Korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina

Rimar, Hrvoje

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:859747

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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 u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Hrvoje Rimar

Diplomski studij, zootehnika

Smjer hranidba domaćih životinja

Korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Hrvoje Rimar

Diplomski studij, zootehnika

Smjer hranidba domaćih životinja

Korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, predsjednik
2. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, mentor
3. Prof.dr.sc. Gordana Bukvić, član
4. Doc.dr.sc. Sanda Rašić, zamjenski član

Osijek, 2017.

Sadržaj

1. Uvod **1**

2. Mikotoksini **2**

3. Rod *Aspergillus* **5**

4. *Aspergillus flavus* **7**

5. Aflatoksini **9**

5.1. Aflatoksin B1 ..... **12**

6. Metode redukcije aflatoksina **15**

7. Biološke metode redukcije - korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina **17**

8. Zaključak **23**

9. Popis literature **24**

10. Sažetak **30**

12. Popis slika **32**

13. Popis tablica **33**

TEMELJNA DOKUMENTARNA KARTICA **34**

BASIC DOCUMENTATION CARD **35**

1. Uvod

Mikotoksini su proizvod koji sintetizira grupa mikroorganizama koje nazivamo fungi, gljive ili mycetes. Mikotoksini koji su najopasniji 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 neki drugi mikotoksini kao na primjer DON. P. Prisustvo različitih rodova gljiva (plijesni) u hrani za životinje je prirodna pojava, a ne izuzetak. Putevi kontaminacije hrane za životinje gljivama i njihovim mikotoksinima su različiti, počev od kontaminiranosti sirovina koje ulaze u sastav hrane za životinje već u polju, tijekom berbe i transporta, zavisno od načina skladištenja sirovina i gotovih proizvoda, kao i procesa proizvodnje i manipulacije hranom za životinje (Lević i Stojkov, 2002., Harley, 1997., Nelson i sur., 1993., Joffe, 1983.).

Na polju, ali i tijekom skladištenja, može doći do onečišćenja žitarica plijesnima koje proizvode toksične kemijske spojeve mikotoksine. Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koji induciraju akutne i kronične toksične učinke kod ljudi i životinja (IARC, 1993.).

Đilas i sur. u 1999. godini ustanovili su da, iako su smjese za svinje, perad i goveda bile mikrobiološki neispravne zbog prisustva gljiva iz rodova *Fusarium* (58%), *Penicillium* (46%) i *Aspergillus* (43%) smjese nisu sadržavale ni jedan analiziran mikotoksin. Do sličnih rezultata su došli Škrinjar i sur. (1995.) proučavajući sastav gljiva i sadržaj njihovih sekundarnih metabolita (mikotoksina) u hrani za piliće. Prisustvo mikotoksina u hrani za životinje prouzrokuje oboljenja (mikotoksikoze) kod životinja i ljudi (Lončarević i sur., 1972.).

Onečišćenje poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima, budući da uzrokuje velike ekonomske gubitke, ima negativan utjecaj na gospodarstvo zahvaćene regije, prvenstveno zemalja u razvoju u kojima se strategija sprječavanja rasta plijesni u razdoblju žetve i tijekom skladištenja usjeva uglavnom primjereno niti ne provodi (Rustom, 1997.).

S ciljem sprječavanja onečišćenja suvremenu proizvodnju zdravstveno ispravnih i kvalitetnih proizvoda potrebno je temeljiti na načelima "od farme do stola", HACCP (eng. Hazard analysis and critical control points) sustavu, odnosno analizi opasnosti, prevenciji i kontroli kritičnih točaka te uklanjanju potencijalnih opasnosti u tehnološkom postupku proizvodnje (Asefa i sur. 2011.).

2. Mikotoksini

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

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.).



Slika 1. Mikotoksin

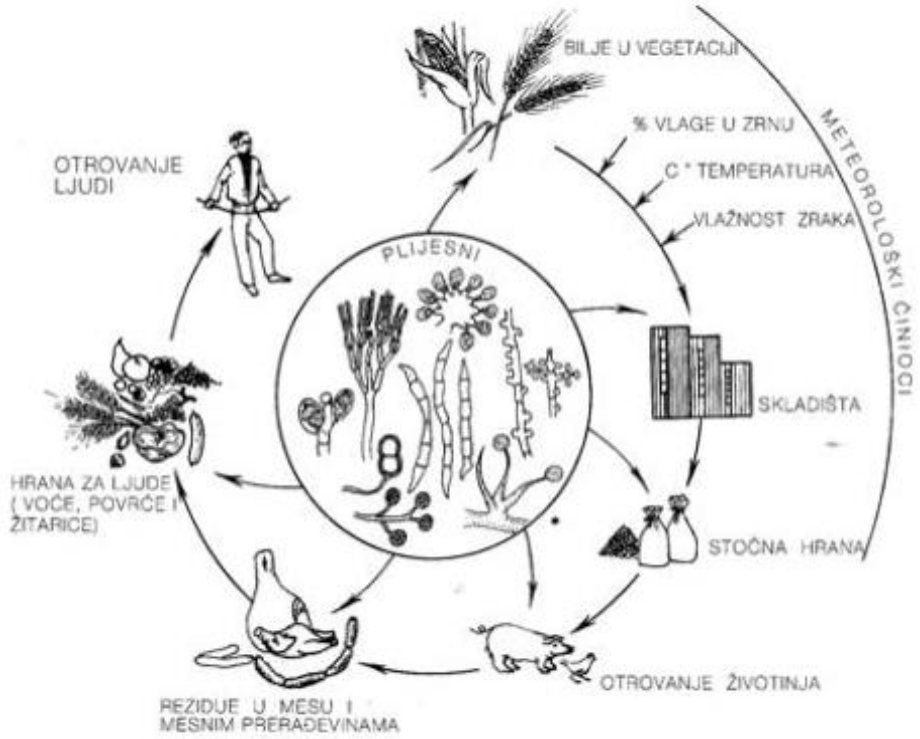
Izvor: https://benymuslimfillah.files.wordpress.com/mikotoksin

Kontaminacija hrane mikotoksinima može biti primarna i sekundarna. Kontaminacija mikotoksinima u hrani biljnog podrijetla, odnosno primarna kontaminacija, je posljedica rasta plijesni na voću, žitaricama i povrću. Ako su životinje hranjene mikotoksinima kontaminiranom hranom, metaboliti mikotoksina mogu se naći i u hrani životinjskog

podrijetla (jaja, mlijeko i meso), pa se takav oblik kontaminacije naziva sekundarnom kontaminacijom.

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.).

U povijesti čovječanstva, bolesti koje su bile uzrokovane mikotoksinima nazvane su mikotoksikoze te su u povijesti imale utjecaj na demografske promjene, ratove te izazivale seobe stanovništva (Peraica i Rašić, 2012.).



Slika 2. Put mikotoksina u hranidbenom lancu

Izvor: Ožegović i Pepeljnjak,1995.

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.).

Najvažnijim mikotoksinima smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova *Aspergillus, Penicillium* i *Fusarium* (Nujić, 2011.).

Mikotoksini su toksični produkti metabolizma nekih plijesni koje rastu na različitim namirnicama i krmivima. U akutnim slučajevima mikotoksini izazivaju otrovanja ljudi i životinja (mikotoksikoze), a u kroničnim, oštećenja kože i unutrašnjih organa. U eksperimentalnim uvjetima dokazano je da mikotoksini induciraju karcinom jetre u raznih životinjskih vrsta, a pronađeni su u namirnicama koje se koriste u prehrani ljudi. Tijekom istraživanja primijećeno je djelovanje aflatoksina i na druge organe (pored jetre), kao što su želudac, bubrezi, dušnik i crijeva (Duraković, 1989.).

Većina namirnica (kao i krmiva) je osjetljiva na kontaminaciju mikotoksinima s obzirom na sposobnost plijesni producenata mikotoksina da rastu na najrazličitijim supstratima, pri različitim uvjetima. Prisustvo plijesni u namirnici ne znači nužno prisutnost mikotoksina (ako plijesan nije dovoljno porasla), ali s druge strane, odsutnost plijesni ne znači da nema mikotoksina jer se mogu zadržati u supstratu dugo nakon nestanka plijesni. Poseban problem predstavlja i pojava tzv. maskiranih mikotoksina koji se u hrani nalaze u promijenjenom obliku. Najčešće je riječ o kemijskoj vezi sa šećerima, pri čemu se takav mikotoksin ne može detektirati uobičajenim metodama što daje krivu sliku o kontaminaciji analiziranog uzorka. Naime, maskirani mikotoksini se, djelovanjem hidrolitičkih enzima crijevne mikroflore, mogu osloboditi u probavnom traktu i djelovati toksično prema konzumentu (Šarkanj i Klapec, 2013.).

