



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara GRUBAR

MIKOTOKSINI V HRANI IN KRMI

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara GRUBAR

MIKOTOKSINI V HRANI IN KRMI

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij - 1. stopnja

MYCOTOXINS IN FOOD AND FEED

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2011

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, travništvo in pašništvo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Franci Aco Celarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Franci Aco Celar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Darja Kocjan Ačko
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 23.9.2011

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Barbara Grubar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 633.1:632.4:615.9(043.2)
- KG hrana/krma/žita/koruza/plesni/*Fusarium*/*Aspergillus*/*Penicillium*/skladiščenje/
mikotoksini/neželeni učinki
- AV GRUBAR, Barbara
- SA CELAR, Franci Aco (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2011
- IN MIKOTOKSINI V HRANI IN KRMI
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 15 str., 3 pregl., 4 sl., 13 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V zadnjem času je veliko govora o mikotoksinih v hrani in prehrani živali. Gre za presnovne izločke, ki jih tvorijo plesni. Najpogostejše toksigene plesni na žitih in koruzi so iz rodov *Fusarium*, *Aspergillus* in *Penicillium*. Vsaka plesen izloča specifičen mikotoksin, ki z nadaljnjo obdelavo krme oziroma hrane ne izgine. Plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium* se razvijejo predvsem pri skladiščenju žit (tudi koruze) in so v večji meri odvisni od načina skladiščenja. Plesni iz rodu *Fusarium* pa se razvijejo na rastlinah med samo rastjo. Najpomembnejši mikotoksini, ki jih izločajo glive iz rodu *Fusarium*, so trihoteceni (najpogostejša sta deoksinivalenol in zearalenon). Mikotoksini v hrani in krmi povzročajo številne neželene učinke. Lahko se pojavljajo v različnih kombinacijah in tako še povečujejo negativno delovanje na organizem. Vsako leto je njihova prisotnost različna, kar pogojujejo različni, predvsem okoljski dejavniki.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 633.1:632.4:615.9(043.2)
- CX food/feed/wheat/maize/mycotoxins/storage/undesirable effects
- AU GRUBAR, Barbara
- AA CELAR, Franci Aco (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2011
- TY MYCOTOXINS IN FOOD AND FEED
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 15 p., 3 tab., 4 fig., 13 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Recently, it is written a lot about mycotoxins in food and feed. These are metabolic secretions, which are produced by molds. The most common molds on cereals and maize belong to *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Each mold is excreting specific mycotoxin, which do not disappear with further processing of food and feed. Molds of *Aspergillus* and *Penicillium* genera develop especially in storage of cereals (also maize) and are largely dependent on the storage conditions. *Fusarium* species are developed on plants during growth. The most important mycotoxins excreted by fungi of *Fusarium* genera are trichothecenes (the most common are deoxynivalenol and zearalenone). Mycotoxins in food and feed occur many undesirable effects. Their appearance in different combinations increase negative influence on organisms. Each year, their presence is quite different, which make various, especially environmental factors.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
KAZALO SLIK	V
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	VI
1 UVOD	1
1.1 MIKOTOKSINI.....	1
2 POGOJI ZA KONTAMINACIJO HRANE IN KRME Z MIKOTOKSINI	2
3 MIKOTOKSINI GLIV RODU FUSARIUM	3
3.1 OKUŽBE S FUZARIOZAMI NA ŽITIH	4
3.2 OKUŽBE S FUZARIOZAMI NA KORUZI.....	6
4 MIKOTOKSINI GLIV RODOV ASPERGILLUS IN PENICILLIUM	10
4.1 AFLATOKSINI.....	10
4.2 OHRATOKSIN	11
5 MIKOTOKSINI V SILAŽI	12
5.1 VPLIV ZRELOSTI KORUZE NA OBSTOJNOST IN VSEBNOST MIKOTOKSINOV	12
6 SKLEPI	14
7 VIRI	15
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpogostejše <i>Fusarium</i> vrste na žitih v Evropi in njihovi mikotoksini (Bottalico in Perrone, 2002).....	4
Preglednica 2: Vpliv lokacije, gnojenja, razkuževanja semena in sorte na vsebnost deoksinivalenola v zrnju in okuženost zrnja z vrstami <i>Fusarium</i> sp. (Zemljč in sod., 2008)	6
Preglednica 3: Toksigene <i>Fusarium</i> vrste in njihovi najpogostejši mikotoksini na koruzi v Evropi (Logrieco in sod., 2002)	9

KAZALO SLIK

Slika 1: Okužen klas ječmena z glivo <i>Fusarium</i> sp. (Celar, 2011)	5
Slika 2: Storž koruze okužen z glivo <i>Fusarium</i> sp. (Celar, 2011).....	6
Slika 3: Vsebnost mikotoksinov DON in ZEA v koruznici med zorenjem (Verbič, 2010) .	7
Slika 4: Vpliv sušine na obstojnost koruzne silaže na zraku (Verbič in Čergan, 2005)	13

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. ohraceus</i>	<i>Aspergillus ohraceus</i>
<i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
cit. po	citirano po
DON	deoksinivalenol
ES	Evropska Skupnost
<i>F. avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
<i>F. poae</i>	<i>Fusarium poae</i>
in sod.	in sodelavci
NIV	nivalenol
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium verrocosum</i>
<i>P. roqueforti</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
ZEA	zearalenon

1 UVOD

Kmetijstvo se je kot gospodarska dejavnost skozi stoletja zelo počasi razvijalo, sploh, če bi ga primerjali z razcvetom industrializacije. Pa vendar, pridelava hrane ter navsezadnje tudi krme za živali, je za ljudi predstavljalo velik pomen. Kljub napredku in novim tehnologijam pridelovalci še danes naletijo na marsikatero težavo oziroma izziv, kako pridelati neoporečno, zdravo in varno hrano za ljudi in krmo za živali.

