Kontaminacija zrna kukuruza aflatoksinima u 2015. godini

Ninković, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:916956

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Martina Ninković, apsolvent
Diplomski studij: Bilinogojstvo
Smjer Zaštita bilja

KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA AFLATOKSINIMA U 2015. GODINI

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Martina Ninković, apsolvent
Diplomski studij: Bilinogojstvo
Smjer Zaštita bilja

KONTAMINACIJA ZRNA KUKURUZA AFLATOKSINIMA U 2015. GODINI

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv.prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, mentor
3.Prof.dr.sc. Mirjana Brmež, član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED LITERATURE 3
   2.1. Mikotoksini 3
      2.1.1. Otkrivanje mikotoksina 4
   2.2. Aflatoksini 5
      2.2.1. Aflatoksin B1 5
      2.2.2. Aflatoksikoze 6
   2.3. Aspergilioza klipa 7
      2.3.1. Zaraza kukuruza s *Aspergillus* sp. 8
      2.3.2. Prevencija ili smanjenje aflatoksina u kukuruzu 9
   2.4. Određivanje aflatoksina 11
   2.5. Skladištenje 12
   2.6. Zakonodavstvo u europskoj uniji 16
3. MATERIJALI I METODE 17
4. REZULTATI 21
5. RASPRAVA 26
6. ZAKLJUČAK 27
7. POPIS LITERATURE 28
8. SAŽETAK 32
9. SUMMARY 33
10. POPIS TABLICA 34
11. POPIS SLIKA 35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 36

BASIC DOCUMENTATION CARD 37

1. UVOD

Mikotoksini u kukuruzu će nastati kada neka od gljivica koje uzrokuju plijesni napadnu klip kukuruza. Plijesni proizvode mikotoksine u određenim uvjetima temperature i vlage. Ne uzrokuju svi uzročnici plijesni mikotoksine no oni ne mogu biti prisutni u kukuruzu bez prisustva plijesni.

Mikotoksini koji najviše zabrinjavaju su aflatoksin, deoksinivalenol (DON ili vomitoksin), fumonizini, okratoksin, zeralenon i T-2 toksins. T-2 toksin je opasan i zabrinjavajući jer ima najsnažnije djelovanje, no manje je učestao nego li neki drugi mikotoksini ka na primjer DON. Postoje jedinstvene okolnosti kada su mikotoksini prisutni u kukuruzu i bez vidljivih simptoma prisustva uzročnika plijesni. To pokazuje tretiranje s propioničnom kiselinom koja uklanja plijesan, ali mikotoksini su i dalje prisutni jer su oni vrlo stabilne kemijske tvari. No, bez ikakve dvojbe mikotoksini neće postojati na kukuruzu, ukoliko tu već ne raste ili je narasla gljiva koje uzročnik plijesni.

Nastanak plijesni uvijek uzrokuju mikroorganizmi pod nazivom gljivice, one se pričvršćuju na tlo te uzrokuju truljenje organske tvari i biljaka poput kukuruza. Stotine tisuća plijesni je indetificirano, no samo nekoliko njih uzrokuju zdravstvene probleme kod ljudi ili stoke. Gljive su parazitske, što znači da ovise o drugim živim bićima, od kojih crpe nutrijente. One su vrlo rasprostranjene, mogu biti poželjni i nepoželjni organizmi.

Sve gore navedeno služi kao pozadina za mikotoksine te kao preporuka za praktično rukovođenje uzgajivača kukuruza, proizvođača svinjskog mesa, veterinara, nutricionista i slično.

Plijesniprisutnena kukuruzu od posebne su važnosti jer mogu umanjiti kvalitetu zrna kukuruza time što produciraju različite mikotoksine koji negativno utječu na zdravlje i opće stanje konzumenata među kojima su i domaće životinje. Uzročnici plijesniparazitiraju i stabljiku kukuruza no to nije od izravne važnosti za prehranu svinja. Plijesan će se vrlo vjerojatno pronaći na kukuruzu gdje je minimalna obrada zemlje u usporedbi s onom gdje imamo uključenu svu agrotehniku.

Ne proizvode sve plijesni toksine, netoksične plijesni ne moraju biti štetne za svinje, ali one izazivaju slabiji smanjenje uroda, lošiju kvalitetu zrna, prije svega umanjuju nutritivne

vrijednosti. Kukuruz koji plijesni nisu zarazileu polju može biti zaražen tijekom skladištenja zrna te se rast plijesni. Rast uzročnika plijesni i produkcija mikotoksina prije svega su povezani s povišenomvlagom zrna te je sušenje zrna ključan postupak u sprečavanju rasta uzročnika plijesni kod uskladištenog zrna. Ipak, suhi kukuruz može se zaraziti u skladištima ukoliko uvjeti vlage i temperaturenisuadekvatni za skladištenje. U proljeće, kada su promjene temperature i vlage česte može se potaknuti razvoj uzročnika plijesni osobitoukoliko dođe do kondenzacije vlage u skladištima. Upravo iz tog razloga, spremnici se redovito moraju čistiti, uklanjati ostatci prethodnih kultura i pregledavati kako ne bi došlo do zagrijavanja i u konačnici do nastanka plijesni.

Najznačajniji uzročni plijesni klipa kukuruza*Diplodia zeae, Gibberella zeae, Gibberella fujikuroi, Gibberella subglutinans, Aspergillus* i *Penicillium* vrste.

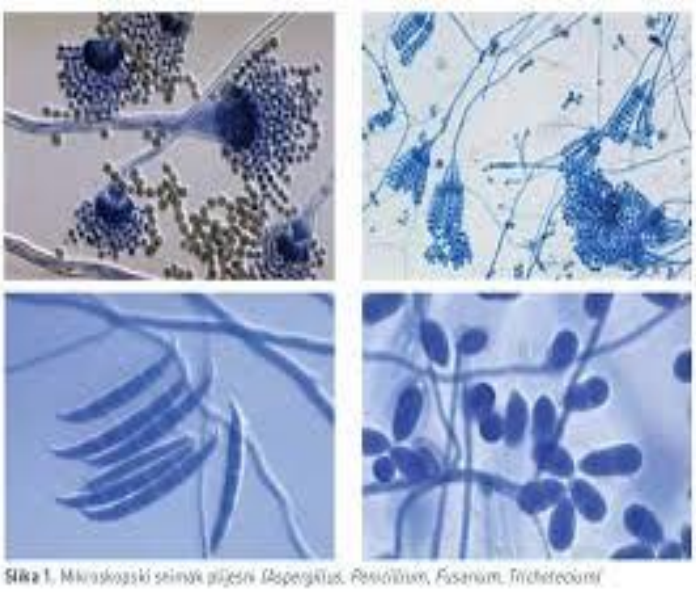
Cilj ovoga rada bio je utvrditi kontaminacijuaflatoksinima zrna kukuruza i silaže iz vegetacijske godine 2015.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Mikotoksini

Mikotoksini se nalaze u hrani biljnog i životinjskog podrijetla. To su sekundarni metaboliti gljiva (slika 1). Primarna kontaminacija, odnosno kontaminacija mikotoksinima u hrani biljnog podrijetla, posljedica je rasta uzročnika plijesni na voću, povrću, žitaricama, a s druge strane u hrani životinjskog podrijetla, mlijeku, mesu, jajima, nalaze se rezidue mikotoksina zbog hranjenja zaraženom odnosno kontaminiranom hranom. Ne postoji nikakva jedinstvena metoda da bi uklonili mikotoksine, a već i postojeće metode poskupljuju proizvodnju hrane i krmiva te je s obzirom na takvu situaciju, najbolja prevencija od nastanka mikotoksina. (Peraica i sur., 2002.). Razvoj plijesni i produkcija mikotoksina je moguća u gotovo svim agroklimatskim područjima, osobito u tropskim, jer je takva klima najpovoljnija za razvoj uzročnika plijensi. U povijesti čovječanstva, bolesti koje su bile uzrokovane mikotoksinima nazvane su mikotoksikoze te su u povijesti imale utjecaj na demografske promjene, ratovete izazivale seobe stanovništva (Peraica i Rašić, 2012.). U razvijenim zemljama mikotoksikoze su rijetke. A uzrok tome je napredak agrotehničkih mjera te dobra kontrola namirnica biljnog i životinjskog podrijetla koje dolaze na tržište. Nikakvim se preventivnim mjerama ne može u potpunosti spriječiti zaraza hrane mikotoksinima, pa su ljudi i životinje konstantno izložene zarazi, odnosno njihovom djelovanju. Osim toksičnog djelovanja mogu imati i genotoksično, imunotoksično i kancerogeno djelovanje. (Domijan i Peraica, 2010.). Na pokusnim životinjama dokazano je da se takvi učinci mikotoksina mogu odraziti i nakon izloženosti njihovim niskim koncentracijama, znanstvenici i agencije su usmjerili pažnju na istraživanje učinka i mehanizma toksičnog učinka niskih koncentracija mikotoksina (Milićević i sur., 2010.).

Mikotoksini iligrupe mikotoksina koje daju proizvođačima razlog za zabrinutost su: aflatoksini, deoksinivalenol (DON ili vomitoksin), fumonizini, zeralenon, T-2 toksin i okratoksin. *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) proizvodi dvadesetak vrsta mikotoksina od kojih su najznačajniji deoksinivalenol, zeralenon i T-2 toksin. Najznačajniji producenti fumonizina su*Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum*. Uzorci zaraženog kukuruza i drugih biljnih vrsta koje ove gljive parazitirajučesto sadrže više od jednog toksina. Različiti mikotoksini u konačnici različito djeluju na konzumente te je iz tog razloga važno identificirati prisutne mikotoksine.



Slika 1. Gljive producenti mikotoksina

Izvor: http://veterina.com.hr/?p=18652(02.05. 2016.)