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.).

3. Rod *Aspergillus*

Razred: *Eurotiomycetes* hahaha

Red: *Eurotiales*

Porodica: *Trichocomaceae*

Rod: *Aspergillus*

Vrste: *A. terreus, A. repens, A. niger, A. tamarii, A. fumigatus, A. flavus, A. carneus, A. penicilloides, A. oryzae, A. japonicus, A. ustus*. Većina vrsta roda *Aspergillus* odlikuje se brzim rastom kolonija, a boja kolonija ovisi o vrsti.



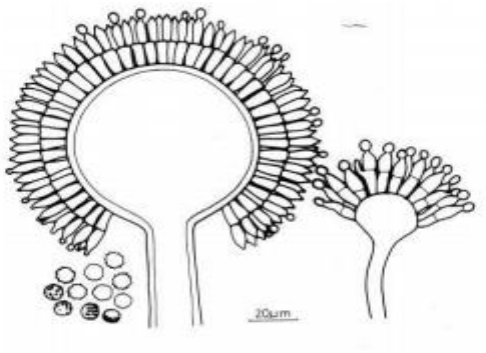
Slika 3. *Aspergillus sp.*
Izvor: **https://www.emlab.com/app/fungi/**

U rod *Aspergillus* svrstano je oko 200 vrsta od kojih je tek 20-tak patogeno za čovjeka. Najčešći uzročnici aspergiloze čovjeka jesu: *A. fumigantus, A. niger, A. flavus, A. candidus* i dr. Ove se plijesni razmnožavaju nespolno fijalokonidijama. Kod nekih vrsta otkriven je i spolni način razmnožavanja.

Aspergillus je veliki rod plijesni koji obuhvaća više od 100 poznatih i opisanih vrsta, od kojih veći broj dobro raste u laboratorijskom uzgoju. Od golemog broja askosporogenih rodova, dva imaju posebno značenje u mikrobiologiji namirnica.

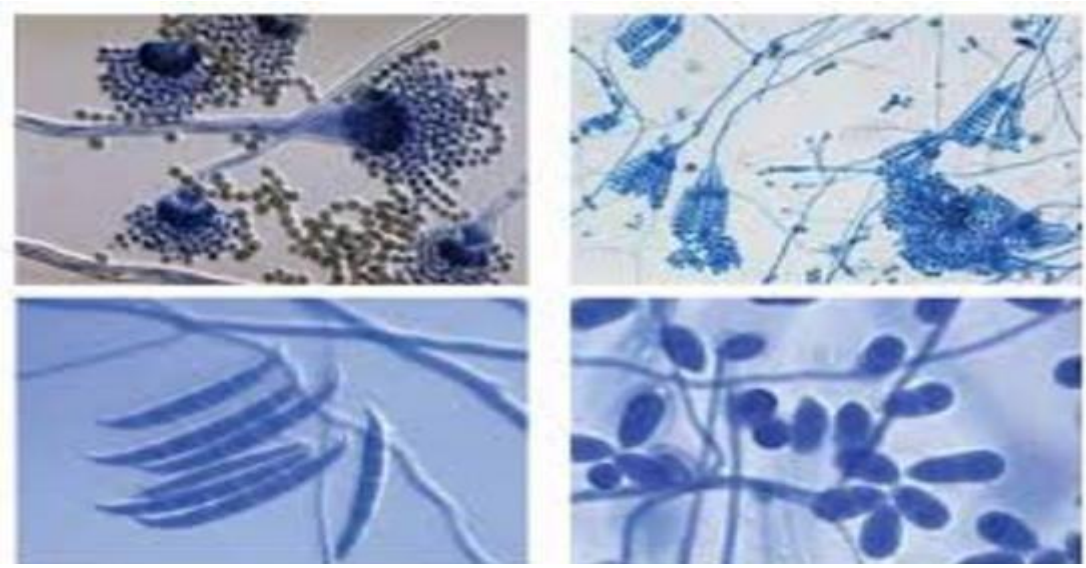
Konidije ovih plijesni nalaze se u zraku, zemlji, vodi, na uskladištenoj hrani i lišću biljaka. Konidije vrste roda *Aspergillus* čine četvrtinu svih konidija u zraku. U 1 m^3 nalazi se prosječno 2-15 konidija neke od vrsta ovog roda (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).

Rastom u vanjskoj sredini neke vrste ovih plijesni stvaraju mikotoksine (aflatoksin, sterigmatocistin, ohratoksin). Konzumiranjem hrane zagađene mikotoksinima čovjek može razviti kliničku sliku akutnog trovanja hranom ili toksičnog oštećenja jetre, bubrega i drugih organa. Konidije ovih plijesni nalaze se u zraku, zemlji, vodi, na uskladištenoj hrani i lišću biljaka. Konidije vrste roda *Aspergillus* čine četvrtinu svih konidija u zraku. U 1 m^3 nalazi se prosječno 2-15 konidija neke od vrsta ovog roda (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).



Slika 4. Crtež plijesni roda *Aspergillus*

Izvor : http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/



Slika 5. Mikroskopska slika plijesni roda *Aspergillus*

Izvor: http://www.moldlab.com/

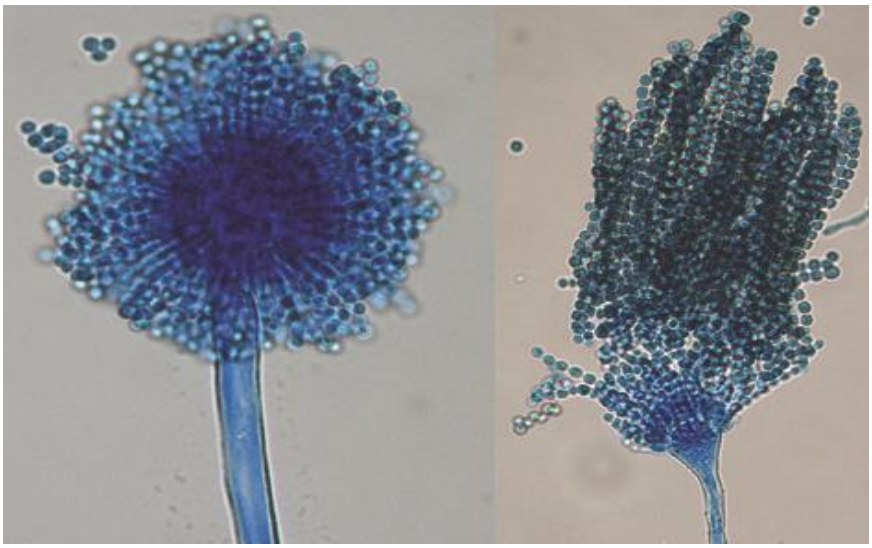
4. *Aspergillus flavus*

Gljivica *Aspergillus flavus*, kao i neke druge vrste plijesni raširene su u okolini, a njihove spore nalaze se u zemljištu. Razvoj ove vrste gljivica i aflatoksina najčešće je povezan s ekstremnim vremenskim uvjetima koji uzrokuju stres biljke.

Aspergillus flavus je aerobna gljivica, razvija se i proizvodi toksine samo na površini namirnice i dijelovima izloženim zraku, a njegovi toksini mogu prodrijeti i do nekoliko centimetara u dubinu namirnice. Najčešće sintetizira aflatoksine B1, B2, G1 i G2. Aflatoksini M1 i M2 su produkti metabolizma aflatoksina B1 i B2 i nastaju kada sisavci konzumiraju hranu kontaminiranu ovim mikotoksinima.