Zelo pogosto se morajo spopadati z najrazličnejšimi okužbami posevkov ali pridelkov tako na polju kot kasneje v skladiščih. Pogosti krivci za onesnaženje hrane in krme so presnovni produkti gliv, mikotoksini, ki imajo številne, tudi resnejše, učinke na zdravje ljudi in živali. Zato se posveča velika pozornost raziskovanju tega področja vse od 60. let prejšnjega stoletja naprej, ko so jih začeli odkrivati.

1.1 MIKOTOKSINI

Številne glive tvorijo veliko različnih vrst biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, med njimi tudi mikotoksine (Carlile in sod., 2004). Do danes jih je zabeleženih več kot 200, te pa tvori preko 150 različnih vrst gliv (Kendrick, 1992). Največjo pozornost se namenja približno 20 vrstam (Carlile in sod., 2004), saj te predstavljajo največjo grožnjo pridelkom, ki so namenjeni za prehrano ljudi in krmo živalim. Mikotoksini lahko povzročijo različne simptome oziroma bolezni, v določenih količinah tudi smrt organizma. Zavedati se moramo, da vse kemične snovi, ki jih tvorijo glive, niso mikotoksini.

Po ocenah strokovnjakov naj bi bilo z mikotoksini onesnaženega 25 % svetovnega pridelka žita (Fink- Gremmels, 1999, cit. po Rezar in sod., 2008). Kakovost teh pridelkov je nična, saj onesnažen pridelek ni primeren ne za prehrano ljudi kot tudi ne za prehrano živali. Ta odstotek pa lahko zelo variira, saj je veliko odvisno od pogojev za okužbo z glivami.

V nalogi se bomo osredotočili na tri najpogostejše prisotne rodove gliv (*Fusarium*, *Aspergillus* in *Penicillium*), ki so najbolj problematične v evropskih klimatskih razmerah in na njihove mikotoksine ter posledice, ki jih le-ti povzročajo.

2 POGOJI ZA KONTAMINACIJO HRANE IN KRME Z MIKOTOKSINI

Mikotoksine najpogosteje povezujemo s plesnivo krmo in hrano, vendar vidne kolonije plesni ne pomenijo nujno, da so v njih prisotni mikotoksini. Plesni namreč tvorijo toksine samo v posebnih razmerah, sploh če so izpostavljene stresu (pomanjkanje vode, spremembe v temperaturi, itd.) (Verbič, 2010). Velja pa tudi obratno. Tudi če na videz krma ni plesniva, ni rečeno, da v njej ni mikotoksinov. Plesni v krmi lahko propadejo, toda mikotoksini ostanejo.

Do pojava toksigenih plesni lahko pride med vegetacijo, med ali po spravilu. Stopnja okuženosti med rastjo je odvisna od količine spor, s katerimi se gliva širi po posevku, okužb z drugimi patogenimi glivami, odpornostjo rastlin, mehanskimi poškodbami, mineralno preskrbo rastline in temperaturo. Med spravilom je zrnje izpostavljeno mehanskim poškodbam in možni okužbi z glivami. Po spravilu na okužbo vpliva stopnja vlage semen, temperatura, vlažnost v skladiščnem prostoru, hitrost sušenja, prezračevanje, prisotnost insektov, kemično tretiranje, čistota semen, itn. (Hesseltine, 1976).

Glive iz rodu *Fusarium* povzročajo rastlinske bolezni in jih uvrščamo med tako imenovane »poljske plesni«, glive iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* pa se razvijejo predvsem med skladiščenjem krme in jih zaradi tega imenujemo tudi »skladiščne plesni« (Verbič in Čergan, 2005). Gre le za okvirno razdelitev, saj se ob določenih razmerah skladiščna plesen razvije tudi na samem posevku, ter obratno.

Več o dejavnikih, ki vplivajo na kontaminacijo z mikotoksini pri posameznih rodovih, pa v naslednjih poglavjih.

3 MIKOTOKSINI GLIV RODU *Fusarium*

S toksikološkega in ekonomskega vidika so pri onesnaženju krme (v evropskih podnebnih razmerah) najpogosteje prisotne glive iz rodu *Fusarium*, ki so obenem tudi najbolj nevarni povzročitelji mikotoksikoz. Njihovi najpogostejši mikotoksini so trihoteceni (T-2 toksin, HT-2 toksin, deoksinivalenol (DON), nivalenol), zearalenon ter fumonizini. Prisotnost fuzarijskih toksinov v krmi, predvsem v višjih koncentracijah, vpliva na zmanjšanje zauživanja krme, posledično pa tudi na prirast živali. Novejše raziskave so pokazale, da toksini v krmi vplivajo tudi na imunsko odpornost organizma in povzročajo oksidacijski stres (Rezar in sod., 2008).

FUMONIZINI

Po 15 letih raziskovanja so določili fumonizin, sekundarni metabolit, ki je v več predelih sveta (Kitajska, Južna Afrika) povzročil pri ljudeh velik odstotek obolelih za rakom požiralnika. Vzrok je bil uživanje teh metabolitov v hrani, predvsem iz koruze. Ta toksin tvori gliva *F. moniliforme* (Kendrick, 1992).