2.1.1. Otkrivanje mikotoksina

Kod detekcije mikotoksina postoji mnogo prepreka, dio polja može biti jako zaražen dok je drugi dio polja čist te će pri uzimanju uzoraka iz čistog dijela polja rezultati pokazivati da nema zaraze, a zapravo postoji prisutnost mikotoksina. Stoga je pravilno uzimanje uzoraka od velike važnosti te primijeniti najpouzdanije procedure koje će pouzdano pokazati ima li mikotoksina ili nema, pa čak i kad je kontaminacija vrlo niska. Uzimanje uzoraka iz jednog ispitivača je gubljenje vremena osim ako nije cijela masa kukuruza podjednako kontaminirana.

Moguća su dva načina uzimanja uzoraka.Prvi zahtijeva sondu za zrno pomoću koje se uzima uzorak kukuruza s raznih mjesta iz cijele mase. Druga opcija za koju se ujedno smatra da je i najbolja, podrazumijeva uzimanje uzoraka iz mase kukuruza prilikom samog istovara. U ovom slučaju tokom cijelog istovara mora biti netko prisutan i nadgledatipostupak te se u različitim fazama istovarapostavlja mali spremnik i drži se direktno na mlazu kukuruza koji koji se istovara. (PatienceiEnsley, 2010.).

2.2. Aflatoksini

Aflatoksini se opisuju kao najtoksičniji mikotoksini. Tvore ih sojevi plijesni roda *Aspergillus*, a temperatura pogodna za njihov rast je od 26 do 38° C te sadržaj vlage supstrata veći od 18%. Najbolji producenti aflatoksina su *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* koji mikotoksine sintetiziraju tijekom žetve, skladištenja, prerade žitarica, ali i tijekom vegetacije u polju.Sintetiziranje mikotoksina se u polju odvija pri temperaturama od 24 do 35° C i vlažnosti supstrata na kojem se gljiva razvija iznad 7%, dok u ventiliranom prostoru vlaga supstrata treba biti iznad 10% (Williams i sur., 2004.). *Aspergillus flavus* sintetizira aflatoksine B1, B2, G1 i G2 kod uljarica koje se skladište (Diener i Davis, 1996., Valpotić i Šerman, 2006.). Aflatoksini su vidljivi u UV- spektru pri duljini od 365 nm kao prirodni fluorescirajući spojevi. Imena aflatoksina B i G upravo to i objašnjavaju, odnosno na taj način su dobili ime B za plavu (blue) i G za zelenu (green)fluorescenciju (Prasanna i sur., 1975.). Termostabilni su i u prirodnom stanju vežu se uz proteine koji ih štite od nepovoljnih vanjskih utjecaja (Kiermeier i Hemmerich, 1974., Marth i Dole, 1979.). Topljivi su u organskim otapalima, fotosenzibilni su u slobodnom stanju, osjetljivi su na kisele i alkalne otopine, a u vodi se gotovo ne tope (Mann i sur., 1967.).

2.2.1. Aflatoksin B1

Od svih aflatoksina najčešće se po važnosti izdvaja aflatoksin B1 jer je on najtoksičniji (AFB1) (Domijan i Peraica, 2010.). Organ na koji AFB1 toksično djeluje je jetra, a promjene ovise o dozi, uzgoju, vrsti životinje i dužini izloženosti. Trovanja s visokim dozama mogudovesti i do smrtnosti, a subletalne doze uzrokovat će kronično otrovanje.Kronična izloženost niskim dozama dovodi do razvoja malignih bolesti i to najčešće karcinoma jetre. Međunarodna agencija za istraživanje karcinomaističe da ima puno dokaza da su aflatoksini iz prirodnih izvora karcinogeni te ih je uvrstila u prvu skupinu karcinogena.

Nepovoljno djelovanje aflatoksina najviše je izraženo kod peradi, a nakon toga kod svinja, no osim njih na aflatoksine osjetljive su i ribekod kojih dolazi do slabog zgrušavanja krvi, slabe im škrge, opada tjelesna masa i slično. AFB1 aktiviraju monooksigenaze koje ovise o citokromu P450 pri čemu nastaju hidroksilirani derivati te visoko reaktivni egzo-epoksid

koji veže DNA pri čemu uvijek nastaju AFB1-DNA-adukti (Guengerich, 2003.). Količina AFB1-DNA-adukata najveća je u jetri za razliku od drugih organa te je u odnosu s dozom kao i s osjetljivošću pokusne ili domaće životinje na hepatokarcinogenezu (Hengstler i sur., 1999.). Kod ljudi koji su koristili kontaminiranu hranu, akutna aflatoksikoza manifestira se kao gubitak apetita, slabost i povraćanje. Epidemija aflatoksikoze 1974. godine u ruralnim područjima Indije bila je uzrokovana kontaminacijom kukuruza, a kod ljudi su se javili simptomi žutice, kratkih febrilnihrazdoblja, povraćanja i anoreksije (Krishnamachari i sur., 1975., Tandon i sur., 1977.). Ukoliko se radilo o blažim slučajevima oporavak je bio potpun, dok sukod težih slučajeva brzo nastali ascites i edemi donjih udova. Kod jakog krvarenja iz probavnog sustava smrt je nastupala u vrlo kratkom vremenu, a smrtnost je prema različitim autorima bila između 10 i 29% (Krishnamachari i sur., 1975., Tandon i sur., 1977., Bhat i Krishnamachari 1977.). Velika su bila oštećenja jetre, značajan je zastoj žuči i difuzno oštećenje parenhima. Ovakvi simptomi bili su prisutni kod 20 pacijenata u Keniji 1981. godine od kojih je 12 umrlo (Ngindu i sur., 1982.). Godine 2004. na istom tom području tijekom epidemije oboljelo je 317 ljudi, a 125 njih umrlo (CDC 2004.). Najčešći peti karcinom na svijetu je primarni karcinom jetre, u 75-90% slučajeva se radi o hepatocelularnom karcinomu čija je skraćenica HCC (McGlyn i London, 2005.). U Kini, Africi i Aziji pronađena je povezanost incidencije HCC-a s izloženošću aflatoksinom B1 (Kensler i Groopman, 1997.).

Aflatoksini B1 i B2 metaboliziraju se u aflatoksine M1 i M2 kod sisavaca i to u mliječnim žlijezdama (Knežević, 2007; Diener i Davis, 1996; Valpotić i Šerman, 2006.). Bez obzira što se tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka smanji količina AFM1 ono može narušiti zdravlje ljudi, ponajprije djece jer oni najviše konzumiraju mlijeko te mliječne proizvode (Cavaliere i sur., 2006.).

2.2.2. Aflatoksikoze

Nakon što se aflatoksin unese u organizam ljudi ili životinja dolazi do razvoja niza bolesti, a posljedice ovise o unesenoj količini toksina kao i o starosti, imunološkom sustavu

te zdravstvenom stanju onoga koji je koristio kontaminiranu hranu. Sve bolesti koje su prouzrokovane aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze. Intoksikacija aflatoksinima se dijeli u dvije grupe: kronična intoksikacija te akutna intoksikacija koja dovodi do oštećenja jetre, a nerijetko i do pojave tumora i smrti.

Najčešći početni simptomi nakon unosa aflatoksina su slabost, pad imuniteta, povišena temperatura. Ukoliko se radi o unosu manjih količina aflatoksina, ali u dužem vremenskom periodu može doći do niza poremećaja imunološkog sistema te do poremećaja u prometu hranjivih stvari. Ako dođe do unosa većih količina, svi navedeni simptomi se pojačavaju te se javljajujaki bolovi u predjelu abdomena, povraćanje, žutica, hepatitis i slično. Bez obzira na to o kojem se organizmu radi, jetra je najosjteljivija na aflatoksin (Williams i sur., 2004.).

2.3. Aspergilioza klipa

Aspergiliozu klipa (slika 2) uzrokuju dvije vrste gljivica: *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. One uzrokuju truljenje klipa, ali njihova prisutnost ne znači nužno da su kontaminirani aflatoksinom.*A. flavus* se pojavljuje kao žuto-zelena plijesan, a*A. parasiticus* kao sivo-zelena plijesan, a obje izgledaju na prvi pogled praškasto. Pojavljuju se u vrlo vrućim godinama. Najveća vjerojatnost da će doći do zaraze je kad se optimalni uvjeti za zarazu pojave pri formiranju klipa i nastanku svile te ukoliko postoji šteta koju su uzrokovali insekti te šteta koja je nastala sušom ili ranim mrazom.

Aspergilioza klipa često ima za posljedicukontaminaciju aflatoksinima koji su štetni za ljude i životinje. Utječu na nepovoljan rast i razvoj stoke, peradi, svinja, ribe i drugih životinja. Bolesti jetre te pojava određenih tumora (karcinoma) povezani su s prehranom koji sadrže aflatoksin. Visoke doze aflatoksina mogu biti smrtonosne kod mladih svinja, skotnih krmača, teladi te mlade peradi. Aflatoksini se osim u kukuruzu pojavljuju i u kikirikiju, sjemenkama pamuka i njihovim prerađenim proizvodima, a rijetko su prisutni u pšenici, zobi, riži i soji.

Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) ustanovila je „razine aktivnosti“ izmjerene u ppb (parts per bilion – milijarditi dio), za aflatoksin u životinjskoj hrani ili hrani za ljudske potrebe. Ovo su izmjerene razine:

- 300 ppb za kukuruz namijenjen tovu goveda i za stočnu hranu (od sjemenki pamuka) namijenjen peradi, svinjama ili govedu;
- 200 ppb za kukuruz namijenjen za tov svinja od 50 kg i više;
- 100 ppb za kukuruz namijenjen uzgoju godeda, svinja ili odrasle peradi;
- 20 ppb za kukuruz namijenjen za hranu ljudima, nezrelim životinjama te životinjama koje daju mliječne proizvode i
- 20 ppb za životinjsku hranu osim kukuruza

Količina produciranog aflatoksina u kukuruzu ovisi o temperaturi i vlažnosti supstrata. Visoke temperature oko 32° C ipovišeni udio vlažnosti zrna 15% (18% optimalno), nedostatak dušika i štete koje su uzrokovali insekti značajno povećavaju mogućnost zaraze *Aspergillus* vrstama. Sušenjem kukuruza na 14% vlažnosti, pa čak i manje, potaknut će daljni rast plijesni, ali i proizvodnju toksina.



