guidance Level (B1 & B2)
Commodity	
Maize and maize based products	60 ppm
Complementary and complete feeding stuffs pigs, horses, rabbits and pet animals	5 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for fish	10 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for poultry, calves (<4 months), lambs and kids	20 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for adult ruminants (>4 months) and mink	50 ppm

Ochratoxin in Feed	Guidance Level
Commodity	
Cereal and cereal products	0.25 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for pigs	0.25 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for poultry	0.1 ppm

T-2 & HT-2 in Feed	Guidance Level
Commodity	
Cereal products for feed and compound feed	
• Oat milling products (husks)	2000 ppb
• Other cereal products	500 ppb
• Compound feed, with the exception of feed for cats	250 ppb
• Compound feed for cats*	50 ppb
* Since November 2013	

Zearalenone in Feed	Guidance Level
Commodity	
Cereal and cereal products with the exception of maize by-products	2 ppm
Maize by-products	3 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for piglets and gilt (young sows)	0.1 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for sows and fattening pigs	0.25 ppm
Complementary and complete feeding stuffs for calves, dairy cattle, sheep (including lamb) and goats (including kids)	0.5 ppm

January 2014

Slika 13. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama mikotoksina u žitaricama (hrana za životinje).

Izvor: Fotografija Pravilnika iz laboratorija Euroinspekt Croatiakontrole d.o.o.

8. MIKOTOKSINI KUKURUZA I UTJECAJ NA ISHRANU DOMAĆIH ŽIVOTINJA

Pljesnivost klipova kukuruza trajan je problem u proizvodnji i skladištenju kukuruza. Skladišnim plijesnima (*Aspergillus, Penicilium*) pogoduju visoke temperature i niska vlažnost zraka (13 - 18%), a poljskim plijesnima (*Fusarium, Gibberella, Alternaria*) pogoduje niža temperatura te viša vlažnost (18 i više %). U RH 2013. godina bila je godina sa smanjenjom količinom oborina i višim temperatura što je uvjetovalo pojavu povećanog razvoja tkz. skladišnih plijesni, a 2014. je bila godina sa povećanom količinom oborina te je pogodovala razvoju tkz. poljskih vrta plijesni.

Plijesni iz roda *Fusarium* najsnažnija su oboljenja klipa i zrna kukuruza i to najčešće u vrijeme zriobe. Fuzariozna pljesnivost klipa i zrna prisutna je na mnogim uzgojnim područjima. Izazivaju ga gljivice iz roda *Fusarium* pri čemu je *F. moniliforme* primarna vrsta. Do oboljenja dolazi u raznolikim vremenskim uvjetima. Gljiva izaziva trulež stabljike i kolonizira bilo koji dio biljke kukuruza a naročito su podložni sekundarni klipovi i klipovi koji su zbog manjka kalija u ishrani ostali nedovršeni i čine izvstan medij za razvoj fuzarioznih plijesni. Gljivice duboko prodiru u sva tkiva klipova, osobito sekundarnih i tercijalnih gdje tijekom metabolizma izlučuju štetne mikotoksine. Berbom takvog kukuruza za zrno i silažu, gljivice i njihovi štetni metaboliti dospijevaju u stočnu hranu. Ishrana životinja sa kukuruzom onečišćenim sa mikotoksinima može uzrokovati mikotoksikoze. Najčešći toksini koje simtetiziraju vrste roda *Fusarium* u kukuruzu su: deoksinivalenol, T-2 toksin, zearalenon i fumonizin B1 i B2.

Slika 14. Prikaz plijesni.

Izvor: http://poljoprivredaiselo.com/wp-content/uploads/2009/10/oboljeli-klip1-300x193.jpg

Giberlioznu pljesnivost klipa uzrokuje *Giberella zeae* seksualni stadij *Fusarium graminearum* koji istovremeno izaziva i trulež stabla. Zaraza se vrši preko svile klipa, proizvodi mikotoksin zearalenon i dr. Uzrokuje štete u polju i skladištima kad je vlaga zrna veća od 18%. Plijesan je bijele ili ružičaste boje. Oboljenje klipa uvijek počinje od vrha klipa.