Sojevi Asp*ergillus flavus* mogu proizvoditi aflatoksine koji imaju hepatotoksično i kancerogeno djelovanje. Životinje i ljudi mogu biti izloženi aflatoksinima nakon direktnog unošenja različitih namirnica koje su bile kontaminirane gljivicama *Aspergillus flavus* u nekom periodu tokom skladištenja namirnica, rasta ili žetve. Ljudi mogu biti i indirektno izloženi toksinima nakon unošenja namirnica koje su dobivene od životinja koje su jele kontaminiranu hranu. Točnije rečeno životinje se mogu otrovati ako jedu kontaminirane:

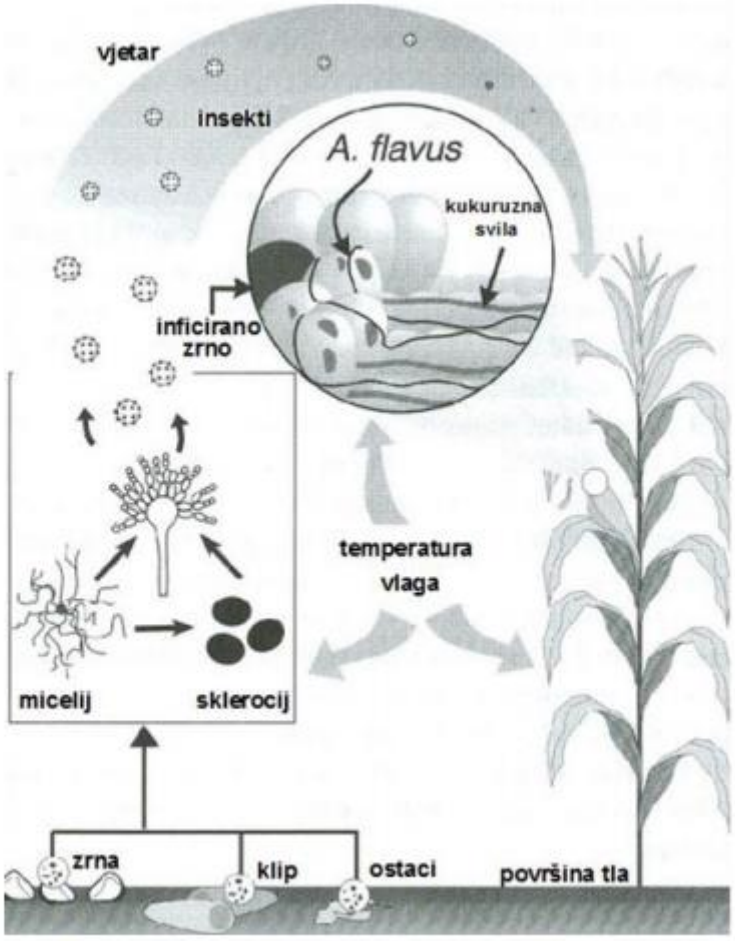
- ŽITARICE (pšenica, raž, zob, kukuruz);
- ULJARICE (suncokret, soja, kikiriki);
- Gotovu stočnu hranu, sijeno, silažu, sjenažu.



Slika 6. Konidiofor *A. flavusa*

Izvor: http://www.mycology.adelaide.edu.au/

Čimbenici koji utječu na infekciju, osim uvjeta okoliša, su količina spora u polju i osjetljivost biljke (ovisno o usjevu, vrsti i zdravstvenom stanju), sustavu obrade tla i bilja te populaciji insekata. Kod kukuruza, značajne infekcije i proizvodnja aflatoksina se ne pojavljuju sve dok je vlaga zrna ispod 32 %, no proizvodnja aflatoksina se nakon infekcije može nastaviti sve dok vlaga zrna ne padne ispod 15 % (Battilani i sur., 2012.).



Slika 7. Životni ciklus plijesni *A. flavus*

Izvor: Battilani i sur., 2012.

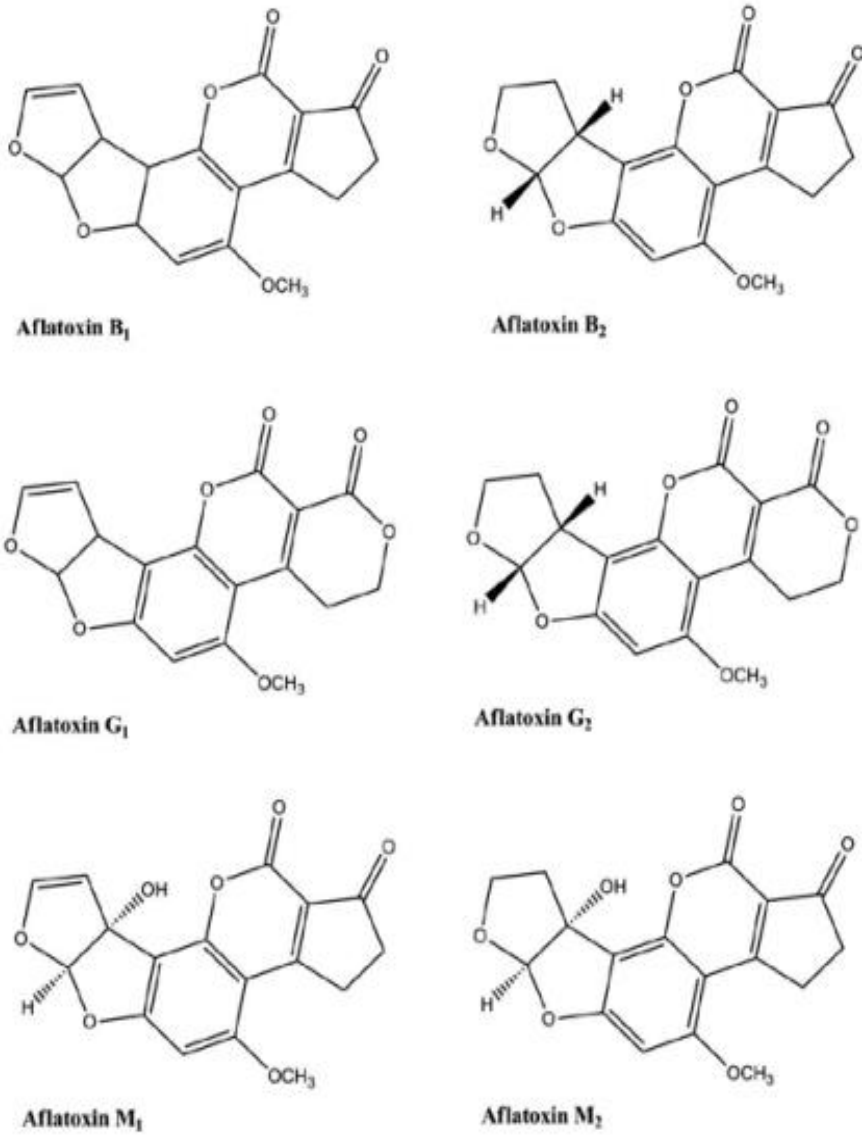
5. Aflatoksini

Aflatoksini su strukturno srodna toksični spojevi koje proizvodi većina sojeva gljivica *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus,* a ime su dobili po početnim slovima gljivice *Aspergillus flavus.* Aflatoksin je mikotoksin koji je metabolit patogenih gljiva (plijesni) roda *Aspergillus.* Aflatoksin je opasan uzročnik raka kod ljudi i životinja. Također alfatoksini su plijesni koji vrlo često kontaminiraju velik broja krma i namirnica.

Najvažnijim mikotoksinima smatraju se aflatoksini, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova *Aspergillus, Penicillium* i *Fusarium* (Nujić, 2011.).

Aflatoksini su najpoznatiji i najtoksičniji mikotoksini. Prvi puta su opisani u Engleskoj 1960. godine (Prasanna i sur., 1975., Hussein Brasel, 2001.). Za rast im pogoduju temperature od 26 – 38 °C i sadržaj vlage veći od 18%. *Aspergillus flavus* sintetizira aflatoksine B1 i B2 na žitaricama poput kukuruza, dok *Aspergilllus parasiticus* može sintetizirati aflatoksine B1, B2, G1 i G2 na uskladištenim uljaricama (Valpotić i Šerman, 2006.). 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.). Metaboliti su: gljivica iz roda Aspergillus (*A. flavus, A. parasiticus, A. nomius, A. niger, A. ruber, A. ohraceus*), gljivica iz roda *Penicillium* (*P. puberulum, P. variable*) te nekih pripadnika iz roda *Rhizopus*. Aflatoksini su smjese kemijskih srodnih spojeva, derivata difurokumarina. Prirodni su fluorescirajući spojevi, vidljivi u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G nastala su upravo na njihovom fluorescirajućem svojstvu; B za plavu i G za zelenu fluorescenciju. Termostabilni su i u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih utjecaja. Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, aceton, kloroform), a gotovo netopivi u vodi. Dokazana je kontaminacija žitarica, mesa, iznutrica svinja i peradi te jaja (Ožegović i Pepeljnjak, 1995., Richard, 2007., Husain i sur., 2010.).

Aflatoksine B2 i G2 su dihidroderivati (roditeljskih) B1 i G1. Aflatoksini M1, M2 i P1 su dihidroderivati (roditeljskih) aflatoksina B1 i B2 a izlučuju se u mlijeku, urinu i u stolici kao proizvodi metabolizma aflatoksina B1 i B2. Aflatoksini M1 i M2 produkti su biološke pretvorbe aflatoksina B1 i B2 u mliječnim žlijezdama sisavaca hranjenih krmom koja je sadržavala aflatoksine spomenute B-skupine. 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.). Na slici 7. su prikazane kemijske strukture glavnih predstavnika aflatoksina.



Slika 8. Kemijske strukture glavnih predstavnika aflatoksina

Izvor: (Delaš, 2010.).

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.).

Utvrđeno je da na stvaranje aflatoksina u različitim biološkim materijalima utje- ču čimbenici poput vrste supstrata, sadržaja vlage u supstratu, prisutnosti aflatoksikogenih plijesni, prisutnosti mineralnih tvari te mehaničkog oštećenja zaštitne ovojnice zrna (Viquez i sur., 1994)

Aflatoksin B1 najsnažniji je karcinogem, a prema opadajućoj kancerogenosti slijede: G1, M1, B2, G2, M2, B2a, G2a i P1. Aflatoksin B1 je prisutan u najvećoj količini, koncentracija aflatoksina G1 ima srednje vrijednosti dok su B2 i G2 zastupljeni u relativno malim količinama.

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 i G za zelenu fluorescenciju (Prasanna i sur., 1975.).

Izvori aflatoksina u hrani: kruh, grah, soja, žitarice, mlijeko, jaja, meso, suhomesnati proizvodi, masline, maslinovo ulje, sva vrsta vina, kava, kakao, kikiriki, kokosov orah, pistacije, orasi, suho voće (smokve, grožđice i dr.), orasi i dr.

Što se tiče životinja za razliku od monogastričnih životinja preživači mogu podnijeti puno veću količinu aflatoksina u hrani i to bez vidljivih simptoma akutnog trovanja zahvaljujući mikroflori buraga koja u velikoj mjeri neutralizira aflatoksin. Ipak, s druge strane mlade životinje koje još nisu preživači i visokomliječne krave su osjetljive na djelovanje aflatoksina.

Aflatoksin iz hrane koju pojedu krave prijenosi se u mlijeko u omjeru od 1 do 6 %. Najveći prijenos zabilježen je kod visokomliječnih krava koje jedu puno žitarica. Najveća dopuštena količina aflatoksina u mlijeku je 0,05 mg/kg. Mlijeko koje sadrži veću količinu aflatoksina od dozvoljene ne smije se koristiti u ishrani ljudi niti hranidbi životinja. Takva pojava na žalost daje velike gubitke za poljoprivredno gospodarstvo.

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.).

Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (NN 80/10, 117/10, NN124/12) propisuje najviše dopuštene količine aflatoksina u proizvodima namijenjenim za hranu za životinje.

Tablica 1. Najviše dopuštene količine aflatoksina u proizvodima namijenjenim za hranu za životinje

NEPOŽELJNA TVAR	PROIZVODI NAMIJENJENI ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE	NAJVEĆA DOPUŠTENA KOLIČINA U mg/kg (ppm) KADA UDIO VLAGE U HRANI IZNOSI 12%
AFLATOKSIN (AFB1)	Krmiva	0,02
	Dopunske i potpune krmne smjese	0,01
	osim:	
	-krmnih smjesa za mliječna goveda i telad, mliječne ovce i janjad, mliječne koze i jarad, prasad i mladu perad	0,005
	-krmnih smjesa za goveda (osim za mliječna goveda i telad), ovce (osim mliječnih ovaca i janjadi), koze (osim mliječnih koza i jaradi), svinje (osim prasadi), perad (osim mlade peradi)	0,02

Izvor: Zakon o kontaminantima (NN 39/13)

Metaboliti aflatoksina M1 i M2 izdvojeni su iz mlijeka krava u laktaciji te su prema tome dobili i ime. Uz mlijeko, njihova prisutnost dokazana je u jajima i drugim proizvodima životinjskog podrijetla, koji tako predstavljaju neizravnu alimentarnu prijetnju za zdravlje ljudi (Goto i sur., 1996., Peterson i sur., 2001., EFSA, 2004.).

5.1. Aflatoksin B1

Aflatoksini, a naročito aflatoksin B1, se često mogu naći i u različitim začinima kao što su čili paprike i biber. Iako obje gljivice imaju jak afinitet prema orašastim plodovima i sjemenu suncokreta, pravog objašnjenja za ovo još uvijek nema. Kontaminacija se najčešće dešava prije žetve, a ne tijekom skladištenja, kako se ranije mislilo.

Aflatoksin B1 ima kancerogeni učinak na ljude i životinje. Pritom aflatoksin B1 je i do danas jedini mikotoksin za koji je dokazana kancerogenost u ljudi te je prema izvješću

Internacionalne agencije za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer) i svrstan u I. skupinu kancerogena (Shank i sur., 1972., Squire, 1981., IARC, 1982.).

U ljudi i stoke AFB1 može uzrokovati karcinom jetre i drugih organa, kako je to neosporno dokazano u nekoliko životinjskih vrsta, pri čemu su prvi simptomi gubitak apetita i gubitak na tjelesnoj masi (Busby i Wogan, 1984; Eaton i Gallagher, 1994). Aflatoksin M1 je metabolit aflatoksina B1, a nastaje u jetri ljudi i životinja. Uglavnom se izlučuje mokraćom, a kod mliječnih goveda i drugih sisara u laktaciji se izlučuje i mlijekom.

Aflatoksin B1 prisutan u hrani u količini od 1 mg/kg ili više u trajanju od četiri tjedna ili više. Iako se aflatoksin eliminira vrlo brzo iz tkiva nakon uklanjanja kontaminirane hrane (72-96 sati) (Trucksess i sur., 1983.; Leeson i sur, 1995.; EFSA, 2004.).

Vrlo je mala ili gotovo nikakva opasnost od rezidua aflatoksina u mesu. "Carry-over" (odnos koncentracije u hrani prema koncentraciji u tkivu, mlijeku, jajima i dr.) aflatoksina B1 iznosi:

- za goveđe meso je 10.000-14.000 : 1;

- za jaja od 500 : 1 do 40.000 : 1;

- za mlijeko krava i ovaca 70 : 1.

LD50 vrijednost aflatoksina B1 u većine životinjskih vrsta kreće se od 1 do 50 mg/kg, dok je najtoksičniji za pastrve, mačke i pačiće (LD50 < 1 mg/kg) (Leeson i sur.,1995).

U Republici Hrvatskoj primjenjuje se Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012.) koji je usvojio zahtjeve Europske Direktive 1881/2006. Za hranu za životinje u Republici Hrvatskoj također su prihvaćene Uredbe Europske komisije o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje (EC Direktiva 2002/32/EZ) te su Pravilnikom propisane samo maksimalne dozvoljene količine aflatoksina B1 (tablica 2.) (NN 124/2012.).

Tablica 2. Najveće dopuštene količine nepoželjnih tvari u hrani za životinje.

Nepoželjne tvari	Proizvodi namijenjeni za hranu za životinje	Najveća dopuštena količina u mg/kg (ppm), kada udio vlage u hrani za životinje iznosi 12%
1. Aflatoksin B1	Krmiva	0,02
	Dopunske i potpune krmne smjese	0,01
	osim:	
	– krmnih smjesa za mliječna goveda i telad, mliječne ovce i janjad, mliječne koze i jarad, prasad i mladu perad	0,005
	– krmnih smjesa za goveda (osim mliječnih goveda i teladi), ovce (osim mliječnih ovaca i janjadi), koze (osim mliječnih koza i jaradi), svinje (osim prasadi) i perad (osim mlade peradi)	0,02

Izvor: NN 124/2012.

U nekim zemljama svijeta utvrđena je izrazito onečišćenje lokalno uzgojenoga kukuruza, korištenog u krmivima u hranidbi životinja sa farmi za proizvodnju hrane, sa značajno povišenim razinama AFB1 u odnosu na propisane (EFSA, 2004; Pleadin i sur., 2014; Pleadin i sur., 2015.).

U brojnim zemljama svijeta utvrđeno je onečišćenje mliječnih proizvoda, sjemena pamuka, ječma, zrnja soje, peletirane pšenice, ljuski kikirikija te krmiva na bazi kukuruza i sirka (Decastelli i sur., 2007; Sassahara i sur., 2005.).

Kronična ingestija AFB1 ima različite štetne učinke, kao što su veća podložnost bolestima, te, kada je riječ o muznoj stoci, opadanje količine i kvalitete mlijeka. U životinja uzgajanih u svrhu proizvodnje mesa koje su konzumirale onečišćeno krmivo, ingestija AFB1 rezultira značajnim opadanjem kvalitete mesa (Bonomi i sur., 1994.).

Kontrolu nad usjevima podložnih onečišćenju sa AFB1 u razdoblju nakon žetve moguće je postići kontrolom nad čimbenicima koji utječu na rast plijesni, primjerice, uspostavljanjem kontrole nad udjelom i aktivnošću vode, temperaturom okoline, plinovima u atmosferi te uporabom insekticida ili konzervansa. Pri skladištenju zrnja žitarica i orašastih plodova pozornost je poglavito potrebno usmjeriti na održavanje aktiviteta vode na razini nižoj od one koja pospješuje rast plijesni (IARC, 2002.).

6. Metode redukcije aflatoksina

Zbog činjenice da prisutnost plijesni i/ili mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje i predstavljati gospodarski problem enormnih razmjera sve je veći naglasak na razvoj metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane. Metode nadzora nad zdravstvenom ispravnosti hrane u ovom području, moguće je svrstati u dvije kategorije: metode sprječavanja onečišćenja plijesnima i rasta plijesni i metode detoksikacije onečišćenih proizvoda (Riley i Norred, 1999., Mishra i Das, 2003.).

Primijenjena metoda redukcije AFB1 treba učinkovito inaktivirati ili u potpunosti ukloniti mikotoksin ne narušavajući pritom nutritivna i tehnološka svojstva proizvoda i ne stvarajući reaktivne toksične produkte (López-García i Park, 1998.). Rast plijesni na različite je načine moguće spriječiti i prije i nakon žetve. Metode redukcije mogu se podijeliti na kemijske, biološke i fizikalne (Kabar i sur., 2006.).

Učinkovitost metoda inaktivacije AFB1 ovisi o brojnim parametrima, primjerice o svojstvima hrane i krmiva, njihovu sastavu i sadržaju vlage te o razini onečišćenja. U pojedinim istraživanjima, detoksikaciju, odnosno inaktivaciju mikotoksina u onečišćenom krmivu, pokušalo se postići gama zračenjem, toplinskom inaktivacijom, fizičkim odjeljivanjem, razgradnjom mikrobne flore te različitim kemijskim postupcima (Piva i sur., 1995., Rustom 1997.).

Tablica 3. Prednosti i nedostatci pojedinih metoda u određivanju mikotoksina.

Metoda	Prednosti	Nedostaci
TLC	jednostavna, brza i jeftina *screening* metoda; mogućnost simultanog određivanja više mikotoksina; dobra osjetljivost metode za aflatoksine i okratoksin A	slaba osjetljivost metode (za neke mikotoksine); slaba preciznost metode; kvantitativna metoda samo kad se primjenjuje densitometar
GC	simultano određivanje više mikotoksina; dobra osjetljivost metode; mogućnost automatizacije (autosempler); potvrdna metoda (MS detektor)	skupa oprema; potrebni koraci derivatizacije; nelinearna kalibracijska krivulja; *carry over* efekti; varijacije u reproducibilnosti i repetibilnosti
HPLC	dobra osjetljivost, selektivnost i repetabilnost metode; mogućnost automatizacije (autosempler); kratko vrijeme trajanja analiza; dostupnost službenih analitičkih metoda	skupa oprema; potrebni koraci derivatizacije
LC/MS	simultano određivanje više mikotoksina; dobra osjetljivost i potvrdna metoda (LC/MS/MS); ne zahtijeva derivatizacijske korake	vrlo skupa oprema; osjetljivost se oslanja na tehnici ionizacije
ELISA	jednostavna priprema uzoraka; jeftina oprema visoke osjetljivosti; simultano određivanje više mikotoksina; pogodna kao *screening* metoda; limitirajuća uporaba organskih otapala	*cross* reaktivnost sa srodnim mikotoksinima; mogućnost lažno pozitivnih / negativnih rezultata; zahtijeva potvrdnu metodu
Brzi testovi	brze i jednostavne metode; ne zahtijevaju skupu opremu; limitirajuća uporaba organskih otapala; pogodni za *screening*	*cross* reaktivnost sa srodnim mikotoksinima; mogućnost lažno pozitivnih/negativnih rezultata; slaba senzitivnost

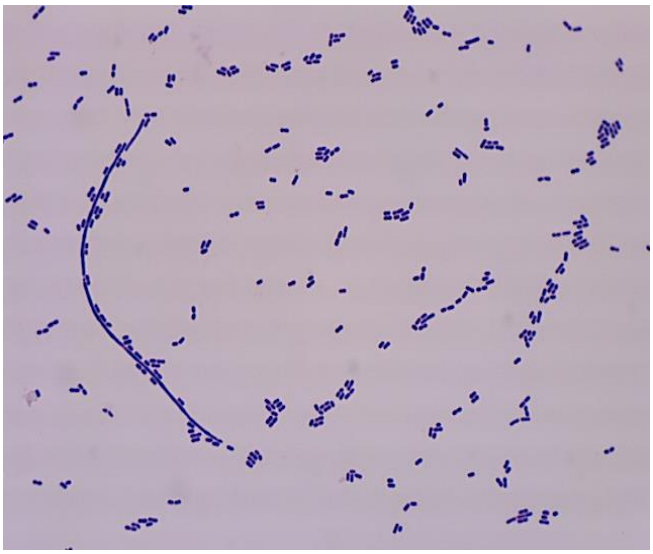
Izvor: (Perši, 2012.).

7. Biološke metode redukcije - korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina

Biosinteza ovisi o klimatskim i o okolišnim uvjetima, o vrsti toksikotvorne plijesni, fizikalno-kemijskim čimbenicima (temperaturi: od -5 do 60 ^{o}C, sadržaju vode u namirnici: 13% i više, a_w-vrijednosti: iznad 0,65, pH-vrijednosti: 3-9 te o sastavu namirnice i koncentraciji plinova u atmosferi.

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

Biološke metode redukcije mikotoksina temelje se na uporabi različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, kvasce i plijesni, koji mogu metabolizirati i inaktivirati aflatoksin, pri čemu je najdjelotvorniji *Flavobacterium aurantiacum.*



Slika 9. *Flavobacterium aurantiacum*

Izvor: http://www.jcm.riken.go.jp/cgi

Aflatoksin B-1 iz kikirikija i kukuruza može ukloniti djelovanjem bakterije *Flavobacterium aurantiacum*, također se proučavaju i metode dekontaminacije aflatoksina

M-1 iz mlijeka i mliječnih proizvoda.

Aflatoksine razaraju sljedeće bakterije: *Flavobacterium aurantiacum B -184*;

Nocardia coryne bacteroide;

Nocardia roides IFM 8;

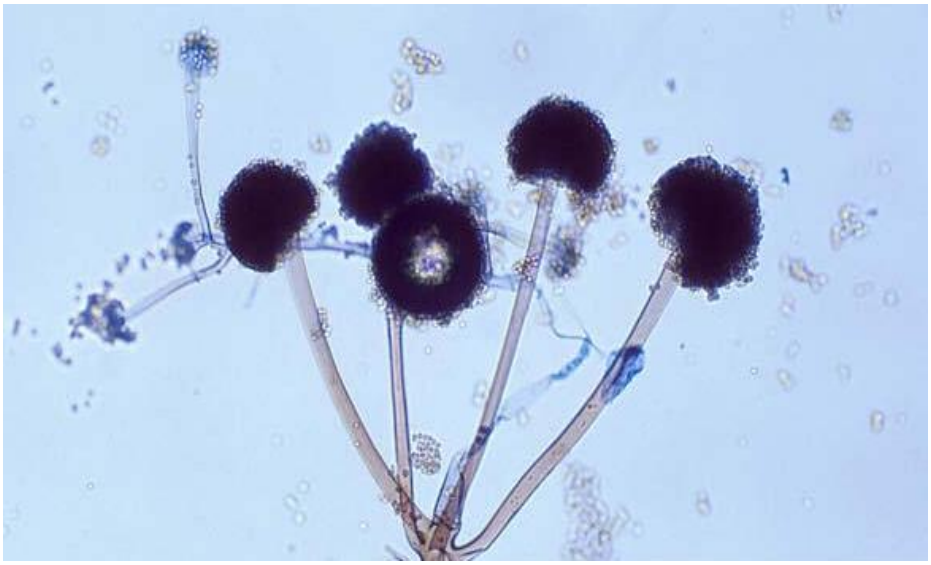
Mycobecterium fluoranthenivorans sp.

Nadalje, mogu se dodadavati sojevi plijesni iz roda *Aspergillus* ali koji ne proizvode aflatoksikane (npr. *Aspergillus niger, A. parasiticus*) i druge filamentozne gljive (npr. *Eurotium herboriorum, Rhizopus spp.*) koje tada vrše biotransformaciju aflatoksina (Tejda Castaneda i sur., 2008.).



Slika 10. *Eurotium herboriorum*

Izvor: http://fungi.myspecies.info/sites/fungi.myspecies



Slika 11. *Rhizopus sp.*

Izvor: http://www.mold.ph/rhizopus.htm

Pored netoksičnih plijeni danas s koriste enzimi izolirani iz *Rhizopus stolonifer* i *A. fumigatus* koji spečavaju stvaranje mikotoksina u skladištima (Smith i Grish, 2012.).



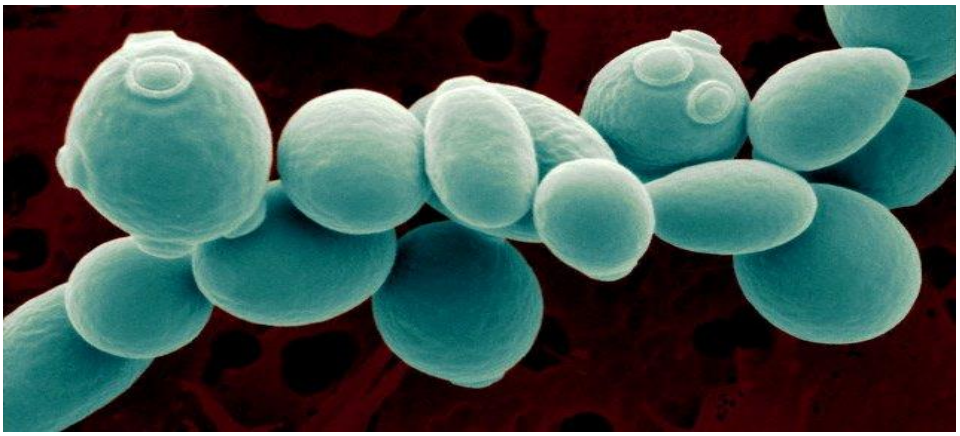
Slika 12. *Rhizopus stolonifer*

Izvor: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/olbrantz_chri/

Biološke metode uključuju korištenje sredstava za apsorpciju te mikroorganizme i enzime. Od mikroorganizama koji prevode toksički spoj u manje toksičan oblik, a ponekad ga uz nazočnost određenog enzima i razgrade, uključene su neke bakterije, posebice iz skupine bakterija mliječne kiseline, bifidobakterija i propionibakterija u hrani, s ciljem smanjenja koncentracije mikotoksina. Određene bakterije, zbog osobitosti stanične stjenke, mogu vezati mikotoksine te se stvoreni kompleks bakterija-mikotoksin izlučuje fecesom.

Glukomanan izoliran iz vanjskog sloja stanične stjenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* također se pokazuje kao uspješna vezujuća supstanca (npr. 0,5 kg glukomanana ima istu moć

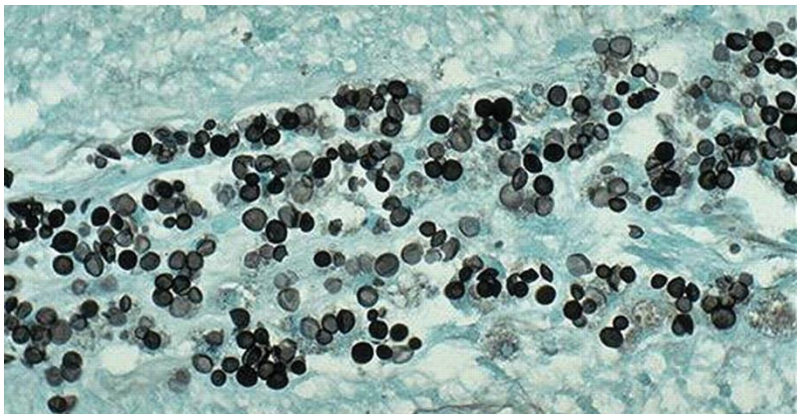
vezanja mikotoksina kao i 8 kg kaolina, odnosno gline). Glukomanan najviše veže AF (95%), ZEA (77%) i fumozin (67%), a u manjoj mjeri i druge mikotoksine.



Slika 13. *Saccharomyces cerevisiae*
Izvor: https://media.licdn.com/mpr/mpr/

Određeni sojevi mliječno kiselih bakterija, propionskih bakterija i bifidobakterija imaju strukturu stanične stijenke koja može vezati mikotoksine i na taj način ograničiti bioraspoloživost u tijelu životinja (Yiannikouris i Jouany, 2002.).

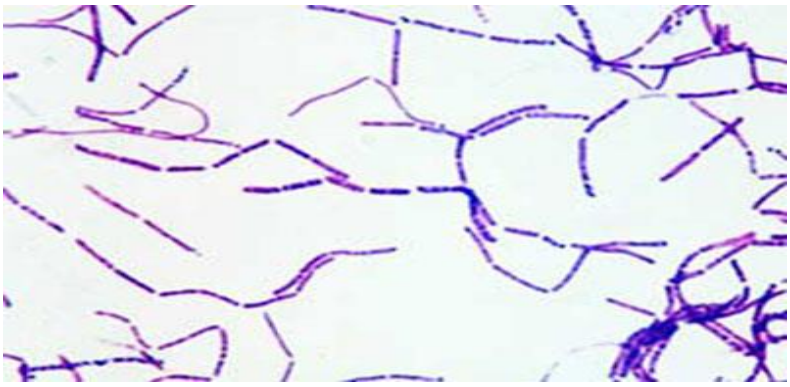
Pojedini kvasci i plijesni, npr. *Trichosporon mycotoxinivorans*, imaju sposobnost razgradnje mikotoksina, ali na tržištu postoje i pripravci odgovarajućih enzima (Klapec i Šarkanj, 2013.).



Slika 14. *Trichosporon mycotoxinivorans*
Izvor: http://jcm.asm.org/content/

Isto tako u razaranju aflatoksina uspješno su se pokazali deaktivirani kvasci *Trichosporon mycotoxinivorans* MTV 115.

Biosintezu aflatoksina inhibiraju i bakterije mliječne kiseline *Bacillus subtilis*. Proces industrijske fermentacije pokazalo je da bakterija ne dovodi do razgradnje aflatoksina, no dokazano je da se nakon destilacije u alkoholnoj frakciji ne nalazi toksin te da se obično aflatoksini koncentriraju u tropu.



Slika 15. *Bacillus subtilis*

Izvor: https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/

Kada se onečišćeni proizvod koristi u procesu fermentacije, važno je utvrditi u koju će svrhu onečišćeni nusprodukti u konačnici biti upotrijebljeni. Specifični spoj koji se pokaže učinkovitim dekontaminantom, obično je i s biološkoga stajališta i sa stajališta isplativosti bolje dodati izravno.

Waliyar i sur., (2007.) u literaturi se navode da je učinkovitost bioloških metoda koje su pokazale mogućnost dekontaminacije, obično ovisna o specifičnim spojevima koje proizvode odabrani mikroorganizmi kompeticiji za nutritivne tvari potrebne za stvaranje toksina, stvaranju anti-aflatoksigenih metabolita koje proizvode koegzistirajući mikroorganizmi.

Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmi. Među tim mikroorganizmima, bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju jedinstvenu skupinu koja se na- široko koristi u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su prirodno prisutne u raznoj hrani, gdje produžuju trajnost proizvoda, što je doprinijelo da budu prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje. BMK koje se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao starter kulture, mogu imati ulogu u smanjenju količine aflatoksina u hrani i krmivu (Haskard i sur., 2001., Peltonen i sur., 2001., Colak, 2007.).

Dokazano je vezanje aflatoksina s pomoću bakterija mliječne kiseline. Uz dokaze o korisnoj aktivnosti BMK, sposobnost vezanja aflatoksina im daje značajan potencijal za primjenu u funkcionalnoj hrani (Frece i sur., 2009.).

Mikrobiološke metode uključuju i kontaminaciju biljnog supstrata sa sojevima plijesni *A. flavus* i *A. parasiticus* koji će u međusobnom nadmetanju prerasti toksikotvorne sojeve plijesni.

Primjena eteričnih ulja i bakterija mliječne kiseline kao inhibitornih tvari na rast toksikotvornih plijesni u čistoj i mješovitoj kulturi i biosintezu mikotoksina (npr. OTA I ZEA).

Upravljanje rizikom povezanim uz kontaminaciju žitarica mikotoksinima moguće je primjenom i korištenjem dobre poljoprivredne prakse (GAP-Good agricultural practices) kao prvog koraka, potom dobre proizvođačke prakse (GMP – Good manufacturing practices) za vrijeme uskladištenja, obrade, prerade i distribucije te uključivanje HACCP sustava u čitavom lancu proizvodnje, od polja do stola (eng. Farm to table approach).

8. Zaključak

Mikotoksini i u malim količinama predstavljaju opasnost za zdravlje životinja, a i ljudi. Ljudi i životinje mikotoksine unose preko hrane, udisanjem ili preko kože. Aflatoksini su jedni od najtoksičniji mikotoksina. 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 su termostabilni, topljivi su u organskim otapalima, te su vrlo osjetljivi na alkalne otopine i kiseline, a u vodi se gotovo ne tope.

Općenito, mikotoksini imaju hepatotoksično, dermonekrotično imunosupresijsko nefrotoksično, kancerogeno, neurotoksično, i estrogeno djelovanje. Kontaminacija mikotoksinima može rezultirati znatnim ekonomskim gubitcima u stočarskoj proizvodnji, odnosno proizvodnji mesa i mesnih proizvoda, a ponajviše njihova prisutnost u namirnicama može neizravno negativno utjecati na zdravlje ljudi.

Suzbijanje, odnosno zaštita hrane i hrane za životinje od mikotoksina mora se provoditi kroz cijeli prehrambeni lanac „od uzgoja do stola“. Primjena bioloških metoda obuhvaća korištenje bifidobakterija, određenih sojeva bakterija mliječne kiseline i propionskih bakterija koje mogu vezati mikotoksine i na taj način ograničiti raspoloživost mikotoksina u tijelu životinja. Na tržištu postoje i pripravci odgovarajućih enzima.

9. Popis literature

1. Asefa D.T., Kure C.F., Gjerde R.O., Langsrud S., Omer M.K., Nesbakken T., Skaar I. (2011.) A HACCP plan for mycotoxigenic hazards associated with dry-cured meat production processes. Food Control, 22, 831-837.
2. Battilani P, Rossi V, Giorni P, Pietri A, Gualla A, van der Fels-Klerx HJ, Booij CJH, Moretti A, Logrieco A, Miglietta F, Toscano P, Miraglia M, De Santis B, Brera C: Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA, 2012.
3. Bonomi A., Quarantelli A., Mazzali I., Cabassi E., Corradi A., Lecce R., Ubaldi A., Fusari A., Chizzolini A. (1994.) Effects of aflatoxins B1 and G1 on productive efficiency, meat yield and quality in fattening pigs (experimental contribution). Journal of Food Science and Nutrition, 23, 251-277
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. Colak, H. (2007.): Determination of Aflatoxin M1 Levels in Turkish White and Kashar Cheeses Made of Experimentally Contaminated Raw Milk. Journal Of Food And Drug Analysis 15 (2), 163-168.
6. Decastelli L., Lai J., Gramaglia M., Monaco A., Nachtmann C., Oldano F., Ruffer M., Sezian A., Bandirola C. (2007.) Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. Food Control, 18, 1263–1266
7. 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. Duraković S: Toksični i kancerogeni metaboliti gljiva u namirnicama i krmivima. Hrana i ishrana, Zagreb, 1989.
10. Đilas, S., Živkov-Baloš , M., Mihaljev, Ž, Mrđen, M., Mašić Z. (2001.): Chemical, microbiological and mycotoxicological safety of animal diet mixes in the period from January 1999 to January 2000. Vet. glasnik (1-2), 61-67.

11. Eaton D. L., Gallagher E. P. (1994.) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 34, 135-172.
12. EFSA (2004.): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. EFSA Journal 39, 1-27.
13. Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2010.): Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. Meso XII (2), 92-98
14. Goto, T., D. T. Wicklow, Y. Ito (1996.): Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing Aspergillus tamarii strain. Appl. Environ. Microbiol. 62(11), 4036-4038.
15. Harley, R.M. (1997): Mycotoxins in cereals. 1-25. D'Mello J.F.D. (ed.), Mycotoxins and Environmental Health. Handbook for SAC Mycotoxin Workshop. Edinburg (England), September 1997.
16. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S, Kankaanpää, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. (2001.): Surface Binding of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 67 (7), 3086-3091.
17. Hussein, S. H., J. M. Brasel (2001.) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol.
18. Hussein, S. H., J. M. Brasel (2001.) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol
19. International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993.) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans Vol. 56, str. 245–395. IARC Lyon France: World Health Organization.
20. Joffe, A.Z. (1983.): Fusarium as field, stored and soil fungi under semiarid conditions in Israel. II-3: 95-110. Ueno, Y. (ed.), Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Kodansha LTD., Tokyo and Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York.
21. Kabar B., Dobson A. W., War I. (2006.) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, 593–619.
22. Kalenić S, Mlinarić-Missoni E: Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb, 1995

23. Kiermeier, F., Hemmerich, K. (1974.): Influence of light on watery aflatoxin B1 solutions. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 155: 81-84
24. Klapec T, Šarkanj B: Opasnosti vezane uz hranu, Kemijske i fizikalne opasnosti. Prehrambenotehnološki fakultet, 2014.
25. Knežević, Z. (2007.): Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima. Hrvatski časopis za javno zdravstvo, 9 (3).
26. Leeson, S., G. Diaz, J. D. Summers (1995.): Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. Ontario, Canada: University Books.
27. Lević, J., Stojkov, S. (2002.): Stvaranje fuzariotoksina u uslovima proizvodnje i čuvanja kukuruza. Agroinovacije 3, 153-161.
28. Lončarević, A. Penčić, V., Smiljaković, H., Gotovčić, S. (1972.): Mikotoksikoza svinja prouzrokovana gljivicama roda Fusarium. Dokumentacija za tehnologiju i tehniku u poljoprivredi (9-10), 1-7.
29. Mann, G., Coifer, L., Dollear, F. (1967.): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals. J. Agric. Food Chem, 15:1090-1092.
30. Marth, E., Dole, M. (1979.): Update on molds: degradation of aflatoxin. Food tehnol., 33:81-87.
31. 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
32. Mishra H. N., Das C. (2003.) A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43(3), 245–264
33. Nelson, P.R., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. (1993.): Fumonisins, mycotoxins produced by Fusarium species: Biology, chemistry, and significance. Ann. Rev. Phytopathol. 31, 233-252.
34. Nujić M: Antifugalni učinak eteričnih ulja Cinnamomum cassia, Litsea cubeba i timola na odabrane plijesni roda Penicillium. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
35. Ožegović L., Pepeljnjak S. (1995.) Mikotoksikoze. Školska knjiga
36. Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. (2001): Aflatoxin B1 binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal of Dairy Science 84 (10), 2152-2156.
37. Peraica, M., Domljan, A-M., Jurjević, Ž.,Cvjetković B (2002.): Prevention of exposure to mycotoxis from foof and feed. Arh hig Rada Toksikol 53, 229 -237.

38. Peraica, M.,Rašić D.(2012): The inpact of mycotoxicoses on human history . Arh hig Rada Toksikol 63, 511- 516.
39. Perši N. (2012.) Ostaci okratoksina A u sirovinama i proizvodima od svinjskog mesa nakon subkroničnog tretmana. Doktorski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska.
40. Peterson, S. W., Y. Ito, B. W. Horn, T. Goto (2001.): Aspergillus bombycis, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, A. nomius. Mycologia 93(4), 689-703
41. Piva G., Galvano F., Pietri A., Piva A. (1995.) Detoxification methods of aflatoxins. A review. Nutrition Research, 15, 767-776.
42. Pleadin J., Vulić A., Perši N., Škrivanko M., Capek B., Cvetnić Ž. (2015.). Annual and regional variations of aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. Food Control, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.017, in press.
43. Prasanna, H., Gupta, S., Viswanathan, L., Venkitasubramanian, T. (1975.): Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 159:319-322
44. Prasanna, H., Gupta, S., Viswanathan, L., Venkitasubramanian, T. (1975.): Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1. Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 159:319-322.
45. Richard, J. L. (2007.)Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. Int. J. Food Microbiol. str. 119, 3–10.
46. Riley R. T., Norred W. P. (1999) Mycotoxin prevention and decontamination. Corn – a case study. Third Joint FAO/ WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, Tunis, Tunisia, 11.
47. Rustom I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry, 59, 57-67.
48. Rustom I. Y. S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry, 59, 57-67.
49. Shank, R. C., N. Bhamarapravati, J. E. Gordon, G. N. Wogan (1972.): Dietary aflatoxins and human liver cancer. IV Incidence of primary liver cancer in two municipal populations in Thailand. Food Cosmet. Toxicol. 10(2), 171-179.

50. Sassahara M., Netto D. P., Yanaka E. K. (2005) Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Parana state. Food and Chemical Toxicology, 43, 981-984.
51. Smith, J.E. (1997.): Aflatoxins. U: D'Mello JPF Handbook of Plant and Fungal Toxicants. CRC Press, Boca Raton 319-337.
52. Squire, R. A. (1981.): Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. Science 214(4523), 877-880.
53. Šarkanj B, Klapec T: Opasnosti vezane uz hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
54. Trucksess, M.W., L. Stoloff, K. Young, R. D. Wyatt, B. L. Miller (1983.): Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. Poult. Sci. 62(11), 2176-2182.
55. Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. (2009.) Analytical methods for determination of mycotoxins. Analytica Chimica Acta, 632, 168-180.
56. Valpotić, H., Šerman V. (2006.) Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. Krmiva str. 48, 33-42.
57. Valpotić, H., Šerman, V. (2006.): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. Krmiva, 48:33-42.
58. Waliyar F., Ravinder Reddy Ch., Alur A. S., Reddy S. V., Reddy B. V. S., Reddy A. R., Rai K. N., Gowda C. L. L. (2007.) Management of Grain Mold and Mycotoxins in Sorghum. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 32.
59. 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.
60. y. Animal Feed Science and Technology, 173, 134-158. Busby W. F., Wogan G. N. (1984) Aflatoxins. U: Searle, C.E. (ed.): Chemical carcinogens, str. 945-1136. American Chemical Society, ISBN 0841208697, Washington, D.C., USA.
61. Yiannikouris A, Jouany JP: Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Animal Research 51:81-99, 2002.
62. Zakon o kontaminantima (NN 39/13).
63. Zakon o kontaminantima (NN 124/2012.)
64. Zakon o kontaminantima (NN 80/10).

65. Zakon o kontaminantima (NN 117/10).

10. Sažetak

Aflatoksini su mutageni, kancerogeni i teratogeni spojevi i njihova prisutnost u organizmu tijekom dužeg vremenskog razdoblja i u ekstremno malim količinama, može biti opasna za ljudsko zdravlje. Toksični metaboliti aflatoksina mogu se naći i u proizvodima životinjskog podrijetla, mlijeku i mesu, ukoliko je prethodno hrana za životinje bila onečišćena plijesnima, a onečišćenje ovisi o geografskom području, klimatskim uvjetima, vlazi i temperaturi (Sassahara i sur., 2005.). Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmi. Biološke metode redukcije mikotoksina temelje se na uporabi različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, kvasce i plijesni, koji mogu metabolizirati i inaktivirati aflatoksin, pri čemu su najdjelotvornija vrsta *Pseudomonas fluorescens*, te vrste roda *Bacillus*.

11. Summary

Aflatoxins are mutagenic, carcinogenic and teratogenic compounds and their presence in the body over a long period of time and in extremely small quantities may be hazardous to human health. Tobacco metabolites of aflatoxins can also be found in products of animal origin, milk and meat, if previous feedstuffs were contaminated with molds, and contamination depends on the geographic area, climatic conditions, humidity and temperature (Sassahara et al., 2005). Many microorganisms, including bacteria, yeasts, molds, actinomycetes and algae, can remove or reduce aflatoxins in food and stomach. The mycotoxin reduction methods are based on the use of various microorganisms, including bacteria, yeasts and molds, that can metabolize and inactivate aflatoxin, whereby the most effective is species *Pseudomanas fluorescens and species* of genus *Bacillus.*

12. Popis slika

Slika 1. Mikotoksin (str. 2)

Slika 2. Put mikotoksina u hranidbenom lancu (str. 3)

Slika 3. *Aspergillus sp.* (str. 5)

Slika 4. Crtež plijesni roda *Aspergillus* (str. 6)

Slika 5. Mikroskopska slika plijesni roda *Aspergillus* (str.6)

Slika 6. Konidiofor *A. flavusa* (str. 7)

Slika 7. Životni ciklus plijesni *A. flavus* (str. 8)

Slika 8. Kemijske strukture glavnih predstavnika aflatoksina (str. 10)

Slika 9. *Flavobacterium aurantiacum* (str. 17)

Slika 10. *Eurotium herboriorum* (str. 18)

Slika 11. *Rhizopus sp.* (str. 19)

Slika 12. *Rhizopus stolonifer* (str. 19)

Slika 13. *Saccharomyces cerevisiae* (str. 20)

Slika 14. *Trichosporon mycotoxinivorans* (str. 20)

Slika 15. *Bacillus subtilis* (str. 21)

13. Popis tablica

Tablica 1. najviše dopuštene količine aflatoksina u proizvodima namijenjenim za hranu za životinje (str. 12)

Tablica 2. Najveće dopuštene količine nepoželjnih tvari u hrani za životinje (str. 14)

Tablica 3. Prednosti i nedostatci pojedinih metoda u određivanju mikotoksina (str. 16)

TEMELJNA DOKUMENTARNA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku Sveučilišni diplomski studij Vinogradarstvo i vinarstvo

Korištenje mikrobioloških preparata u suzbijanju aflatoksina

Hrvoje Rimar

Sažetak: Aflatoksini su mutageni, karcinogeni i teratogeni spojevi i njihova prisutnost u organizmu tijekom dužeg vremenskog razdoblja i u ekstremno malim količinama, može biti opasna za ljudsko zdravlje. Toksični metaboliti aflatoksina mogu se naći i u proizvodima životinjskog podrijetla, mlijeku i mesu, ukoliko je prethodno hrana za životinje bila onečišćena plijesnima, a onečišćenje ovisi o geografskom području, klimatskim uvjetima, vlazi i temperaturi (Sassahara i sur., 2005.). Mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce, plijesni, aktinomicete i alge mogu ukloniti ili smanjiti količine aflatoksina u hrani i krmi. Biološke metode redukcije mikotoksina temelje se na uporabi različitih mikroorganizama, uključujući bakterije, kvasce i plijesni, koji mogu metabolizirati i inaktivirati aflatoksin, pri čemu je najdjelotvorniji *Flavobacterium aurantiacum*. Biosintezu aflatoksina inhibiraju i bakterije mliječne kiseline *Bacillus subtilis*

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo

Broj stranica: 36

Broj slika: 15

Broj literaturnih navoda: 62

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mikotoksini, alfatoksini, preparati, biološko suzbijanje

Datum obrane:

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. **Prof.dr.sc. Suzana Kristek, predsjednik**
2. **Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, mentor**
3. **Prof.dr.sc. Gordana Bukvić, član**
4. **Doc.dr.sc. Sanda Rašić, zamjenski član**

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

BASIC DOCUMENTATION CARD
University of Osijek **Graduate thesis**

Faculty of Agriculture University graduate study Winery

Use of microbiological preparations for the suppression of aflatoxins

Hrvoje Rimar

Summary: Aflatoxins are mutagenic, carcinogenic and teratogenic compounds and their presence in the body over a long period of time and in extremely small quantities may be hazardous to human health. Tobacco metabolites of aflatoxins can also be found in products of animal origin, milk and meat, if previous feedstuffs were contaminated with molds, and contamination depends on the geographic area, climatic conditions, humidity and temperature (Sassahara et al., 2005). Many microorganisms, including bacteria, yeasts, molds, actinomycetes and algae, can remove or reduce aflatoxins in food and stomach. The mycotoxin reduction methods are based on the use of various microorganisms, including bacteria, yeasts and molds, that can metabolize and inactivate aflatoxin, whereby the most effective *Flavobacterium aurantiacum* is. The aflatoxin biosynthesis also inhibits *Bacillus subtilis* lactic *Acid bacteria.*

The work was created at: Faculty of Agriculture

Mentor: Phd. Drago Bešlo

Pages: 35

Number of photos: 15

Number of references: 62

Original in: Croatian

Keywords: Berries, bioproducts, pesticides, resources

Date of defense:

Commission for evaluation and defense of thesis:

1. **PhD. Suzana Kristek, President**
2. **Phd. Drago Bešlo, mentor**
3. **PhD. Gordana Bukvić, member**
4. **PhD Sanda Rašić, a replacement member**

The work is stored in the Library, Faculty of Agriculture, University of Osijek, King Peter Svačića 1d