Slika 2. Aspergilioza klipa

Izvor: http://www.telegraf.rs/vesti/555513-aflatoksin-od-kukuruza-do-trpeze-gde-je-opasnost(02.05.2016.)

2.3.1. Zaraza kukuruza s *Aspergillus* sp.

Aspergillus vrste prezimljavaju na biljnim ostatcim, gnojivu i zemlji. Spore *Aspergillus*vrstaprenose se zrakom te njihov broj ovisi o sezoni. Broj spora u velikom slučaju raste tijekom berbe, obrade tla te se može povećati kod kukuruza na sušnom tlu. Zaraza nastaje kroz kukuruznu svilu, gljivice koloniziraju klip od vrha prema bazi. Nakon što svila odumre, gljivice ubrzano rastu osobito pri visokim temperaturama.

Čimbenici koji utječu na zarazu s *Aspergillus*vrstama su insekti, stres, neadekvatna agrotehnička priprema. Ukoliko su postojali neadekvatni uvjeti, dolazi do razvoja i razmnožavanja *Aspergillus* plijesni i sinteze aflatoksina, a to se može odvijati na polju, kod žetve, skladištenja, transporta i prerade kukuruza. (Bankole i Adebanjo, 2003.). Razvoj *A. flavus* može se podijeliti u dvije faze, prva faza obuhvaća kolonizaciju biljnih ostataka u zemljištu, a druga infekciju dijelova sjemena i biljke u razvoju. U proljeće, micelij se nalazi na površini tla te se vrlo brzo formiraju nove konidije koje se vjetrom i insektima prenose na posijani kukuruz. U periodu rasta kukuruza, zaraženi dijelovi su izvor sekundarnihzaraza (Horn i Dorner, 1998.). Insekti pridonose jačoj zarazi *Aspergillus* vrstama, a time i potencijalno jačoj kontaminaciji kukuruza aflatoksinima. Najčešćese na kukuruzu nalazi kukuruzni moljac*Ostrinia nubilalis* (Widstrom, 1996.).Povišene temperature i smanjena količina padalinauvjet su jače pojave plijesni i sinteze aflatoksina u kukuruzu (Payne, 1998). U sušnim područjima biljka gubi vodu koja joj je neophodna za razne procese. Nedostatak vode dovodi do stresa, čime se smanjuje prirodna obrana odnosno otpornost biljke te se povećava vjerojatnost pojave plijesni i sinteza aflatoksina (Gosal i sur., 2009; Guevara-Gonzalez i sur 2001.). Ukoliko postoje povoljni uvjeti za dalji razvoj *Aspergillus*vrsta, do daljnjeg razvitka plijesni može doći i tokom žetve te skladištenja kukuruza. Ponajprije treba poštovati dobru poljoprivrednu praksu koja se odnosi na korištenje tolerantnih hibrida kukuruza(Bhatnagar, 2010.). Pri skladištenju treba biti vrlo oprezan kako ne bi tijekom skladištenja došlo do zaraze.

Pojava *Aspergillus* plijesni i aflatoksina u kukuruzu utječu na smanjen prinos i kvalitetu što dovodi do velikih ekonomskih gubitaka.

2.3.2. Prevencija ili smanjenje aflatoksina u kukuruzu

Realan plan, odnosno cilj je svesti na minimum infekciju *Aspergillus* vrstama prije berbe te smanjiti rast gljivica poslije berbe opreznim rukovanjem i u konačnici skladištenjem.

Obzirom da gljivice vrše zarazu na oštećenim i slomljenim zrnima preporučuje se smanjenje stresa i oštećenje zrna, a to podrazumijeva:

- raniju sadnju kako bi se izbjegao stres koji uzrokuje suša i izbjegla šteta koju uzrokuju insekti. Kukuruz bi se trebao sijati kada je jutarnja temperatura tla oko 12,8 °C na dubini od 5 cm. Ponekad je moguće da se pojavi mraz nakon sadnje no kukuruz ga preživi uz vrlo mala ili gotovo nikakvaoštećenja
- pravilno navodnjavanje kako bi se izbjegao stres uzrokovan sušom, u svijetu postoje kompjuterizirani programi planiranog navodnjavanja te ručni program provjere za planiranje navodnjavanja
- sijati hibride prilagođene podneblju
- kontrolirati populaciju kukaca koji se hrane stabljikom i klipovima
- birati povoljna polja, odnosno izbjegavati „iscrpljena“ tla, pogotovo ona koja su izložena suši
- miješanje čistog i pljesnivog zrna u istu prikolicu se ne preporučuje, najbolje odvojiti čisto zrno od onoga za koje se sumnja da je zaraženo
- brati kukuruz čija je vlaga između 14 i 19%.

Ukoliko se radi o kukuruzu s velikim postotkom vlage koji se može brzo osušiti, berba na rizičnim poljima trebala bi se obavljati ranije, prije nego li bude 18% vlažnost. Ovako dolazi do manjeg oštećenja zrna, a samim tim se smanjuju „otvorena“ mjesta za zarazu.

Smanjiti štetu tijekom berbe i kombajniranja možemo:

- korištenjem mehanizacije za žetvuukoliko je dostupna
- zamijeniti istrošena svrdla za zrno
- podesiti protok zraka na kombajnu tako da se odstrane strani materijali iz mase kukuruza. Ukoliko se odvajaju strani materijaliod zrna eliminira se još jedan izvor vlage
- postaviti dobro postavke kombajna, preporučene od strane proizvođača kako bi se dobio čist uzorak.

Sitni otpad eliminira se sitom dok se zrno prazni iz teretnog prostora kamiona koji ga odvozi s polja. Ako je sitni otpad zaražen *Aspergillus* vrstama treba ga zapaliti ili zakopati,

a nikako se ne bi trebao koristiti kao stočna hrana. Detaljno treba očistiti berač (kombajn), spremnike zrna, kamione te pokretne trake nakon uporabe.

2.4. Određivanje aflatoksina

Za određivanje aflatoksina potrebne su vrlo precizne i osjetljive tehnike, s obzirom na to da se u proizvodima nalaze u vrlo niskim koncentracijama. Postoje različite tehnike u okviru kojih su razvijene razne metode za utvrđivanje prisutnosti aflatoksina. Najčešće se primjenjuje analiza na HPLC-u. Međutim, pored HPLC-a vrlo često koristi se i ELISA test(imunoenzimatske metode) kao i kombinirana tehnika tekuće kromatografije s masenom spektrometrijom. Prije se upotrebljavala tankoslojna kromatografija odnosno TLC koja je zbog loših rezultatapotpuno zanemarena. Osim ovih navedenih tehnika, za brzu analizu aflatoksina, prije skladištenja u velike silose koriste se brzi testovi, koji se temelje na imunokromatografskim principima (Reiter i sur.,2009.). ELISA tehnika se najviše koristi kod određivanja AFM1 u mlijeku i mliječnim proizvodima, no sada se sve više upotrebljavaju i HPLC-FLD, LC-MS/MS tehnike (Shephard i sur., 2012; Shephard i sur., 2013.).

Prednosti TLC tehnike su da je jednostavna, jeftina, vrlo osjetljiva na aflatoksine, a nedostatci su lošija preciznost te adekvatno razdvajanje zahtijeva dvodimenzionalnu analizu. Prednosti ELISA testa su da je oprema jeftina, dosta je dobra osjetljivost, ograničena je upotreba organskih otapala, vizualna ocjena, a nedostatci su mogući lažni pozitivni ili negativni rezultat, polukvantitativna je, moguća je reakcija s vezanim mikotoksinima. Kod HPLC metodeprednosti su vrlo dobra osjetljivost, selektivnost, ponovljivost, kratko vrijeme analize, dostupne su opće prihvaćene metode, a nedostatci su vrlo skupa oprema, a osoblje koje radi na takvom stroju mora biti visoko obrazovano. Prednost LC/MS tehnike je dobra osjetljivost, a nedostaci su joj isti kao kod HPLC tehnike. Kod brzih testova prednosti su da su vrlo jeftini, jednostavni, brzi, mogu se upotrijebiti bilo gdje, a nedostatci su kvalitativnost, mogući lažni pozitivni ili negativni rezultati te moguća reakcija s vezanim mikotoksinima. Faze koje treba provesti u toku analize za određivanje aflatoksina su uzorkovanje, ekstrakcija, pročišćavanje, koncentriranje, razdvajanje, detekcija, konfirmacija, kvantifikacija i validacija (Scudamore, 2005.). Kod suvremene detekcije aflatoksina potreban je optimalan balans da se upotrebljavaju što suvremenije tehnike i metode, ali uz

minimalnu upotrebu štetnih otapala, skupih kemikalija, što kraći vremenski period analize te da se dobije što točniji i pouzdaniji rezultat (Kralj Cigić i Prosen, 2009., Shephard i sur., 2012.).