Slika 15. Prikaz plijesni.

http://poljoprivredaiselo.com/wp-content/uploads/2009/10/gibberella-300x167.jpg

Diploidnu trulež klipa kukuruza uzrokuje gljivica *Stanocarpella maydis*. Spore gljiva se primarno šire kišnim kapima. Infekcija započinje pri osnovi klipa. Plijesan je sivo-smeđe boje. Oštećenja od kukuruznog plamenca u rukavcu klipa su ulazna vrata za ovo oboljenje. Razvoju bolesti pogoduje hladno i vlažno vrijeme tijekom formiranja i nalijevanja zrna. Izaziva problem pri skladištenju kukuruza ako je vlaga 18% i više.

Slika 16. Prikaz truleži.

Izvor: http://poljoprivredaiselo.com/wp-content/uploads/2009/10/diplodia-300x215.jpg

Aspergiloze klipa i truleži zrna karakteristične su za topla i suha područja. Prouzrokuje ih plijesan iz roda *Aspergillu*s (*A. flavus* i *A. parasiticus*). *A. parasiticus* je poznata kao skladišna gljiva ali može uzrokovati i trulež klipa kukuruza u polju. Razvija se na temperaturama i višim od 35% na zrnima čija je vlaga niža od 16%. Infekcija se odvija preko rana od insekata i drugih rana ili preko svile klipa. Ove gljive proizvode vrlo štetne toksine kukuruza, aflatoksine. Lako se identificiraju jer fluoresciraju pod UV-svjetlom i potenciraju na potrebu za test na aflatoksine.

Slika 17. Prikaz aspergiloze klipa kukuruza.

Izvor: http://poljoprivredaiselo.com/wp-content/uploads/2009/10/aspergillus-300x151.jpg

8.1. SUZBIJANJE PLIJESNIVOSTI KLIPOVA I ZRNA KUKURUZA

Za suzbijanje pljesni najbolje je koristiti sve preventivne mjere kako do bolesti ne bi došlo ili da bi se pojavila u što manjoj mjeri. Vrlo je teško djelovati jer je njihov utjecaj jako ovisan od vremenskih uvjeta i ograničenih utjecaja agrotehničkih mjera. Kontrola oboljenja se svodi na poboljšanje berbe (žetve) i skladištenja. Prva mjera prevencije je sjetva otpornih hibrida, ali njihova otpornost varira s obzirom na vrstu hibrida, sortu, liniju i ne postoji potpuna otpornost. Izbor rano zrelih hibrida spada u najefikasnije mjere u našim uvjetima. Sa skidanjem komušine smanjuje se osjetljivost hibrida na giberlioznu trulež klipa. Obavezni su pregledi polja u fazi formiranja i nalijevanja zrna. Žetvu treba obaviti pravovremeno radi sprečavanja rasta i razvoja pljesni. U žetvi se mora oštećenje zrna svesti na što manju moguću mjeru jer su oštećena zrna vrlo osjetljiva i podložna razvoju oboljenja.

Ukoliko je zaraza nastala u polju preporučuje se siliranje cijelih biljaka kukuruza ili zrna, mljevenje klipova, prijevremena žetva, sušenje i konzerviranje preparatima. Prije trajnog skladištenja potrebno je izvršiti čišćenje i sušenje zrna na vlagu ispod 15%, najčešće 13 - 14% vlage zrna ako se planira dugoročno skladištenje. Nakon toga zrno se hladi i pohranjuje u komore silosa ili razna skladišta. Obavezne su aeracije i stalna eleviranja uskladištene robe sa periodičnim provjerama i kontrolama kondenzacije, razvoja plijesni i suzbijanje skladišnih insekata.

9. SUZBIJANJE MIKOTOKSINA

S obzirom da su glavni izvor mikotoksina u prehrambenom lancu ljudi i životinja poljoprivredni proizvodi, tj. žitarice i uljarice te proizvodi životinjskog podrijetla, sprječavanje rasta plijesni kao i tvorbu mikotoksina moguće je postići primjenom niza mjera dobre poljoprivredne prakse, dobre proizvođačke prakse te HACCP načela (Duraković i Duraković, 2000.). Te se mjere mogu podijeliti na: predžetvene (odabir sorti otpornih na plijesni, pravilna gnojidba, suzbijanje korova, pravilan plodored i navodnjavanje), žetvene (tijekom berbe i transporta svesti na minimum mehanička oštećenja zrnja) te posliježetvene (pravilno sušenje i skladištenje te preventivna primjena nekih insekticida, fungicida i konzervansa kao i redovito čišćenje skladišnih prostora.