V naravnih pogojih se pojavlja toksin v vsaj treh oblikah: B1, B2 in B3. Večinoma, kot v danem primeru, jih najdemo v hrani in krmi proizvedeni iz koruze. Njihov vpliv na toplokrvne organizme je zelo različen. Povzročijo lahko razvoj raka pri ljudeh in živalih. Ob prisotnosti še drugih mikotoksinov je njihov vpliv še bolj izrazit, ker okrepi njihovo negativno delovanje in poveča možnost za razvoj bolezni. Negativno vpliva na delovanje membranskih proteinov (folna kislina kot prenašalec) in prispeva k obolenju živčnega sistema (Lazicka in Orzechowski, 2010).

ZEARALENON

Zearalenon je mikotoksin, ki ga tvorijo *F. graminearum*, *F. culmorum* in sorodne vrste (Carlile in sod., 2004). Največkrat se omenja njegove hiperestrogene učinke, kar vpliva na slabšo plodnost. Velik učinek pa ima tudi pri prežvekovalcih, kljub organizmom v vampu, saj se zearalenon pretvori v zearalenol, ki ima precej močnejši estrogenski učinek (Verbič, 2010).

Prisotnost ZEA v prehrani lahko povzroči različne interakcije v metabolnih procesih, če pa so poleg še mikotoksini, kot so fumonizin in trihoteceni, pa velja za potencialno patogen dejavnik. Povzroči lahko alergije in vpliva na imunski sistem ljudi in živali (Lazicka in Orzechowski, 2010).

TRIHOTECENI

Pod ime trihoteceni vključujemo skoraj 200 komponent označenih kot mikotoksini. Najpomembnejši in najbolj pogosti mikotoksini iz te skupine so: deoksinivalenol (DON),

nivalenol (NIV), in T-2 toksin. Značilni simptomi po zaužitju so bruhanje, izguba apetita, driska, motnje v živčnem in imunskem sistemu, v primeru direktnega stika pa tudi dermatitis. Gre za izredno močne inhibitorje sinteze proteinov pri evkariontih. Inhibirajo vse faze sinteze- iniciacijo, elongacijo, terminacijo. Trihoteceni povzročajo tudi astmo in alergije (Lazicka in Orzechowski, 2010).

DON ima citotoksično delovanje ter škodljivo tvorita glivi *F. graminearum* in *F. culmorum* (Carlile in sod., 2004).

3.1 OKUŽBE S FUZARIOZAMI NA ŽITIH

V naših rastnih razmerah so najpogostejše okužbe žit z glivami *Fusarium graminearum*, v manjšem obsegu pa se pojavljajo še druge *Fusarium* vrste (*F. avenaceum* in *F. poae*). *F. graminearum* tvori v (določenih razmerah) mikotoksine kot so DON, NIV in ZEA (Zemljič in sod., 2008). Pšenica je najpogosteje onesnažena z DON.

Preglednica 1: Najpogostejše *Fusarium* vrste na žitih v Evropi in njihovi mikotoksini (Bottalico in Perrone, 2002)

VRSTA	POJAVLJANJE		MIKOTOKSIN
	severni/ centralni del	južni del	
<i>F. graminearum</i>	+++	+++	DON, NIV, ZEN, AcDON, FUS
<i>F. avenaceum</i>	+++	++	MON, BEA, ENS
<i>F. culmorum</i>	+++	++	DON, ZEN, ZOH, NIV
<i>F. poae</i>	++	+	NIV, BEA, DAS, FUS, ENS
<i>F. equiseti</i>	++	+	DAS, ZEN, ZOH
<i>F. tricinctum</i>	+	+	MON
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	±	T2, HT2, T2ol, NEO
<i>F. acuminatum</i>	±	±	T2, NEO
<i>F. subglutinans</i>	±	-	MON
<i>F. solani</i>	±	-	-
<i>F. oxysporum</i>	±	-	-

DON= deoksinivalenol, NIV= nivalenol, ZEN= zearalenon, AcDON= monoacetil deoksinivalenol, FUS= fuzarenon-X, MON= moniliformin, BEA= beauvericin, ENS= eniatini, ZOH= zearalenoli (α in β izomere), DAS= diacetoksiskirpenol, T2= T-2 toksin, HT2= HT-2 toksin, T2ol= T-2 tetraol, NEO= neosolaniol

Na obseg okužb z glivo *F. graminearum* in posledično na vsebnost DON v zrnju vpliva več dejavnikov. Med najpomembnejšimi so kolobar, občutljivost sorte, gnojenje z dušikom, vremenske razmere v času od cvetenja do dozorevanja, način obdelave tal ter uspešnost zatiranja fuzarioz s fungicidi (Bartles, 2003, cit. po Zemljič in sod., 2008).



Slika 1: Okužen klas ječmena z glivo *Fusarium* sp. (Celar, 2011)

V poskusih na dveh različnih lokacijah (Jablje in Škofja Loka), ki so jih opravili Zemljič in sod. (2008), so preučevali vpliv sort, gnojenja z dušikom in razkuževanje semena pri pšenici na vsebnost mikotoksinov. Vzorci so bili analizirani na vsebnost DON, NIV, acetildeoksinivalenola (Ac DON), toksina T-2 in HT-2. Nad mejo zaznavanja je bil le DON, ki pa v nobenem od analiziranih vzorcev ni presegel največje dovoljene vrednosti DON, saj je bila najvišja izmerjena vrednost 982 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Uredba komisije (ES) št. 1881/2006 za pšenico predpisuje najvišjo dovoljeno mejo 1250 μg DON/kg zrnja. Na vsebnost DON so značilno vplivale tudi sorte in lokacije, kar nakazuje, da z izborom odpornih sort lahko bistveno zmanjšamo tveganje za onesnaženje z DON. Njegova povprečna vsebnost je bila v vzorcih iz Jabelj značilno večja kot v vzorcih iz Škofje Loke. Tako lahko potrdimo pomen rastišča in mikroklimatskih razmer na tvorbo mikotoksinov. Gnojenje z dušikom in razkuževanje semena nista vplivala na vsebnost DON.

Pri vzorcih odvzetih le iz močno okuženih posevkov so ugotovili, da so vsi vzorci zrnja, tako iz navidezno okuženih kot iz navidezno zdravih rastlin, presegali najvišjo dovoljeno vsebnost za DON. Najbolj onesnažen vzorec je presegal to vrednost celo za več kot 25 krat. V vzorcih so določili tudi NIV in Ac DON. T-2 in HT-2 sta tudi tu bila pod mejo zaznavanja (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Tako močne okužbe in vsebnosti mikotoksinov pripisujejo več povezanim dejavnikom: analizirani sorti sta manj odporni na okužbe s fuzariozami, predposevek obeh je bila koruza za zrnje, pred setvijo pa je bila izvedena le minimalna obdelava. Navkljub rezultatom pa ocenjujejo, da je verjetnost za tako velike vsebnosti mikotoksinov v praksi majhna.

Preglednica 2: Vpliv lokacije, gnojenja, razkuževanja semena in sorte na vsebnost deoksinivalenola v zrnju in okuženost zrnja z vrstami *Fusarium* sp. (Zemljič in sod., 2008)

Lokacija	DON (mg/kg vzorca z 12 % vlage)	<i>Fusarium</i> spp. skupaj	Okuženost zrnja v odstotkih (%)		
			<i>F. graminearum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. poae</i>
Jablje	449	9,38	5,31	0,63	3,31
Škofja Loka	263	9,00	4,75	2,25	1,96
Gnojenje					
Ekstenzivno	336	9,06	4,81	1,31	2,56
Intenzivno	372	9,31	5,25	1,56	2,44
Razkuževanje					
Razkuženo	335	10,31	6,31	1,31	2,56
Nerazkuženo	373	8,06	3,75	1,56	2,44
Sorta					
Soissons	312	6,38	3,50	1,50	2,07
Isengrain	595	12,75	8,38	1,50	3,69
Renan	209	8,88	4,00	1,63	3,94
Antonius	301	8,75	4,25	1,13	4,07

3.2 OKUŽBE S FUZARIOZAMI NA KORUZI

Okužba s fuzariozami se lahko pojavi tako na koruznici kot na storžih. Največ mikotoksinov je v spodnjih delih stebel in je zato ob močnejših okužbah priporočljivo, da koruzo požanjemo nekoliko bolj visoko (Verbič, 2010). Okužba je odvisna od pridelovalnih razmer, predvsem od temperature in vlažnosti, kolobarja in gnojenja, zanemarljiv ni niti genotip koruze ter zrelost pri spravilu (Verbič in Čergan, 2005).



Slika 2: Storž koruze okužen z glivo *Fusarium* sp. (Celar, 2011)

KOLOBAR

Veliko večjemu tveganju za okužbo so izpostavljeni posevki s kolobarjem kuruza- žito (Reid in sod., 2001, Edwards, 2004, cit. po Verbič in sod., 2005). Prav zato bi bilo potrebno v Sloveniji temu posvečati večjo pozornost, saj je odstotek površin s koruso največji.

GNOJENJE

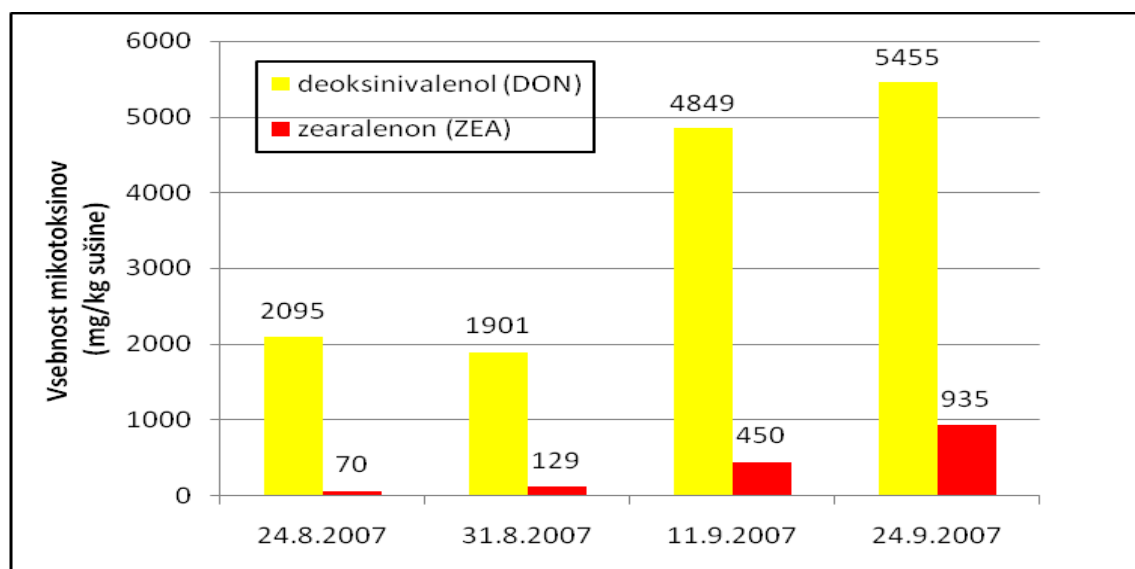
Gre za ukrep, ki vsekakor ni zanemarljiv. Ob optimalni preskrbi rastline, le-ta ne bo v stresu in bo tako možnost za okužbe s fuzariozami manjša. Problematično je predvsem gnojenje z dušikom, premalo ali preobilno (Reid in sod., 2001, cit. po Verbič in sod., 2005).

HIBRIDI

Hibridi se glede na odpornosti na fuzarioze med sabo razlikujejo. Hibridi z boljšo oceno odpornosti proti fuzariozam stebela vsebujejo manj DON, kot pa hibridi s slabšo oceno (Oldenburg in Hoppner, 2003, cit. po Verbič in Čergan, 2005).

ZRELOST

Prepozna žetev je tudi ob običajnih letinah med najpomembnejšimi dejavniki tveganja za povečane vsebnosti mikotoksinov v koruzni silaži. Z zorenjem se vsebnost trihotecenov deoksinivalenola in zearalenona v steblih kuruze zelo hitro povečuje (slika 3) (Lew in sod., 1997, cit. po Verbič in Čergan, 2005). Tudi pri običajnih letinah se pri pozni žetvi vsebnosti DON in zearalenona v koruznici približajo ali pa presežejo opozorilne mejne vrednosti.



Slika 3: Vsebnost mikotoksinov DON in ZEA v koruznici med zorenjem (Verbič, 2010)

PODNEBNE RAZMERE

Idealni pogoji, ki godijo razvoju fuzarioz, je toplo in vlažno okolje. Obstajajo pa tudi izjeme, saj so nekatere plesni na koruznih storžih najbolj konkurenčne v toplih in sušnih razmerah (Doohan in sod., 2003, cit. po Verbič in Čergan, 2005). Zato lahko glede na vsakoletna dolgotrajna sušna obdobja pričakujemo povečanje mikotoksinov v koruzi.

Raziskave Verbiča in Čergana (2005) kažejo, da rastne razmere v posameznih letih pomembno vplivajo na okuženost storžev s fuzariozami. Razlike med leti so bile visoko statistično značilne. Rastne razmere poleg vremenskih razmer vključujejo tudi talne razmere in vrsto predposevka. Raziskave, ki so potekale na šestih poskusnih območjih po Sloveniji (Maribor, Rakičan, Novo mesto, Ajdovščina, Nova Gorica in Bilje), kažejo, da je bil visok delež okuženih storžev v primorskem pridelovalnem območju, kar je verjetno povezano z napadom koruzne vešče. Tu ima koruzna vešča po dve generaciji na leto, kar pomeni več škodljivcev in posledično več poškodovanega tkiva, kjer se ob ugodnih pogojih razvije plesen (Verbič in Čergan, 2005)

Preglednica 3: Toksigene *Fusarium* vrste in njihovi najpogostejši mikotoksini na koruzi v Evropi (Logrieco in sod., 2002)

VRSTA	POJAVLJANJE		MIKOTOKSIN
	severni/ centralni del	južni del	
»Rdeče fuzarioze«			
<i>F. graminearum</i>	+++	+	DON, AcDON, NIV, FUS, ZEN
<i>F. subglutinans</i>	++	±	MON, BEA, FUP
<i>F. avenaceum</i>	++	±	MON
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. culmorum</i>	+	-	DON, NIV, ZEN, ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	-	T2, HT2, NOS
<i>F. poae</i>	+	-	DAS, NIV
<i>F. equiseti</i>	+	±	DAS, ZEN, ZOH
<i>F. acuminatum</i>	+	±	T2, NEO
<i>F. verticillioides</i>	+	+	-
<i>F. proliferatum</i>	+	+	-
»Rožnate fuzarioze«			
<i>F. verticillioides</i>	+	+++	FB₁, FB₂, FB₃
<i>F. proliferatum</i>	±	+++	FB₁, FB₂, FUP, MON, BEA
<i>F. subglutinans</i>	+++	+	MON, BEA, FUP
<i>F. graminearum</i>	+	±	-
<i>F. culmorum</i>	+	±	-
<i>F. equiseti</i>	+	±	-
<i>F. solani</i>	±	+	-
<i>F. semitectum</i>	±	+	-
<i>F. cerealis</i>	±	±	-
<i>F. sporotrichioides</i>	±	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	+	-

DON= deoksinivalenol, NIV= nivalenol, ZEN= zearalenon, AcDON= monoacetil deoksinivalenol, FUS= fuzarenon-X, MON= moniliformin, BEA= beauvericin, ZOH= zearalenoli (α in β izomere), DAS= diacetoksiskirpenol, T2= T-2 toksin, HT2= HT-2 toksin, NEO= neosolaniol, FB= fumonizini

4 MIKOTOKSINI GLIV RODOV *Aspergillus* IN *Penicillium*

4.1 AFLATOKSINI

Večjo pozornost mikotoksinom so znanstveniki začeli namenjati šele v začetku 60. let prejšnjega stoletja, ko je v Veliki Britaniji poginilo na deset tisoče puranov zaradi neznanega razloga. Stanje je bilo zelo resno, novic o tem dogodku je bilo mnogo, sploh potem, ko so se tudi drugje v Britaniji začeli pojavljati novi primeri poginov fazanov, rac, tudi telet in prašičev (Kendrick, 1992). Izkazalo se je, da je bilo tem poginom skupna okužena krma (Carlile in sod., 2004). Kmalu so toksin tudi izolirali in ugotovili, da izvira iz gliv, ki se nahajajo na arašidih. Pogine je povzročila gliva *A. flavus* in njen toksin imenovan aflatoksin (Kendrick, 1992).

Gre za enega izmed najbolj poznanih toksinov, ki ga tvorijo vrste *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* in *Aspergillus nomius* (Carlile in sod., 2004). *A. flavus* ter *A. parasiticus* tvorita toksine v ugodnih tropskih ali subtropskih pogojih. Najdemo ju na koreninskem sistemu ali pa na ostankih arašidov, kar jim predstavlja inokulum za kolonizacijo na podzemnih plodovih. *A. flavus* lahko izoliramo iz lupine skoraj vseh oreščkov, ki se nahajajo na prodajnih policah. Njihova prisotnost je vidna kot sive ali črne pege znotraj lupine (Deacon, 2006). Zelo dovzetni za njihovo okužbo so predvsem plodovi bogati z olji. Ugotovitev je bila potrjena v laboratorijih, kjer so ugotovili, da je tvorba aflatoksina spodbujena z lipidi (Deacon, 2006), saj njihova razgradnja omogoča sintezo aflatoksinov.

Kmalu so ugotovili, da obstaja več vrst le-teh: aflatoksin B1 in B2 ter aflatoksin G1 in G2. V večini primerov je aflatoksin B1 tisti, ki je najbolj toksičen. Študije pa so poleg toksičnosti pokazale tudi njihov velik potencial kancerogenosti (Kendrick, 1992). Aflatoksikoze, kot imenujemo obolenja zaradi zastrupitve z aflatoksini, so najbolj nevarne za ljudi, toplokrvne živali ter vretenčarje (ribe). Najpogostejša simptoma akutne aflatoksikoze sta rak jeter ter porušen imunski sistem, možni pa so tudi negativni učinki na pljuča (Lazicka in Orzechowski, 2010).

Onesnaženost hrane z aflatoksini je manjša v razvitih državah kot pa v razvijajočih. Po navedbah Carlile in sod. (2004) je bila posledica stalnega zaužitja nizkih količin aflatoksina v nekaterih tropskih predelih, zlasti s sočasno okužbo z virusom hepatitis B, zelo visoka stopnja obolenja za rakom jeter. To je predvsem povezano s kontrolo hrane in detekcijo toksinov, ki je v razvijajočih državah zelo redka ali pa je sploh ni. Ta stalna prisotnost aflatoksinov v hrani posledično pomeni 2 do 5 krat pogostejši razvoj raka na jetrih kot v razvitih državah (Lazicka in Orzechowski, 2010).

Aflatoksine lahko odkrivamo v ekstraktih kontaminirane hrane s pomočjo tankoplastne kromatografije, saj je pri UV obsevanju vidno zelena ali modra fluorescenca. Razlika v barvi je vezana na strukturo molekule, natančneje na obroče, zato lahko tudi razlikujemo med G (green-fluorescing) in B (blue-fluorescing) aflatoksini. Na to se nanaša tudi toksičnost, kjer velja, da je aflatoksin B1 bolj toksičen od aflatoksina G1 (Deacon, 2006).

Obseg in intenziteta zastrupitve z aflatoksini je odvisna od starosti, spola, telesne teže, prehrane, tolerantnosti na okužbo kot tudi od prisotnosti drugih mikotoksinov. Zaradi razlik v občutljivosti živali na aflatoksin pri poskusih, je to še toliko težje razložiti pri ljudeh. Vsebnost aflatoksinov je večja v letih, ko je malo dežja, saj so rastline bolj šibke in s tem dovzetnejše za okužbe z glivami rodu *Aspergillus* (Lazicka in Orzechowski, 2010).

Znano je, da gliva *A. flavus* tvori toksine le pri temperaturi od 25 do 32 °C, čeprav uspeva v temperaturnem območju od 5 do 40 °C. Optimalna pH vrednost je med 2,5 do 6 (rast plesni med pH 2 in 10). Sposobnost tvorbe aflatoksinov je odvisna tudi od relativne zračne vlage. Optimum je od 85 do 99 %, čeprav raste še pri 65 %. Vsaka od toksinotvornih plesni ima svoje specifične zahteve, katere omogočajo sintezo toksinov. Ob poznavanju vseh parametrov lahko kontroliramo tvorbo mikotoksinov oziroma preprečimo njihov nastanek z ustreznim vodenjem tehnologije. (Raspor in Adamič, 1983).

Plesni iz rodu *Aspergillus* veljajo za bolj problematične od *Fusarium* vrst, saj teh vampni organizmi ne razgradijo in se lahko v obliki aflatoksina M1 pojavijo v mleku (Zemljič in sod., 2008). Aflatoksin M1 je glavni metabolit aflatoksina B1 pri ljudeh in živalih, ki je lahko prisoten v mleku živali krmljenih z onesnaženo krmo.

4.2 OHRATOKSIN

Mikotoksin ohratoksin tvorijo glive iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium*. Najpogosteje se pojavita *A. ochraceus* (v tropih na kavovcu in kakavovcu) ter *P. verrucosum* na žitih (Carlile in sod., 2004). V naših razmerah se gliva razvije na vlažnem krmnem žitu, najpogosteje na ječmenu in ovsu (Kendrick, 1992).

Med vsemi toksini, ki jih tvorijo glive rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, je ohratoksin A pomemben tako iz toksikološkega kot tudi ekonomskega vidika. Mikotoksin je v večini posledica neprimernega skladiščenja zrnja. Najpomembnejši škodljivi vplivi, ki nastanejo pri zaužitju hrane kontaminirane z ohratoksinom A, so poškodbe ledvic in jeter ter poslabšanje imunskega sistema. Ohratoksin A v celičnem metabolizmu vpliva na encime, ki so povezani z metabolizmom fenilalanina in inhibirajo mitohondrijsko sintezo ATP ter pospešijo peroksidacijo lipidov. Delovanje tega mikotoksina lahko privede tudi do sprememb v zaporedju baz nukleinskih kislin, kar pomeni možnost mutacij (Lazicka in Orzechowski, 2010). Tako imamo še en potencialni dejavnik več, ki lahko pripomore k pojavi in razvoju kancerogenih obolenj.

5 MIKOTOKSINI V SILAŽI

V koruzno silažo lahko pridejo mikotoksini z okuženo koruzo za siliranje, lahko pa nastajajo pri plesnenju silaže v silosu. Na rastoči koruzi se najpogosteje razvijejo plesni iz rodu *Fusarium*, v silosu pa plesni iz rodu *Penicillium*. Plesni iz rodu *Fusarium* se v silosu praviloma ne razvijajo naprej, mikotoksini pa se med siliranjem ohranijo (Verbič, 2010). Toksini, ki jih tvorijo glive rodu *Penicillium*, se s pomočjo vampnih mikroorganizmov uspešno razgrajujejo in s tem zmanjšajo njihovo škodljivost za prežvekovalce in nevarnost za prenos v živalske proizvode (Verbič in Čergan, 2005).

Mlečnokislinska fermentacija je primer, kako lahko zmanjšamo vsebnost mikotoksinov v hrani in krmi. Pri proizvodnji silaže gre prav za to. Mlečnokislinske bakterije omogočijo biotransformacijo v metabolite, ki niso škodljivi za živali. V procesu se zniža pH, kar zavira razvoj spor teh plesni (Lazicka in Orzechowski, 2010). Slednje naj bi sicer držalo, vendar po navedbah (McDonald in sod., 1991, cit. po Verbič in Čergan, 2005) nekatere plesni rastejo tudi pri zelo nizkih pH vrednostih in zaradi tega z ukrepi za učinkovitejše zakisanje silaže njihove rasti ne moremo preprečiti. Plesnenje bi lahko preprečili le z zagotovitvijo popolnih anaerobnih razmer ali pa s tretiranjem silaže z dodatki, ki delujejo fungicidno (Oldenburg, 1997, cit. po Verbič in Čergan, 2005).

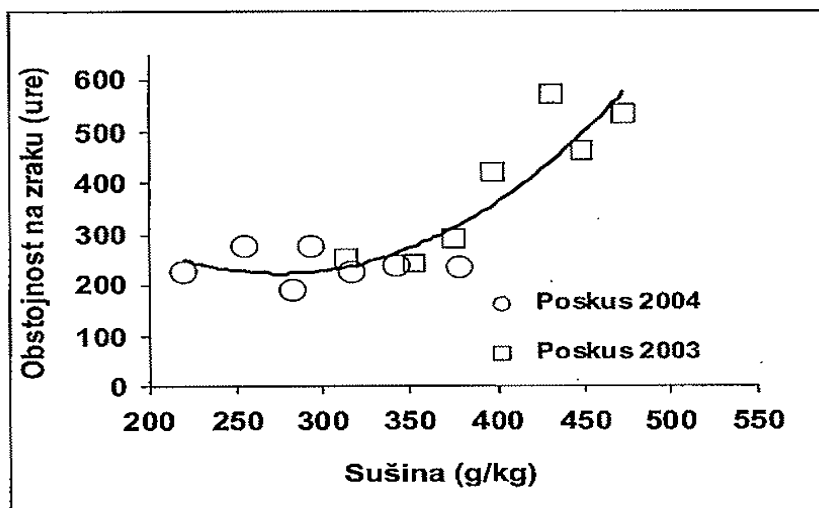
Med siliranjem se najpogosteje razvije gliva *Penicillium roqueforti*. Zaradi nekaterih lastnosti, plesen velja za zelo konkurenčno. Raste lahko pri majhnih koncentracijah kisika, pri velikih koncentracijah ogljikovega dioksida, pri nizkih temperaturah in ob prisotnosti razmeroma velikih koncentracij hlapnih maščobnih kislin (Auerbach in sod., 1998, cit. po Verbič in Čergan, 2005). *P. roqueforti* proizvaja poleg roquefortina C tudi druge toksine, na primer patulin (Auerbach in sod., 1998, cit. po Verbič in sod., 2005).

Izmed vrst rodu *Aspergillus* pa se v silaži najpogosteje nahaja *A. fumigatus*, ki tvori fumigaklavin A in C ter fumitremorgene (cit. po Verbič in Čergan, 2005). Spore te plesni vplivajo na zdravje ljudi in živali tudi neposredno, saj se lahko naselijo v dihalih. Vrsta *A. flavus*, ki tvori aflatoksin, pa za razvoj v silaži verjetno nima dovolj ustreznih pogojev za razvoj.

5.1 VPLIV ZRELOSTI KORUZE NA OBSTOJNOST IN VSEBNOST MIKOTOKSINOV

V raziskavah leta 2003 in 2004 so ugotavljali vpliv zrelosti koruze na obstojnost silaže. Verbič in sod. (2005) so ugotovili, da je obstojnost silaže iz bolj zrele koruze boljša, kot pa pri manj zreli koruzi. Oldenburgova in Hoppner (2003, cit. po Verbič in Čergan, 2005) sta ugotovila, da je mogoče vsebnost fuzarioz v silaži zmanjšati s pravočasnim siliranjem, ko vsebuje koruza 300-350 g sušine/kg (slika 4). Sklepajo tudi (Verbič in Čergan, 2005), da bi lahko bil eden od najpomembnejših dejavnikov, ki so odgovorni za kvarjenje silaže na zraku, velika vsebnost nepovretil sladkorjev v koruznih silažah. Vsebnosti teh so bile v silažah iz bolj zrele koruze manjše, kot pri silažah iz manj zrele koruze. Presenetljivo je

bilo spoznanje, da je silaža iz bolj zrele koruze obstojnejša, kljub temu, da je vsebovala manj očetne kisline, ki deluje fungicidno (Danner in sod., 2003, cit. po Verbič in Čergan, 2005).



Slika 4: Vpliv sušine na obstojnost koruzne silaže na zraku (Verbič in Čergan, 2005)

6 SKLEPI

Pri prehrani ljudi postaja vse pomembnejša zdrava in varna hrana. Zato je eden od ključnih dejavnikov tudi neoporečnost krme v prehrani živali. Tej problematiki se namenja vse več pozornosti, pa ne le iz strani strokovne javnosti, temveč tudi iz raznih društev za varstvo potrošnikov ter pridelovalcev. V prihodnje lahko pričakujemo vse več testiranj kmetijskih pridelkov in proizvodov, ki se uporabljajo neposredno za prehrano ljudi in krmo živali, na prisotnost mikotoksinov.

Glede na to, da je prisotnost mikotoksinov v krmi med posameznimi leti različna, kar je odvisno predvsem od okoljskih dejavnikov, bomo morali biti vse bolj pozorni in dosledni pri izvajanju ukrepov, s katerimi lahko zmanjšamo prisotnost toksinov v pridelku (kolobar, gnojenje, obdelava tal itn.). Veliko pa k bolj uspešnemu pridelovanju pripomorejo tudi žlahtnitelji pri ustvarjanju novih sort, ki so manj dovzetne za bolezni.

V razvitih državah, kjer hrane ne primanjkuje, se brez večjega premisleka taka živila zavrže. Nikakor pa to ne velja za revnejše države, države v razvoju, kjer jim hrana predstavlja izredno dragoceno dobrino. Odločitev, da bi uničili hrano, ki potencialno vsebuje toksične snovi in ima negativne vplive na zdravje, je v takem primeru težka, saj gre za odločanje med lakoto in stradanjem.

Izredno pomembno je, da ugotovimo prepoznamo onesnaženost hrane in krme z mikotoksini ter jo poskušamo preprečiti oziroma omiliti, saj nevarnosti le-teh v hrani in krmi nikakor ne gre podcenjevati.

7 VIRI

- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 611-624
- Carlile M., Watkinson S., Gooday G. 2004. Parasites and Mutualistic Symbionts. V: The Fungi. 2nd ed. California, Elsevier Academic Press: 440-441
- Celar F. 2011. Osnove varstva rastlin (Uvod), Študijsko gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo (gradivo dostopno preko ŠIS)
- Deacon J.W. 2006. Fungal metabolism and fungal products. V: Fungal biology. 4th ed. England, Blackwell Publishing: 137-141
- Hesseltine C.W. 1976. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. V: Mycotoxins and other fungal related food problems. Advances in chemistry series 149, Atlantic City, 11.-13.1974. Rodricks J. V. (ed.). Washington, American chemical society: 1-22
- Kendrick B. 1992. Mycotoxins in food and feed. V: The Fifth Kingdom. 3rd ed. Newburyport USA, Focus Publishing: 303-315
- Lazicka K., Orzechowski S. 2010. The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. Natural Science, 6, 2: 544-550
- Logrieco A., Mule G., Morreti G., Botallico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 597-609
- Raspor P., Adamič J. 1983. Zaviranje in preprečevanje tvorbe mikotoksinov. Nova proizvodnja, 34, 1-2: 22-24
- Rezar V., Frankič T., Salobir J. 2008. Nekatere prehranske možnosti za preprečitev škodljivega vpliva fuzarijskih toksinov (T-2 in DON) na proizvodne lastnosti in lipidno peroksidacijo pri piščancih. Acta agriculturae Slovenica, 92, 1: 19-27
- Verbič J. 2010. Ukrepi za blaženje morebitnih povečanih vsebnosti mikotoksinov v silaži iz poplavljenе koruze pri reji molznic. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije. http://www.kis.si/files/janezj2/mikotoksini_poplave_2010.pdf (5. avg. 2011)
- Verbič J., Čergan Z. 2005. Dejavniki, ki vplivajo na onesnaženje silaže z mikotoksini. V: Zbornik predavanj: 14. Posvetovanje o prehrani domačih živali «Zdravčevi- Erjavčevi dnevi», Murska Sobota, 2005. Kapun S. (ur.), Čeh T. (ur.). Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod: 21-29

Zemljič A., Rutar R., Žerjav M., Verbič J. 2008. Vpliv sorte, gnojenja z dušikom in razkuževanja semena na okuženost zrnja pšenice s *Fusarium* sp. in onesnaženost z mikotoksini. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2008, Rogaška Slatina, 4. in 5. december 2008. Tajnšek A. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 257-262

ZAHVALA

Za pomoč, strokovno vodstvo in razumevanje pri izdelavi diplomskega projekta se zahvaljujem mentorju prof. dr. Franci Aco CELARJU.

Hvala tudi recenzentki doc.dr. Darji KOCJAN AČKO za nasvete in hiter pregled diplomskega projekta.

Posebno se zahvaljujem svoji družini, staršem za oporo, vzpodbudo, razumevanje v času študija ter podpiranje pri vseh mojih odločitvah.