2.5. Skladištenje

Većina problema vezana za aflatoksine pojavljuje se tijekom skladištenja zrna, koje počinje u trenutku kada zrno uđe u spremnik na kombajnu. U tom trenutku, kvaliteta zrna je najbolja moguća. Prvi cilj, ukoliko želimo zadržati kvalitetu zrna je odrediti vlažnost zrna, količinu nečistoća u masi zrna, stupanj oštećenja te najbolji način iskorištavanja postrojenja. Zrno koje je napuknuto ili ima puno nečistoća, podložno je zarazi te ga je vrlo teško osušiti zbog smanjenog protoka zraka. Opna kukuruznog zrna pruža zaštitu od napada raznih štetnih organizama, insekata i plijesni te zbog toga sa zrnom treba pažljivo postupati kako se mehaničkim putem ne bi oštetila opna odnosno ljuska zrna. Trebalo bi izbjegavati pregrijavanje ili previše brzo sušenje jer ono dovodi do pucanja. Protok zraka kroz masu zrna pomaže u izbjegavanju prirodnog procesa zagrijavanja koje se pojavljuje kod bilo kojeg materijala visoke vlažnosti. Od velike je važnosti ne držati zrno na polju u bilo kojem vremenskom periodu kako bi se izbjeglo oštećenje uzrokovano vrućinom i nastajanje plijesni. Ako je moguće transportirati zrno na područje sušenja i skladištenja neposredno nakon berbe i početi s protokom zraka kroz zrno kako bi se započeo proces sušenja. Idealno bi bilo zrno premjestiti i početi ga sušiti šest sati nakon berbe. Ako odgađamo 24 sata, može doći do problema, koji uključuju pojačanu infekciju*Aspergillus* vrstama i proizvodnju aflatoksina. Relativna vlaga zraka, vlažnost zrna i temperatura igraju značajnu ulogu u razvoju aflatoksina na kukuruzu, a to su temperature između 27 i 37° C, relativna vlaga zraka 85 do 100% i vlažnost zrna 18%. Ako se relativna vlaga može smanjiti kretanjem zraka, odmah se i vlažnost zrna smanjuje, a time i potencijalni nastanak plijesni. Razvoj gljivica se zaustavlja kada je temperatura ispod 12° C i vlažnost zrna 12% ili manje, ali se znatno smanjuje kod vlažnosti 15 % .

Odnos između vlažnosti uskladištenog zrna te relativne vlage zraka uvelike utječe na rast plijesni i kvarenje zrna. Udio vlažnosti već uskladištenog zrna određuje relativnu vlagu zraka u prostoru u kojem je uskladišteno. Visoka vlažnost zrna uzrokuje povećanje relativne vlage zraka koja okružuje zrno. Infekcija uzročnicima plijesni vrlo brzo raste kada zrak ima visoku

relativnu vlagu, a značajno sporije pri niskoj relativnoj vlazi. Kada se zrno uskladišti s niskim udjelom vlažnosti, zrak zadržan u ukupnoj količini zrna ima nisku relativnu vlagu.

Izolirani džep vlažnog zrna potiče nastanak plijesni, pojavu insekata koji se mogu dalje širiti i na suha zrna. Velike količine uskladištenog vlažnog zrna zajedno sa suhim zrnom ograničavaju vrijeme skladištenja za kompletan tovar na vrijeme skladištenja koje je potrebno za ono najvlažnije zrno. Mnoga su istraživanja pokazala da i kad se pažljivo miješaju vlažna i suha zrna i vlažnost ima dovoljno prostora da se ujednači, može ipak ostati oscilacija vlažnosti od 2 % među zrnima. Ukoliko se zrno nedovoljno i nestručno izmiješa dolazi do velikih razlika u vlažnosti. Džepovi odnosno nakupine zrna velike vlage mogu biti rezultat dodavanja vlažnog tovara na suho zrno, pa čak i kad je već izmiješano. Velika količinaneorganskih primjesa nakuplja se jako često ispod vreće za punjenje, a zeleni otpad često se nakupi blizu zidova skladišta. Bilo kakva pukotina na skladištu isto tako uzrokuje džepove velike vlažnosti zrna. Najčešći uzrok nastanka džepova velike vlažnosti zrna u skladištenju je migracija vlage. U središnjem južnom dijelu gdje je obično toplo prilikom berbe odmah je zrno i uskladišteno. Obzirom na to da je zrno dobar toplinski izolator, ono ostaje toplo sve dok nije ohlađeno aeracijom. Kod hladnijih sezona, zrak uz zidove skladišta se hladi te se stvaraju konvektivne struje unutar silosa. Topli zrak u središtu zrnene mase se diže i upija vlagu zbog svog velikog kapaciteta prijenosa vlage. Taj zrak dosegne hladnija zrna u središnjem dijelu na površini zrnene mase, hladi se i ispušta svoju vlagu koju zatim upija zrno. Migracija vlage uzrokuje džep zrna s povišenom vlažnošću na površini zrnene mase u središnjem djelu. U zimi ovaj proces može uzrokavati džep od 18 do 20 % vlage u skladištu u kojem je vlaga bila isprva 14% pa čak i manje. U proljeće kada temperature porastu, vlažna zrna mogu proklijati te uzrokovati nastanak plijesni koja velikom brzinom napada zrno. Migracija vlage može se spriječiti aeracijom. Aeracija tijekom suhih, svježijih dana ujednačava temperaturu unutar uskladištenih zrna i sprječava kovektivne struje.

Insekti koji napadaju uskladišteno zrno su jako osjetljivi na temperaturu. Njihov razvoj i reprodukcija su smanjeni pri temperaturama nižim od 21°C, a potpuno im prestaje razvoj i reprodukcija na temperaturi od 10°C. Skladištenje zrna mora biti u spremnicima otpornim na najezde glodavaca. Kontrola insekata i glodavaca se provodi održavanjem silosa i spremnika čistim od zrna, otpada i vegetacije. Premještanje zrna iz jednog skladišta u drugi je metoda koju često koriste poljoprivrednici kako bi spriječili ili zaustavili pregrijavanje i kvarenje. Istraživanjima se došlo do zaključka da takvo premještanje ne dovodi do značajnog smanjenja temperature ili udjela prosječne vlage u spremniku sa zrnom. Premještanje zrna

bi se trebalo koristiti kao posljednju mogućnost za spašavanje zrna od kvarenja, a aeracija je puno učinkovitija mjera za održavanje kvalitete zrna, a pretjerano rukovanje, premještanje samo povećava mogućnost za nastanak oštećenja zrna.

„Toplo mjesto“ kod uskladištenog zrna ukazuje na rast i razvoj plijesni. Ovo je uzrok nakupina odnosno džepova vlažnosti ili nakupine sitnog materijala koje ograničava protok zraka i areaciju. Mjerenjem temperature kod uskladištenog zrna mogu se otkriti takva „topla mjesta“ prije nego li dođe do nekakve ozbiljnije štete. Očitavanje temperature može se provoditi s pomoću sonde koja sadrži očitavajuće komponente, ručke sonde i metra. Ukoliko se utvrdi postojanje „toplog mjesta“ potrebno je napraviti nekoliko provjera kako bi se utvrdila veličina tog „toplog mjesta“ te isto ohladiti aeracijom što je prije moguće. Ukoliko je toplo mjesto nastalo radi sitnog materijala koji ograničava aeraciju, potrebno je „razlomiti“ to toplo mjesto uklanjanjem zrna s dna spremnika i vraćanjem tog zrna na vrh.

Kako bi odredili prosječnu vlagu zrna, potrebno je uzeti tri uzorka, jedan na vrhu, jedan u blizini središta i jedan u blizini dna, a za to su potrebni otvori na zidovima spremnika ili sonda za ispitivanje. Uzorke koji se neće ispitivati treba zadržati u hermetičkim posudama. Za držanje uzorka najbolje su metalne posude, staklenke s hermetičkim poklopcima ili plastične vrećice. Ne bi se smjelo ispitivati hladno zrno u toploj prostoriji, tanki sloj vlage bi se mogao kondenzirati na zrnima i uzrokovati pogrešno očitavanje ili pustiti zrno da se zagrije u zatvorenom spremniku ili koristiti ispitivač u nezagrijanoj prostoriji. Neki od električnih ispitivača vlage zahtijevaju korekciju temperature pa u tom slučaju precizno mjerenje temperature je zagarantirano.

Najčešće sušenje se provodi na četiri načina, a to su prirodni zrak ili niska temperatura. Ukoliko je početna vlažnost zrna iznad 20% treba sušiti usipnim košem ili pri visokoj temperaturi, ako je početna vlažnost zrna ispod 20% sušenje se odvija u slojevima u posudama s toplinom kao suplementacijom kako bi se smanjila relativna vlaga nadolazećeg zraka na 50 do 55% ili sušenje pri visokim temperaturama, a ako je početna vlažnost ispod 16% sušenje se odvija prirodnim zrakom kada to dopuštaju klimatski uvjeti, a areacija po potrebi.

Što se tiče opreme treba koristiti ventilatore odgovarajuće veličine kako bi se omogućio adekvatan protok zraka kroz zrno. Povećavanjem dubine zrna u spremniku, potreban je i veći ventilator zbog dodatne snage koja je potrebna za tok zraka kroz zrnenu masu. Veće razine vlage zahtijevaju više zraka za postizanje zadovoljavajuće razine sušenja. Tijekom

noći relativna vlaga se povećava i toplina je potrebna da se dalje nastavi sušenje, sušenje u slojevima je jako sporo bez obzira na 24-satno sušenje. Potrebno je konstantno provjeravati vlagu zraka. Ukoliko je poznata temperatura zraka i relativna vlaga, može se odrediti uravnoteženost razine vlage u zraku. Ako je veća vlažnost zrna od razine vlage uravnoteženosti, sušenje počinje kada zrak krene teći kroz zrno. Brzina sušenja određuje se prema razlici između ovih razina vlage i količine proteklog zraka, ukoliko je zrak suši i volumen proteklog zraka kroz zrno veći to će i proces sušenja biti brži. Spremnici zrna trebali bi imati odgovarajući ispuh zraka na krovu kako bi se izbjeglo gušenje ventilatora. Potrebno je raditi raslojavanje zrna prilikom punjenja spremnika, koristiti distributer zrna kao pomoć u raslojavanju zrna i jednako rasporediti sitni materijal po čitavoj površini svakog sloja, ne smije se dopustiti sitnom materijalu iz jezgre da dospije u središte spremnika. Ako je uravnoteženost razine vlage sušećeg zraka ispod razine vlažnosti zrna, proces sušenja se treba nastaviti sve dok površinski sloj se ne osuši do 13%, potrebno je ventilirati po potrebi tijekom velikih promjena vlage kako bi bili sigurni da se donji sloj zrna neće ponovno navlažiti.