U slučaju onečišćenja sirovina mikotoksinima, potrebna je primjena ciljanih mjera redukcije tj. dekontaminacije ovisno o mikotoksinu ili grupi mikotoksina. Mora se izabrati metoda koja će učinkovito inaktivirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksin, ne narušavajući pri tom nutritivna i tehnološka svojstva proizvoda i ne stvarajući reaktivne toksične produkte.

Metode redukcije mogu se podijeliti na kemijske, biološke i fizikalne (Kabak i sur., 2006.), a najznačajnija je promjena adsorptivnih tvari.

Od fizikalnih metoda značajna je primjena visokih temperatura, UV, x, i y zraka te mikrovalova. Vezivna sredstva se dodaju kako bi se smanjila bio raspoloživost ovih spojeva kod životinja (hidrirani natrij-kalcij alumosilikat i filosilikati izvedeni iz prirodnih zeolita, bentonita i aktivnog ugljena) no njihova primjena je upitna zbog mogućih štetnih učinaka povezanih s velikom količinom dodanih sredstava, smanjenja minerala i vitamina u prehrani ili onečišćenja teškim metalima i dioksidima.

Kemijske metode obuhvaćaju primjenu različitih kemijskih sredstava poput kiselina, baza, oksidanata, reducirajućih sredstava i formaldehida. Njihova je primjena često neučinkovita i skupa pa se s toga rijetko primjenjuje (O Neill i sur., 1993., Visconti i sur., 1996.).

Primjena bioloških metoda obuhvaća korištenje određenih sojeva bakterija mliječne kiseline, propionskih bakterija i bifidobakterija koje mogu vezati mikotoksine i na taj način ograničiti raspoloživost mikotoksina u tijelu životinja. Na tržištu postoje i pripravci odgovarajućih enzima.

Ipak, najbolja kontrola mikotoksina u lancu proizvodnje hrane podrazumijeva prevenciju njihova nastanka još na polju.

10. ZAKLJUČAK

Mikotoksini su štetni metaboliti nekih vrsta plijesni, a prema literaturnim podatcima zahvaćaju preko 25% ukupnih svjetskih poljoprivrednih usjeva. Mogu se naći u žitaricama i proizvodima na bazi žitarica, mlijeku, mesu i jajima, a u organizam ulaze najčešće putem hrane. Kontaminacija mikotoksinima može rezultirati znatnim ekonomskim gubitcima u stočarskoj proizvodnji, odnosno proizvodnji mesa i mesnih proizvoda, a njihova prisutnost u namirnicama može neizravno negativno utjecati na zdravlje ljudi. Suzbijanje, odnosno zaštita hrane i hrane za životinje od mikotoksina mora se provoditi kroz cijeli prehrambeni lanac „od uzgoja do stola“.

Općenito, mikotoksini imaju hepatotoksično, nefrotoksično, kancerogeno, dermonekrotično, neurotoksično, imunosupresijsko i estrogeno djelovanje. Neki podatci govore o teratogenom i genotoksičnom učinku, iako u literaturi nema dovoljno relevantnih dokaza vezanih uz toksikološke učinke mikotoksina na ljudsko zdravlje. Zbog osjetljivosti pojedinih životinjskih vrsta na mikotoksine može se povući paralela i na ljude, odnosno pretpostaviti da i kod ljudi mogu izazvati slična djelovanja. U potpunosti još nisu razjašnjeni ni sinergistički učinci pojedinih mikotoksina koji se javljaju u prirodi. Budući da pokazuju toksične učinke u ljudi i životinja nužna je laboratorijska kontrola hrane i hrane za životinje primjenom specifičnih i selektivnih analitičkih metoda s ciljem provjere zdravstvene ispravnosti te u konačnici zaštite zdravlja ljudi i životinja.