Ponekad dolazi do toga da kukuruz može biti kontaminiran aflatoksinima u razini kada ga potpuno eliminaraju iz normalnih prodavačkih kanala. Ukoliko dođe do toga da se cijeli tovar odbije zbog jačine kontaminacije, poljoprivrednici i drugi korisnici imaju druge opcije. Miješanje zrna zaraženog aflatoksinima s nezaraženim je protuzakonito. Propionska kiselina, izobutrična kiselina i ostale organske kiseline sprječavaju rast *Aspergillus* vrsta, no one neće smanjiti količinu aflatoksina u zrnu koje je kontaminirano prije tretiranja. Ovi materijali su vrlo korozivni te ih se ne bi trebalo koristitiu metalnim spremnicima osim ako taj metal nije zaštićen. Fumigacija kukuruza može se obaviti i bezvodnim amonijakom, on je također učinkovit način detoksikacije kukuruza koji se u protivnom ne bi mogao koristiti kao stočna hrana, ali taj proces oduzima mnogo vremena i opasan je za one koji rukuju s amonijakom. Prilikom svakog korištenja bezvodnog amonijaka kompletan sustav cijevi treba biti u skladu sa standardima O.S.H.A (Agencija za sigurnost i zdravlje na radu) te je obavezna zaštita očiju. Aktivna glina, hidrirani kalcij ili aluminosilikat mogu se dodati hrani za životinje koja je prethodno zaražena aflatoksinom kako bi se smanjili toksični učinci aflatoksina kod svinja, peradi i stoke. Smatra se da su ovi proizvodi troškovno najučinkovitija metoda korištenja zaraženog zrna kao stočne hrane.

Kada se pojave zrna kontaminirana plijesnima, postoje opcije koje će smanjiti daljnji rast uzročnika plijesni i proizvodnju mikotoksina. Polja treba pregledavati tijekom vegetacije te

ponovo prije žetve. Ukoliko se otkrije da postoji zaraženost uzročnicima plijesni, uzorke treba testirati, koristeći se brzim testnim kompletima na polju radi otkrivanja prisutnosti mikotoksina. Neke od testova, temeljenih na imuno enzimskim testovima može provesti sam proizvođač na polju, no potrebna je edukacija. Iako većina takvih testova zahtjeva posebni čitač za rezultate neke tvrtke nude proceduru sa štapićem za umakanje te se mogu vidjeti odmah rezultati. Na zaraženim poljima treba napraviti raniju berbu te što prije osušiti zrno, kako bi se smanjilo nakupljanje aflatoksina. Čisti kukuruz može se skladišti na 16 do 17% vlažnosti tijekom zime, no pljesnivi kukuruz mora se odmah osušiti na 15% kako bi se spriječio daljnji rast uzročnika plijesni. U proljeće kada dođe toplije vrijeme kukuruz se mora sušiti na maksimalno 13%.

Potrebno je ukloniti sitni materijal iz kukuruza jer oštećena zrna su 3 do 4 puta više podložna rastu plijesni.

2.6. Zakonodavstvo u europskoj uniji

Nakon otkrića aflatoksina 60-tih godina u mnogim zemljama svijeta stupili su na snagu propisi kojima se žele zaštititi potrošači. Gospodarski čimbenici imaju utjecaj na definiranje graničnih razina AFB1 propisani zakonom u svakoj državi (FAO/WHO, 2008.). Europska unija za razliku od drugih dijelova svijeta ima najtemeljitije razrađene propise koji definiraju NDK za AFB1 u hrani za ljude te hrani za životinje (tablica 1).

Tablica 1. Općenito sigurne najveće dopuštene količine AFB1 u hrani i hrani za životinje (Uredba Komisije 1881/2006 i 165/2010; Direktiva Komisije 2003/100/EC)

Izvor: file:///C:/Users/Martina/Downloads/Pleadin_i_sur%20(4).pdf (02.05. 2016.)

Hrana / hrana za životinje	**AFB1 (µg/kg)**
Hrana namijenjena prehrani ljudi Kukuruz i žitarice kao krmiva u proizvodnji hrane za životinje	20
Kukuruz i žitarice za uzgoj rasplodne junadi svinja i peradi	100

Kukuruz i žitarice za ishranu svinja	200
Kukuruz i žitarice za uzgoj tovne junadi, svinja i peradi	300

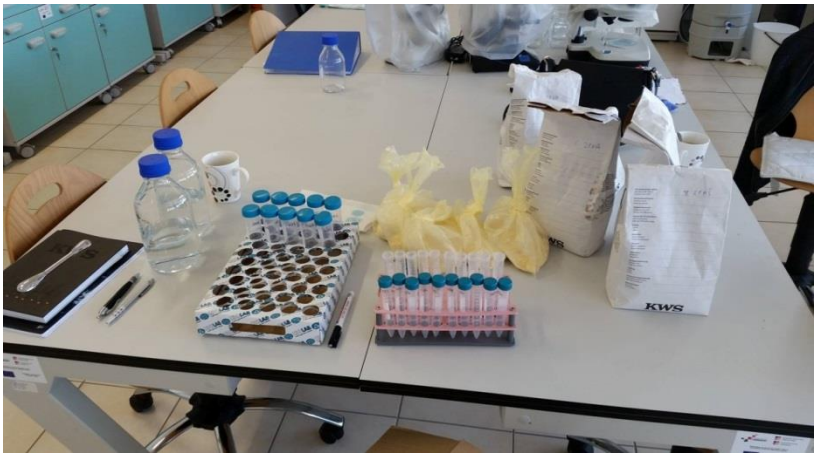
Time se osigurava ujednačenost kriterija koja nadležna tijela diljem EU primjenjuju pri uzorkovanju proizvoda te poštivanje određenih metodoloških kriterija kao što su iskorištenje i preciznost analitičke metode koja se primjenjuje u njihovom određivanju NDK za aflatoksine u hrani, uključujući posebno razinu AFB1 te ukupnu razinu aflatoksina.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na uzorcima zrna kukuruza i silaži iz vegetacijske godine 2015., a analiza uzoraka obavljena je tijekom prošle i ove godine. Analiza je obavljena na HPLC uređaju u BioTech laboratorijuu Slavonskom Brodu. Analiza je obavljena na aflatoksinima B1, B2, G1, G2, od toga uzoraka kukuruza u zrnu bilo je 200, a silažnog kukuruza 50 uzoraka.

Prikaz analize uzoraka:

- Meljava uzorka (silaža ili kukuruz u zrnu)(slika 3)



Slika 3. Prikaz pripremljenog mljevenog kukuruza za odvagu

Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.)

- Odvaga 5 g uzorka te se dodaje 50 ml u kivetu(slika 4)



Slika4. Prikaz odvage uzorka

Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.)

- Dodavanje 25 ml u 80% MeOH

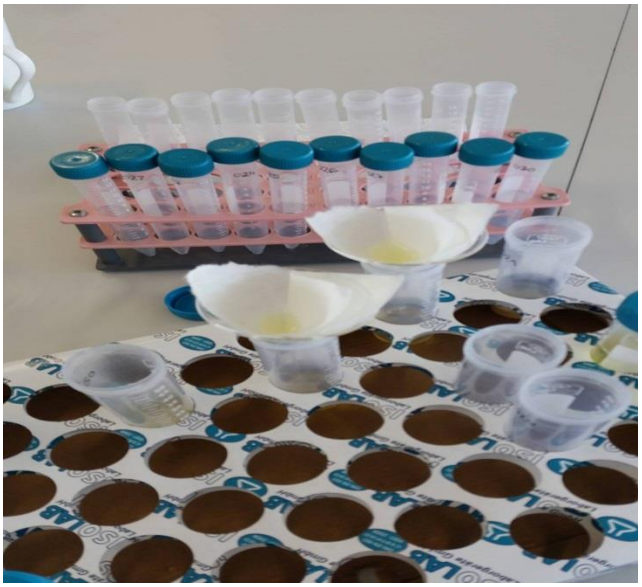
- 5 min u vortexu da se dobro promiješa(slika 5)



Slika5. Prikaz promješanog uzorka u MeOH

Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.)

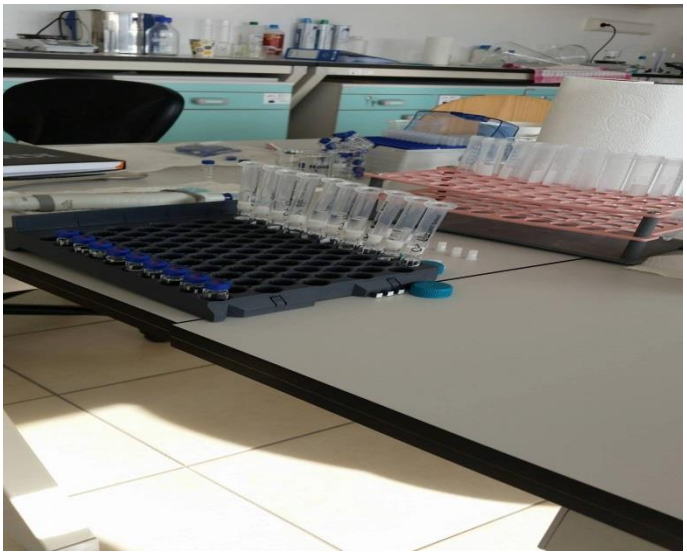
- Profiltrirati kroz filter papir(slika 6)



Slika 6. Prikaz propuštanja uzorka kroz filter papir

Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.)

- 3,5 ml ekstrakta dodati u 21,5 ml PBS pufera (7,2 pH)
- Profiltrirati 0,45 µ sqrugl filter
- 10 ml ekstrakta propustiti kroz Alfa Clean select column (slika 7)



Slika 7.Afla clean select column

Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.)

- Ispiranje s 10 ml H_2O
- Isprazniti svu vodu iz kolone
- Eulirati s 2 ml MeOH
- 1 ml MeOH držati 5 min pa ponovo 1 ml MeOH
- Eulat staviti u vialu zatim u HPLC

4. REZULTATI

Moje istraživanje vršilo se na HPLC uređaju (slika 8.)što je čest način ispitivanja uzoraka zrna kukuruza i kukuruzne silaže na prisutnost aflatoksina. Najčešće se prvo jednostavnim metodama utvrdi prisutnost aflatoksina, a ukoliko je aflatoksin prisutan uzorci idu u HPLC uređaj kojimse točno odredi u kojoj količini je uzorak kontaminiran aflatoksinima.Princip rada uređaja prikazan je na slici 9.

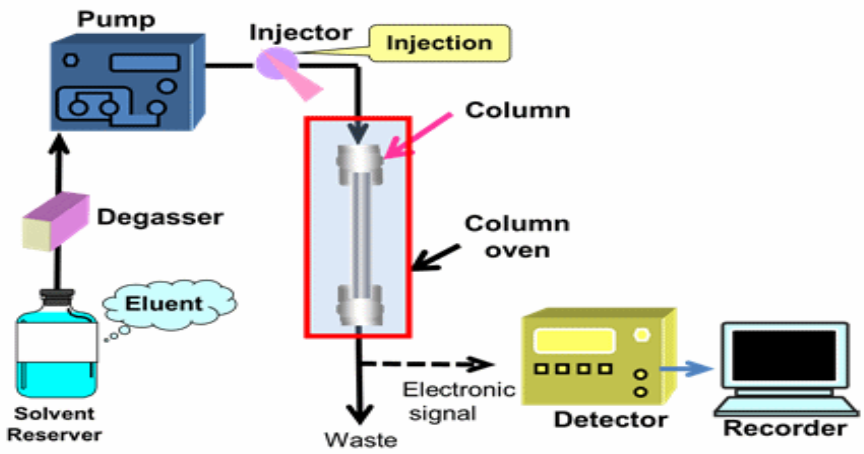


Slika 8. HPLC uređaj

Izvor:

https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti

(02.05.2016.)

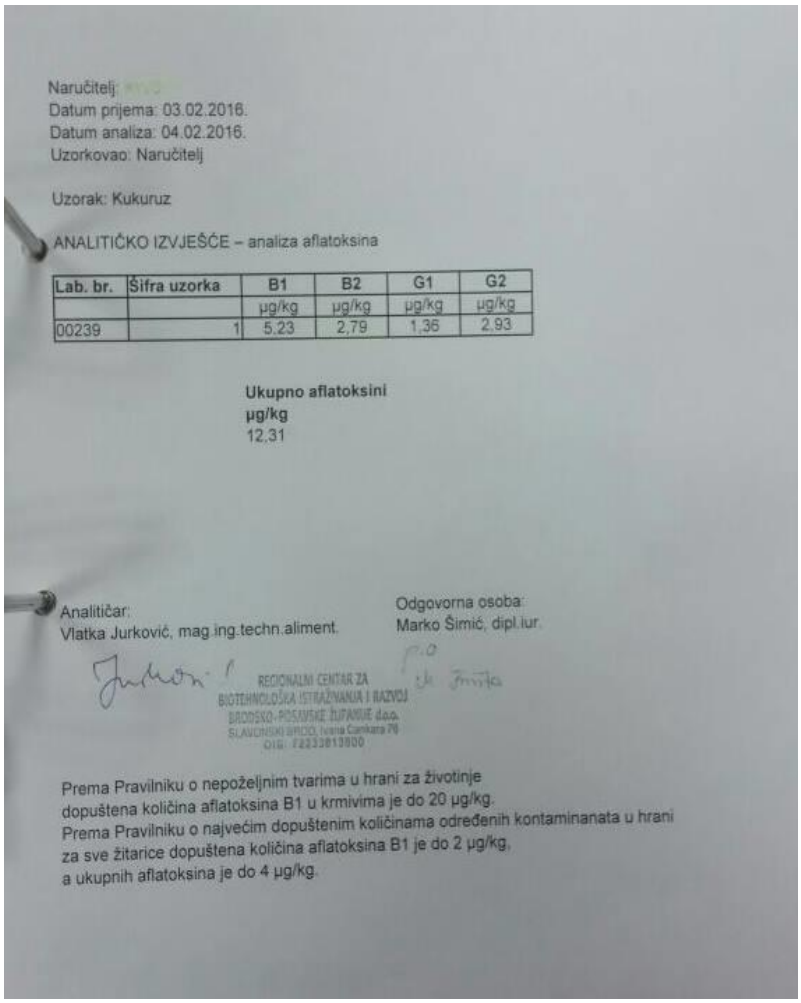


Slika 9. Prikaz rada HPLC uređaja

Izvor: http://shodexhplc.com/lessons/lesson-1-introduction-to-hplc/

(02.05.2016.)

Provedenim istraživanjima kontaminacije zrna kukuruza i silažeu niti jednom uzorku nije utvrđena nedopuštena količina aflatoksina. U uzorcima u kojima je utvrđena prisutnost aflatoksinakoličina je bilaispod maksimalno dozvoljene granice. Analiza je rađena na 200 uzoraka zrna kukuruza i 50 uzoraka silažnog kukuruza. Od ukupno 200 uzoraka zrna kukuruza, u 35 jeutvrđeno prisustvo aflatoksina, no niti u jednom uzorku količina nije bila iznad dopuštenih granica. Ispis nalazagdje je utvrđeno prisustvo aflatoksina(slika 11) pokazuje da je u uzorku utvrđeno B1 5,23 µg/kg, B2 2,79 µg/kg, G1 1,36 µg/kg te G2 2,93µg/kg, što je sve ukupno 12, 31µg /kg, a dopušteno je 20 µg/kg.Na slici 12 prikazan je ispis nalaza za uzorak u kojem nije utvrđena prisutnost aflatoksina. U niti jednom uzorku silaže nije utvđena prisutnost aflatoksina.



Naručitelj:
Datum prijema: 03.02.2016.
Datum analiza: 04.02.2016.
Uzorkovao: Naručitelj

Uzorak: Kukuruz

ANALITIČKO IZVJEŠĆE – analiza aflatoksina

Lab. br.	Šifra uzorka	B1	B2	G1	G2
		µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
00239	1	5.23	2,79	1,36	2,93

Ukupno aflatoksini
µg/kg
12,31

Analitičar:
Vlatka Jurković, mag.ing.techn.aliment.

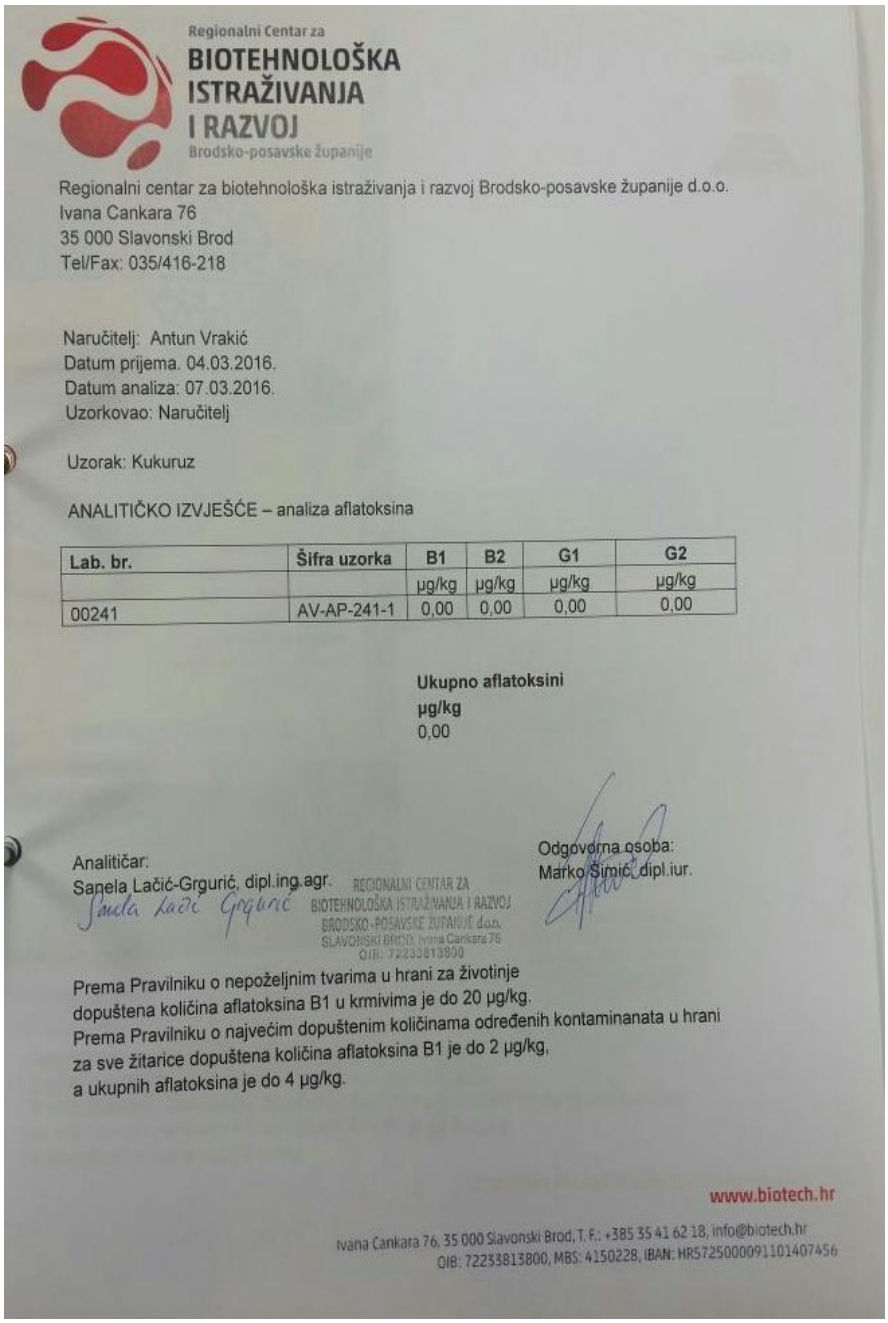
Odgovorna osoba:
Marko Šimić, dipl.iur.

REGIONALNI CENTAR ZA BIOTEHNOLOŠKA ISTRAŽIVANJA I RAZVOJ BRODSKO-POSAVSKE ŽUPANIJE d.o.o.
SLAVONSKI BROD, Ivana Cankara 76
OIB: 72233813800

Prema Pravilniku o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje
dopuštena količina aflatoksina B1 u krmivima je do 20 µg/kg.
Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani
za sve žitarice dopuštena količina aflatoksina B1 je do 2 µg/kg,
a ukupnih aflatoksina je do 4 µg/kg.

Slika 10. Nalaz analize (HPLC) na aflatoksine

Izvor: Ninković Martina (04.02.2016.)



Regionalni Centar za
BIOTEHNOLOŠKA ISTRAŽIVANJA I RAZVOJ
Brodsko-posavske županije

Regionalni centar za biotehnološka istraživanja i razvoj Brodsko-posavske županije d.o.o.
Ivana Cankara 76
35 000 Slavonski Brod
Tel/Fax: 035/416-218

Naručitelj: Antun Vrakić
Datum prijema. 04.03.2016.
Datum analiza: 07.03.2016.
Uzorkovao: Naručitelj

Uzorak: Kukuruz

ANALITIČKO IZVJEŠĆE – analiza aflatoksina

Lab. br.	Šifra uzorka	B1	B2	G1	G2
		µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
00241	AV-AP-241-1	0,00	0,00	0,00	0,00

Ukupno aflatoksini
µg/kg
0,00

Analitičar:
Sanela Lačić-Grgurić, dipl.ing.agr.

REGIONALNI CENTAR ZA BIOTEHNOLOŠKA ISTRAŽIVANJA I RAZVOJ BRODSKO-POSAVSKE ŽUPANIJE d.o.o. SLAVONSKI BROD, Ivana Cankara 76 OIB: 72233813800

Odgovorna osoba:
Marko Šimić, dipl.iur.

Prema Pravilniku o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje dopuštena količina aflatoksina B1 u krmivima je do 20 µg/kg.
Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani za sve žitarice dopuštena količina aflatoksina B1 je do 2 µg/kg, a ukupnih aflatoksina je do 4 µg/kg.

www.biotech.hr

Ivana Cankara 76, 35 000 Slavonski Brod, T. F.: +385 35 41 62 18, info@biotech.hr
OIB: 72233813800, MBS: 4150228, IBAN: HR5725000091101407456

Slika 11. Nalaz analize (HPLC) na aflatoksine

Izvor: Ninković Martina (07.03.2016.)

5. RASPRAVA

Najvažniji i najčešći mikotoksini koji kontaminiraju stočnu hranu, uključujući i zrno kukuruza i kukurznu silažu,su aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i ohratoksin A, a njihovi producenti sugljive iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*(Huwig i sur., 2001.). Sinteza svih mikotoksina, pa tako i aflatoksina, pod značajnim je utjecajem okolinskih čimbenika. Zaraza biljaka kao i rast i razvoj patogena u biljkamateprodukcija mikotoksina ovise o temperaturi okoline, aktivitetu vode, relativnoj vlazi zraka i vlazi tla, pH sredine, prisustvu ili odsustvu kisika, prisustvu ili odsustvu kompetitora, sposobnosti izolata gljive za sintezu mikotoksina, količini zaraznog potencijala, ishrani biljaka, prisustvu ili odsustvu štetnika i primjeni fungicida te međusobnoj interakciji svih navedenih čimbenika.Za rast *Aspergillus* vrsta koje sintetiziraju aflatoksine pogodne su temperature temperature između 26 i 38 °C i sadržaj vlage u supstratu veći od 18 %.Optimalna vrijednost aktiviteta vode za sintezu aflatoksina je između 0,95 i 0,99 (Faraj i sur. 1991.).

Vegetacijska godina 2015. bila je ekstremno vruća i većim dijelom sušna te smatramo da je to jedan od razloga vrlo slabog razvoja *Aspergillus* vrsta, a time i kontaminacije aflatoksinima.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanje kontaminacije zrna kukuruza i kukuruzne silaže aflatoksinima je provedeno 2015. godine u laboratoriju Biotech u Slavonskom Brodu na HPLC uređaju. U niti jednom uzorkunisu utvrđene nedopuštene količine aflatoksina.

Količina sintetiziranog aflatoksina ovisi o nizu čimbenika kao što su temperatura zraka, količine oborina i vlaga zraka, količina inokuluma i slično. S obzirom da je vegetacijska godina 2015. bila ekstremno vruća i većim dijelom sušna zaključujemo da je to jedan od razloga vrlo slabog razvoja *Aspergillus* vrsta na kukuruzu, a time i slabe kontaminacije aflatoksinima.

Aflatoksini su jedni od najtoksičniji mikotoksini. Tvore ih sojevi plijesni roda Aspergillus, a temperatura pogodna za njihov rast je od 26 do 38° C te sadržaj vlage supstrata veći od 18 %. Aflatoksini vidljivi su UV- spektru pri duljini od 365 nm kao prirodni fluorescirajući spojevi, termostabilni su, topljivi su u organskim otapalima, vrlo su osjetljivi su na kisele i alkalne otopine, a u vodi se gotovo ne tope.

7. POPIS LITERATURE

1. Bankole, S. A., Adebanjo, A. (2003.): Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling. African Journal of Biotechnology, 2(9):254-263.
2. Bhat R.V., Krishnamachari K.A.V.R. (1977.): Follow-up study of aflatoxic hepatitis in parts of western India. Indian J Med Res., 66:55-58.
3. Bhatnagar, D. (2010.): Elimination of postharvest and preharvest aflatoxins contamination. 10th International working conference on stored product protection, Section: Microbiology, mycotoxins and food safety, 425, Estoril, Portugal.
4. Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A. (2006.): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determing aflatoxin M1 in cow milk - Comparation between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. Journal of Chromatography, 1101:69–78.
5. Diener, U., Davis, N. (1996.): Aflatoxin production by isolates of Aspergillus flavus. Phytopathology, 56:390-393.
8. Domijan, A.M., Peraica, M. (2010.): Carcinogenic mycotoxins. U: C. A. McQueen (ur.), Comprehensive toxicology,14:125-137. Oxford: Academic Press.
9. FAO/WHO (2008.): Animal Feed Impact on Food Safety;Report of the FAO/WHO Animal Expert Meeting. FAO Headquarters,Food and agriculture organization of the unitednations, Rome.
10. Faraj, M. K., Smith, J. E., Harran, G. (1991.): Interaction of water activity and temperature on aflatoxin production by Aspergillus flavus and A. parasiticus in irradiated maize seeds. Food Additives and Contaminants, 8(6):731-736.
11. Gosal, S., S., Wani, S., H., Kang, M., S. (2009.): Biotechnology and Drought Tolerance. Journal of Crop Improvement, 23:19-54.
12. Guengerich, F.P. (2003.): Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. Arch Biochem Biophys, 409:59-71.
13. Guevara-González, R., G., Chapa-Oliver, A., M., Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., Vazquez-Cruz, M., A., Cervantes-Landaverde, J., J., Preciado-Ortiz, R., E., Moreno-Martinez, E. (2011.): Aflatoxins –Biochemistry and Molecular Biology. In TechEurope, Rijeka, Croatia.

14. Hengstler, J.G., van der Burg, B., Steinberg, P., Oesch F. (1999.): Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. Drug Metabol Rew., 31:917-970.
15. Horn, B., W., Dorner, J., W. (1998.): Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect trough peanut-growing regions of the United States. Mycologia, 90: 767–776.
16. Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H. (2001.): Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters, 122: 179-188.
17. International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002): Aflatoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 82:171–300. IARC, Lyon, France.
18. Kensler, T.W., Groopman, J.D. (1997.): Caracinogen mycotoxins. U: Bowden GT, Fischer SM (eds.) Comprehensive Toxicology. Elsevier Vol. 12, Chap. 12, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens,201-223.
19. Kiermeier, F., Hemmerich, K. (1974.): Influence of light on watery aflatoxin B1 solutions. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 155: 81-84
20. Knežević, Z. (2007.): Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima. Hrvatski časopis za javno zdravstvo, 9 (3).
21. Kralj Cigić, I., Prosen, H. (2009.): An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. International Journal of Molecular Science, 10: 62-115.
22. Krishnamachari, K.A.V.R., Bhat, R.V., Nagarajan, V., Tilak, T.B.G. (1975.): Hepatitis due to aflatoxicosis. Lancet, 1061-1063.
23. Mann, G., Coifer, L., Dollear, F. (1967.): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. J. Agric. Food Chem, 15:1090-1092.
24. Marth, E., Dole, M. (1979.): Update on molds: degradation of aflatoxin. Food tehnol., 33:81-87.
25. Milićević, D.R., Škrinjar, M., Baltić, T. (2010.): Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. Toxins, 2:572-592.
26. Ngindu, A., Johnson, B.K., Kenya, P.R., Ngira, J.A., Ocheng, D.M., Nandwa, H., Omondi, T.N., Jansen, A.J., Ngare, W., Kaviti, J.N., Gatei, D., Siongok, T.A.

(1982.): Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. Lancet, 1346-1348.

27. Patience, J., Ensley, S. (2010.): Mycotoxin Contamination of Corn. Iowa State University.
28. Payne, G., A. (1998.): Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. U: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, Ur. Sinha K., K., S., Bhatnagar, D., Marcel Dekker, Inc., New York.
29. Peraica, M., Domijan, A.M., Jurjević, Ž., Cvjetković, B. (2002.): Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed., Arhiv Hig Rada Toksikol., 53:229-237.
30. Peraica, M, Rašić, D. (2012.): The impact of mycotoxicoses on human history. Arh Hig Rada Toksikol., 63:511-516.
31. Prasanna, H., Gupta, S., Viswanathan, L., Venkitasubramanian, T. (1975.): Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 159:319-322.
32. Reiter, E., Zentek, J., Razzazi, E. (2009.): Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. Molecular Nutrition and Food Research, 53:508-524.
33. Scudamore, K., A. (2005.): The mycotoxin blue book. Nottingham University Press, United Kingdom.
34. Shephard, G., S., Berthiller, F., Burdaspal, P., A., Crews, C., Jonker, M., A., Krska R., MacDonald, S. (2012.).: Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011. World Mycotoxin Journal., 5(1):3-30.
35. Shephard, G., S., Berthiller, F., Burdaspal, P., A., Crews, C., Jonker, M., A., Krska, R., Lattanzio, V., M., T. (2013.): Developments in mycotoxin analysis: an update for 2011-2012. World Mycotoxin Journal, 6(1):3-30.
36. Tandon, B.N., Krishnamurthy, L., Koshy, A., Tandon, H.D., Ramallingaswani, V., Bhandari, J.R., Mathur, M.M., Mathur, P.D. (1977.): Study of an epidemic of jaundice, presumably due to toxic hepatitis, in Northwest India. Gastroenterology, 72:488-494.

37. Valpotić, H., Šerman, V. (2006.): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. Krmiva, 48:33-42.

38. Widstrom, N., W. (1996.): Advances in Agronomy.U D. Sparks (Ed.). The aflatoxin problem with corn grain,219-280. Academic Press, New York, USA.

39. Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C., Aggarwal, D. (2004.): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr., 80:1106-1122.

8. SAŽETAK

Istraživanje kontaminacije zrna kukuruza i kukuruzne silaže aflatoksinima je provedeno 2015. godine u laboratoriju Biotech u Slavonskom Brodu na HPLC uređaju. U niti jednom uzorku nisu utvrđene nedopuštene količine aflatoksina.

Količina sintetiziranog aflatoksina ovisi o nizu čimbenika kao što su temperatura zraka, količine oborina i vlaga zraka, količina inokuluma i slično. S obzirom da je vegetacijska godina 2015. bila ekstremno vruća i većim dijelom sušna zaključujemo da je to jedan od razloga vrlo slabog razvoja Aspergillus vrsta na kukuruzu, a time i slabe kontaminacije aflatoksinima.

Aflatoksini su jedni od najtoksičniji mikotoksini. Tvore ih sojevi plijesni roda *Aspergillus*, a temperatura pogodna za njihov rast je od 26 do 38°C te sadržaj vlage supstrata veći od 18 %. Aflatoksini vidljivi su UV- spektru pri duljini od 365 nm kao prirodni fluorescirajući spojevi. Termostabilni su, topljivi su u organskim otapalima, vrlo su osjetljivi su na kisele i alkalne otopine, a u vodi se gotovo ne tope.

Ključne riječi: aflatoksini, mikotoksini, *Aspergillus* sp.

9. SUMMARY

The research about contamination of maize grain and corn silage aflatoxin was conducted in 2015. at biotech laboratory in Slavonski Brod, using the HPLC device. None of the samples showed no undue amounts of aflatoxin.

The amount of synthesized aflatoxin depends on many factors such as air temperature, the amount of rainfall and humidity, the amount of inoculum etc. Since the vegetation year 2015. was extremely hot and mostly dry I can conclude that this is one of the reasons of the poor development of Aspergillus type on corn, and thereby low aflatoxin contamination.

Aflatoxins are one of the most toxic mycotoxins. Formed by mold strains of the genus *Aspergillus*, a temperature suitable for their growth is from 26 to 38 ° C, and substrate humidity greater than 18%. Aflatoxins are visible to UV spectrum at a length of 365 nm as a natural fluorescent compounds. They are thermostable, soluble in organic solvents, very sensitive to acidic and alkaline solutions, and in water they almost don`t melt.

Key words: Aflatoxins, mycotoxins, *Aspergillus* sp.

10.POPIS TABLICA

Tablica 1.Općenito sigurne najveće dopuštene količine AFB1 u hrani i hrani za životinje (Uredba Komisije 1881/2006 i 165/2010; Direktiva Komisije 2003/100/EC)
Izvor: file:///C:/Users/Martina/Downloads/Pleadin_i_sur%20(4).pdf (02.05. 2016.)
(str. 17)

11.POPIS SLIKA

Slika 1. Gljive producenti mikotoksinaIzvor: http://veterina.com.hr/?p=18652(02.05. 2016.) str. 4

Slika 2. Aspergilioza klipa Izvor: http://www.telegraf.rs/vesti/555513-aflatoksin-od-kukuruza-do-trpeze-gde-je-opasnost (02.05.2016.) str. 8

Slika 3. Prikaz pripremljenog mljevenog kukuruza za odvagu Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.) str. 18

Slika 4. Prikaz odvage uzorka Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.) str. 19

Slika 5. Prikaz promješanog uzorka u MeOH Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.) str. 19

Slika 6. Prikaz propuštanja uzorka kroz filter papir Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.) str. 20

Slika 7. Afla clean select column Izvor: Ninković Martina (02.11.2015.) str. 20

Slika 8. HPLC uređaj Izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti (02.05.2016.) str. 22

Slika 9. Prikaz rada HPLC strojaIzvor:http://shodexhplc.com/lessons/lesson-1-introduction-to-hplc/(02.05.2016.) str. 23

Slika 10. Nalaz analize (HPLC) na aflatoksine Izvor: Ninković Martina (04.02.2016.) str. 24

Slika 11. Nalaz analize (HPLC) na aflatoksine Izvor: Ninković Martina (07.03.2016.) str. 25

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij bilinogojstvo
Smjer: Zaštita bilja

Kontaminacija zrna kukuruza aflatoksinima u 2015. godini

Ninković Martina

Sažetak

Istraživanje kontaminacije zrna kukuruza i kukuruzne silaže aflatoksinima je provedeno 2015. godine u laboratoriju Biotech u Slavonskom Brodu na HPLC uređaju. U niti jednom uzorku nisu utvrđene nedopuštene količine aflatoksina.
Količina sintetiziranog aflatoksina ovisi o nizu čimbenika kao što su temperatura zraka, količine oborina i vlaga zraka, količina inokuluma i slično. S obzirom da je vegetacijska godina 2015. bila ekstremno vruća i većim dijelom sušna zaključujemo da je to jedan od razloga vrlo slabog razvoja Aspergillus vrsta na kukuruzu, a time i slabe kontaminacije aflatoksinima.
Aflatoksini su jedni od najtoksičniji mikotoksini. Tvore ih sojevi plijesni roda Aspergillus, a temperatura pogodna za njihov rast je od 26 do 38° C te sadržaj vlage supstrata veći od 18 %. Aflatoksini vidljivi su UV-spektru pri duljini od 365 nm kao prirodni fluorescirajući spojevi, termostabilni su, topljivi su u organskim otapalima, vrlo su osjetljivi su na kisele i alkalne otopine, a u vodi se gotovo ne tope.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Broj stranica: 35
Broj grafikona i slika: 11
Broj tablica: 1
Broj litetaturnih navoda: 39
Broj priloga: -
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: aflatoksini, mikotoksini, smrtnost životinja, štetnost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3.Prof.dr.sc. Mirjana Brmež, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Graduate thesis
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Plant production, course Plant Protection

Aflatoxin contamination of corn kernels in 2015

Ninković Martina

Abstract

The research about contamination of maize grain and corn silage aflatoxin was conducted in 2015. at biotech laboratory in Slavonski Brod, using the HPLC device. None of the samples showed no undue amounts of aflatoxin.The amount of synthesized aflatoxin depends on many factors such as air temperature, the amount of rainfall and humidity, the amount of inoculum etc. Since the vegetation year 2015. was extremely hot and mostly dry I can conclude that this is one of the reasons of the poor development of Aspergillus type on corn, and thereby low aflatoxin contamination.Aflatoxins are one of the most toxic mycotoxins. Formed by mold strains of the genus Aspergillus, a temperature suitable for their growth is from 26 to 38 ° C, and substrate humidity greater than 18%. Aflatoxins are visible to UV spectrum at a length of 365 nm as a natural fluorescent compounds. They are thermostable, soluble in organic solvents, very sensitive to acidic and alkaline solutions, and in water they almost don`t melt.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: DSc Jasenka Ćosić, Full Professor

Number of pages: 35
Number of figures: 11
Number of tables: 1
Number of references: 39
Number of appendices: -
Original in: Croatian

Key words: Aflatoxins, mycotoxins, Aspergillus sp.

Thesis defended on date:

Reviewers:
1. DSc Karolina Vrandečić, Associate Professor, chair
2. DSc Jasenka Ćosić, Full Professor, mentor
3. DSc Mirjana Brmež, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d