11. POPIS LITERATURE

Knjiga:

1. Bennet, J. W., Klich, M. (2003.) Mycotoxins. Clinic. Microbio. str. 16, 497-516.
2. Chelkowski (2011.) Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic fungi in food and feed. Woodhead Publishing Limited.
3. Creppy, E. E. (2002.) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Lett., str. 127, 19–28.
4. Domijan, A. M., Peraica, M., Fuchs, R., Lucić, A., Radić, B., Balija, M., Bosanac I., D. Grgićević (1999.) Ochratoxin A in blood of healthy population in Zagreb. Arh. Hig. Rada Toksikol. str. 50, 263-271.
5. Duraković, S., Duraković, L. (2000.) Specijalna mikrobiologija. Durieux. Zagreb. str. 03-58.
6. Hussein, S. H., J. M. Brasel (2001.) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol.
7. Ožegović L., Pepeljnjak S. (1995.) Mikotoksikoze. Školska knjiga.
8. Paul E. Nelson, T. A. Toussoun, W. F. O. Marasas (1983.) Fusarium species: an illustrated manual for identification, Pennsylvania State University Press.
9. Richard, J. L. (2007.)Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. Int. J. Food Microbiol. str. 119, 3–10.
10. Sokolović, M., Šimpraga B., (2008.) T-2 toxin: Incidence and toxicity in poultry. Toksikol. str. 59, 43-52.
11. Šegović Klarić, M., Pepeljnjak S., Cventić, Ž., Kosalec, I. (2008.) Comparison between ELISA TLC/HPLC methods for determination of zearalenon and ochratoxin A in food and feed. str. 50, 235-244.
12. Turner, N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. (2009.) Analytical methods for determination of mycotoxins: A rewiew. Anal. Chem. Acta. str. 632, 168-180.
13. Valpotić, H., Šerman V. (2006.) Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. Krmiva str. 48, 33-42.
14. Withlow, L. W., D. E., Diaz B. A., Hopkins, and W. M. HAGLER (2006.) Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk.
15. World health organization (2000.) Environmental health criteria. Fumonisin B1. Geneva.

Rad u časopisu:

1. Domaćinović, M., Ćosić, J., Klapec, T., Peraica, M., Mitak, M. (2012.) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje. Hrvatska agencija za hranu.
2. Perši, N., Pleadin, J., Vulić, A., Zadravec, M., Mitak, M. (2011.) Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. Hrvatski veterinarski instut, Zagreb.
3. Šarić, G., Milaković, Z., Krstanović, V. (2011.) Toksičnost *Fusarium* toksina. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.

Jedinica s interneta:

1. Domaćinović, M. Mikotoksini u krmivima i krmnim smjesama. 20.02.2013. http://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/ . 01.06.2016.
2. Jukić, I. Fuzarioze kukuruza i djelovanje fuzarioznih mikotoksina u hranidbi domaćih životinja. 10.10.2014. http://www.savjetodavna.hr/savjeti/14/576/fuzarioze-kukuruza-i-djelovanje-fuzarioznih-mikotoksina-u-hranidbi-domacih-zivotinja/ 25.05.2016.
3. Mikotoksini u mlijeku. mycotoxins-milk-safety-potential-t199/p0.htm 18.03.2011.

12. SAŽETAK

Žitarice na polju i tijekom skladištenja izložene su različitim vrstama plijesni, što za posljedicu može imati kontaminaciju mikotoksinima. Mikotoksini su štetni metaboliti nekih vrsta plijesni, a prema literaturnim podatcima zahvaćaju preko 25% ukupnih svjetskih poljoprivrednih usjeva. Kontaminacija mikotoksinima može rezultirati znatnim ekonomskim gubitcima u stočarskoj proizvodnji, a njihova prisutnost u namirnicama može neizravno negativno utjecati na zdravlje ljudi. Najvažnijim mikotoksinima hrane za životinje smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova Aspergillus, Penicillium i Fusarium. Suzbijanje, odnosno zaštita hrane i hrane za životinje od mikotoksina mora se provoditi kroz cijeli prehrambeni lanac „od uzgoja do stola“. Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da mikotoksini učestalo kontaminiraju žitarice, te je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivredi.

Ključne riječi: mikotoksini, stočna hrana, patogene gljive, simptomi, kontrola.

13. SUMMARY

Cereals are natually eksposed to different species of fungi both in the field and during storage, which may result in mycotoxin contamination of cereal grains. Mycotoxins are secondary metabolites produced by moulds and, according to literature data, they affect over 25% of the world's agricultural crops. Mycotoxins contamination can result in significant economic losses in livestock production, and their presence in foods may indirectly and adversely affect human health. The most important mycotoxins in feed are considered to be aflatoxins, trichothecenes, fumonisins, zearalenone and ochratoxin A, which are most frequently synthesized by Aspergillus , Penicillium, Rhizopus and Fusarium mold species. Policing and protection of food and feed of mycotoxins should be implemented through the food chain "from the stable to the table". Long-term research in Croatia indicates that mycotoxins frequently contaminate cereals, and systematic control of mycotoxins in food and feed is necessary in order to avoid negative effects on health, as well as economic losses in agriculture.

Key words: mycotoxins, forage, pathogenic fungi, symptoms, control.

14. POPIS TABLICA

Tablica 1. Glavne toksinogene vrste plijesni i njihovi glavni mikotoksini (str. 2.)

15. POPIS SLIKA

Slika 1. Put mikotoksina u hranidbenom lancu (str. 5.)

Slika 2. Struktura zearalenona (str. 7.)

Slika 3. Struktura T-2 toksina (str. 9.)

Slika 4. Struktura deoksinivalenola (str. 10.)

Slika 5. Struktura fumonizina B1 (str. 12.)

Slika 6. Aflatoksini – metaboliti plijesni (str. 13.)

Slika 7. Struktura aflatoksina B1 (str. 15.)

Slika 8. Kolonije vrste *Aspergillus ochraceu.*(str. 17.)

Slika 9. Struktura okratoksina A (str. 18.)

Slika 10. Struktura citrinina (str. 20.)

Slika 11. Uređaj ELISA - određivanje mikotoksina (orijentacioni test) (str. 21.)

Slika 12. Uređaj MS/MS HPLC - određivanje mikotoksina (uređaj visoke točnosti) (str. 22.)

Slika 13. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama mikotoksina u žitaricama (hrana za životinje) (str. 23.)

Slika 14. Prikaz plijesni (str. 24.)

Slika 15. Prikaz plijesni. (str. 25.)

Slika 16. Prikaz truleži (str. 25.)

Slika 17. Prikaz aspergiloze klipa kukuruza (str. 26.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Završni rad

Određivanje mikotoksina u stočnoj hrani – kukuruz u zrnu
Determination of mycotoxins in animal feed – maize in the grain
Ivančica Furlan

Sažetak:

Žitarice na polju i tijekom skladištenja izložene su različitim vrstama plijesni, što za posljedicu može imati kontaminaciju mikotoksinima. Mikotoksini su štetni metaboliti nekih vrsta plijesni, a prema literaturnim podatcima zahvaćaju preko 25% ukupnih svjetskih poljoprivrednih usjeva. Kontaminacija mikotoksinima može rezultirati znatnim ekonomskim gubitcima u stočarskoj proizvodnji, a njihova prisutnost u namirnicama može neizravno negativno utjecati na zdravlje ljudi. Najvažnijim mikotoksinima hrane za životinje smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Suzbijanje, odnosno zaštita hrane i hrane za životinje od mikotoksina mora se provoditi kroz cijeli prehrambeni lanac „od uzgoja do stola“. Višegodišnja istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da mikotoksini učestalo kontaminiraju žitarice, te je sustavna kontrola mikotoksina u hrani i hrani za životinje neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kao i ekonomski gubici u poljoprivredi.

Ključne riječi: mikotoksini, stočna hrana, patogene gljive, simptomi, kontrola.

Summary:

Cereals are natually eksposed to different species of fungi both in the field and during storage, which may result in mycotoxin contamination of cereal grains. Mycotoxins are secondary metabolites produced by moulds and, according to literature data, they affect over 25% of the world’s agricultural crops. Mycotoxins contamination can result in significant economic losses in livestock production, and their presence in foods may indirectly and adversely affect human health. The most important mycotoxins in feed are considered to be aflatoxins, trichothecenes, fumonisins, zearalenone and ochratoxin A, which are most frequently synthesized by *Aspergillus* , *Penicillium*, *Rhizopus* and *Fusarium* mold species. Policing and protection of food and feed of mycotoxins should be implemented through the food chain “from the stable to the table”. Long-term research in Croatia indicates that mycotoxins frequently contaminate cereals, and systematic control of mycotoxins in food and feed is necessary in order to avoid negative effects on health, as well as economic losses in agriculture.

Key words: mycotoxins, forage, pathogenic fungi, symptoms, control.

Datum obrane: