

## UČESTALOST FUZARIJSKIH MIKOTOKSINA U KRMNIM SMJESAMA, 1989. - 1998.

## FREQUENCY OF FUSARIUM MYCOTOXINS IN ANIMAL FEED, 1989 - 1998

Perica Pavičić, Vlasta Brlek, Ankica Nemanić

Izvorni znanstveni članak  
UDK: 636.085.19  
Primljeno: 10 svibanj 1999.

### SAŽETAK

U radu su prikazani rezultati desetogodišnjeg istraživanja (1989.-1998.) učestalosti fuzarijskih mikotoksina u 2.562 uzorka krmnih smjesa za perad (2.379) i svinje (183). Trikotecenski mikotoksini T-2 i diacetoxyscirpenol (DAS) su metodom tankoslojne kromatografije utvrđeni u prosječno 18% i 50,5% pretraženih uzoraka krmnih smjesa za perad. Učestalost T-2 toksina bila je najviše izražena 1991. i 1992. godine (50%, 43%), dok je nalaz DAS-a bio najučestaliji 1992., 1995. i 1997. godine (75%, 74%, 73%). Prosječno utvrđena koncentracija trikotecena bila je oko 0.20 mg/kg, a maksimalna koncentracija je bila 1,50 mg/kg. Zearalenon (ZON) i derivati ( $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenol) određivani su metodom reverznofazne visokotlačne tekućinske kromatografije u krmnim smjesama za svinje pri izraženoj sumnji na zearalenontoksikozu. ZON i derivati prosječno su nađeni u 12% pretraženih uzoraka, a najveći postotak pozitivnih uzoraka zabilježen je 1997. godine (50%). Minimalna zabilježena koncentracija ZON-a i derivata bila je 0.06 mg/kg dok je maksimalna od 6.83 mg/kg zabilježena 1990. godine.

### UVOD

Vrste *Fusarium* rasprostranjene su širom svijeta, u svim klimatskim područjima (CHELKOWSKI, 1989.) kao parazitske ili saprofitske plijesni, uzrokujući fuzarioze kukuruza (trulež klipa, stabljike i zrna, kržljivost stabljike) i ostalih gospodarski značajnih žitarica. U Hrvatskoj pripadaju najučestalijim plijesnima na sirovinama i gotovim krmnim smjesama (BRLEK i sur., 1998., PAVIČIĆ i sur., 1998.), a najčešće izdvojene vrste su *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. moniliforme*, *F. tricinctum*, *F. clamidosporum*, *F. nivale* i *F. solani* (NEMANIĆ i BRLEK, 1989.). Utjecajem bioloških te fizikalno-kemijskih čimbenika, fuzarije proizvode čitav niz miko-

toksina od kojih su, s gledišta zdravlja i proizvodnosti životinja, najznačajniji trikoteceni, zearalenon, moniliformin i fumonizini (D'MELLO i MACDONALD, 1997.). Zajedničko obilježje većine vrsta *Fusarium* je sposobnost istodobne proizvodnje nekoliko različitih mikotoksina. Tako *F. tricinctum* proizvodi DAS, T-2 toksin, HT-2 toksin, T-2 tetraol, nivalenol (NIV), fuzarin C i zearalenon (ZON), a *F. poae* osim T-2 i DAS-a proizvodi, deoxynivalenol (DON) i nivalenol (NIJIS i sur., 1997.). S obzirom na

Perica Pavičić, dipl. vet., Dr. sc. Ankica Nemanić, Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Zagreb - Hrvatska, Vlasta Brlek, dipl. vet., Euroinspekt - Croatiakontrola, Zagreb - Hrvatska.

veliku učestalost ovih plijesni, krmne smjese često su zagađene s nekoliko fuzarijskih mikotoksina, djelovanje kojih je tada aditivno i/ili sinergističko, što je važan čimbenik u etiologiji mikotoksikoza.

Trikoteceni su skupina biološki aktivnih sekundarnih proizvoda mijene tvari nekoliko vrsta plijesni *Fusarium* te rodova *Stachibotrys*, *Myrothecium*, *Trichotecium*, *Trichoderma* i *Cephalosporium*. Do danas je identificirano i kemijski okarakterizirano 79 trikotecenskih mikotoksina (NIJIS i sur., 1997.) no u prirodi se nalaze samo T-2 toksin, HT-2 toksin, 4,15-diacetoxyscirpenol (DAS), 15-monoacetoxyscirpenol (MAS) te deoxynivalenol (DON) (BAUER i sur., 1989.). Trikotecena je zabilježena u kukuruzu, ječmu, pšenici, zobi i gotovim krmnim smjesama u većini Europskih zemalja, obično u količinama oko 0.50 mg/kg i manje (GAREIS i sur., 1989.). Od svih poznatih trikotecena perad je najosjetljivija na T-2 toksin i DAS čiji je biološki učinak posljedica njihovog dermatoksičnog, citotoksičnog i imunosupresivnog djelovanja. LESSON i sur., 1995. opisuju zaostajanje u rastu, pad tjelesne mase i lošu konverziju hrane u pilića pokusno trovanih s 0.40-5 mg/kg trikotecena, dok se u kokoši nesilica opaža pad nesivosti, umanjena valivost oplodjenih jaja te pojava jaja s tankom ljuskom (DIAZ i sur., 1994.). Imunosupresivan učinak ovih mikotoksina opisuju NEMANIĆ i sur., 1989 koji u pilića pokusno trovanih s 1 mg/kg T-2 toksina opažaju potiskivanje u razvoju imunokompetentnih organa te umanjen odgovor na uporabljene vakcine.

Zearalenon (ZON) je estrogenski mikotoksin, sekundarni proizvod mijene tvari nekoliko vrsta fuzarija, posebice kulture *F. roseum* "Gibbosum" i *F. roseum* "Graminearum". Poznato je 12 derivata zearalenona (VESONDER i GOLINSKI, 1989), no jedino je za  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenol dokazana toksičnost. PETERS, 1972. navodi da je  $\alpha$ -zearalenol nešto više od tri puta aktivniji od ZON-a, dok je  $\beta$ -zearalenol nešto slabijeg estrogenog djelovanja. Zearalenon je najčešće izoliran iz kukuruza, ali i iz ostalih žitarica te sijena i silaže. O nalazu ovog mikotoksina u Hrvatskoj izvještuje nekoliko autora. KRALJ i sur., 1988. i MITAK, 1993. ga nalaze u kukuruzu u 82%, odnosno 20% pretraženih uzoraka, dok NEMANIĆ i sur., 1986. bilježe 30% onečišćenih krmnih smjesa za svinje. Estrogeno djelovanje najizrazitije je kod nazimica i gravidnih

krmača, a klinički se očituje oteklinom stidnice i mamarnog kompleksa, prolapsusom uterusa i rektuma, a česta je pojava abortus ili mrtvorodena prasada (OŽEGOVIĆ i PEPELJNJAK, 1995.). Tako MITAK i CVETNIĆ, 1997. opisuju pojavu pseudoestrogenizma u svinja kao posljedicu trovanja zearalenonom u količini od 0.34 mg/kg, dok u kukuruzu koji je bio ugrađen u krmnu smjesu nalaze 0.80 mg/kg.

Cilj provedenog istraživanja bio je prikazati učestalost trikotecenskih mikotoksina te zearalenona i derivata, za koje su istraživanja u svijetu i u nas pokazala da imaju značajnu ulogu u patologiji životinja u farmskom uzgoju.

## MATERIJAL I METODE

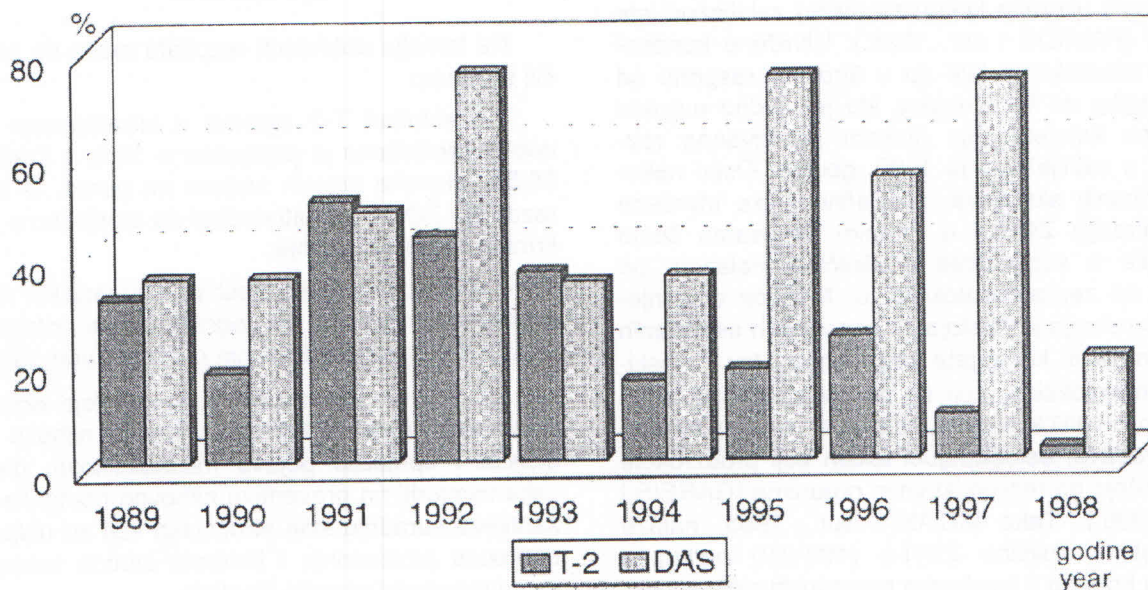
Tijekom desetogodišnjeg razdoblja (1989.-1998.) istraživana je učestalost fuzarijskih mikotoksina u 2.562 uzorka krmnih smjesa za perad (2,379) i svinje (183). Uzorci su prikupljeni s peradarskih i svinjogojskih farmi, tvornica stočne hrane i obiteljskih gospodarstava. Krmne smjese za perad pretraživane su na trikotecenske mikotoksine (T-2 i DAS) u okviru sustavnog praćenja zdravlja i proizvodnosti peradi, dok su krmne smjese za svinje pretraživane na zearalenon i derivate ( $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenol) isključivo kod sumnji na trovanje. Za određivanje mikotoksina korišteni su različiti postupci detekcije. T-2 i DAS određivani su metodom tankoslojne kromatografije na silika gelu. Primijenjena je modificirana metoda po ROMER i sur., 1978. i SANO i sur., 1982. Rezultati su određeni kvantitativno pod UV lampom pri valnoj duljini od 360 nm. Pretrage na zearalenon i derivate obavljene su metodom reverznofazne visokotlačne tekućinske kromatografije postupkom po ERLICH i LEE, 1984., a od 1992. godine korištena je modificirana metoda po BENNET i sur., 1985. Zearalenon i derivati detektirani su na spektrofotometru pri valnim duljinama od 280 nm ( $\lambda_{EX}$ ) i 465 nm ( $\lambda_{EM}$ ). Za izračunavanje količine mikotoksina korištene su standardne otopine T-2 toksina, DAS-a (Sigma), zearalenona i  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenola (Macor Chemicals).

## REZULTATI I RAZMATRANJE

Grafikonom 1 prikazani su rezultati istraživanja učestalosti nalaza trikotecenskih mikotoksina (T-2 i DAS) u krmnim smjesama namijenjenim hranidbi peradi. Od ukupnog broja pretraženih uzoraka u prosječno 18% nađen je T-2 toksin. Kako je vidljivo iz grafikona 1 učestalost T-2 toksina najviše je bila izražena 1991. (50%) i 1992. godine (43%), dok se tijekom slijedećih godina, do 1994. bilježi pad pozitivnih uzoraka. Godine 1995. i 1996. T-2 toksin je detektiran u 17% i 23% pretraženih uzoraka, a nakon 1996. učestalost je sve manja, pa je tako 1998. godine zabilježeno svega 2% pozitivnih uzoraka. Dugogodišnju učestalost T-2 toksina u krmnim smjesama opisuje i PEPELJNJAK, 1989. koji u dvanaestogodišnjem razdoblju (1975.-1987.) nalazi prosječno 26.6% onečišćenih uzoraka. Za razliku od T-2 toksina, DAS je u istraživanom razdoblju bio nađen u prosječno 50.5% uzoraka. Godine 1989. zabilježen je u 35% uzoraka, a narednih godina učestalost je u porastu i 1992. dostiže 75%. Godine 1993. i 1994. učestalost nalaza DAS-a stagnira (34%, 35%), a od 1995. ponovno se bilježi zagađenost u 74% i 1997. godine u 73% uzoraka. Prosječno utvrđene

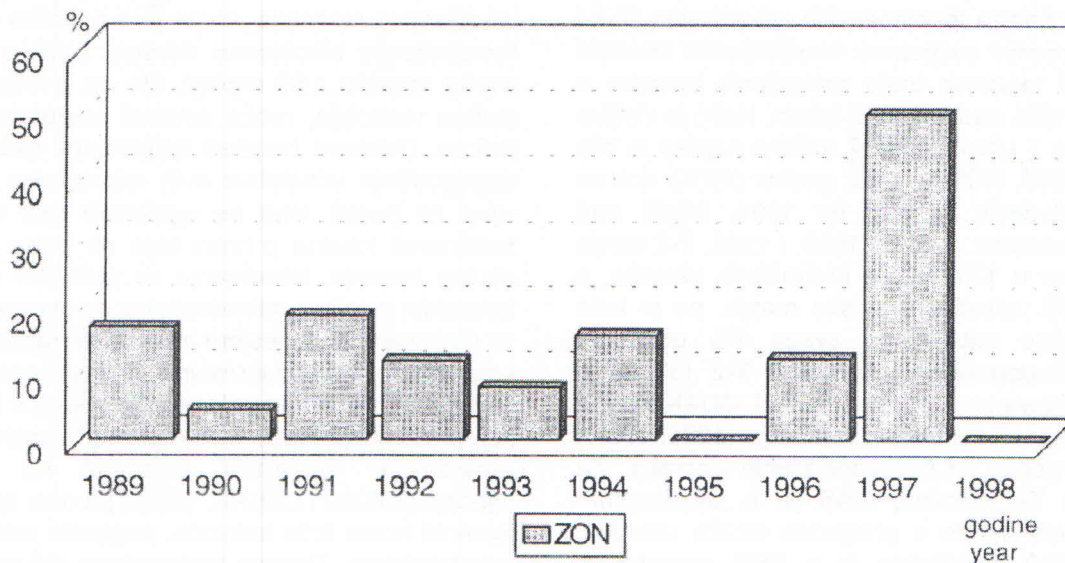
koncentracije T-2 i DAS-a bile su oko 0.20 mg/kg, što je u suglasnosti s rezultatima GAREIS i sur., 1989. u ostalim europskim zemljama. Tijekom istraživanog razdoblja, samo je u nekoliko uzoraka koncentracija trikotecena dosegla količinu od 1.0 mg/kg (najviše 1.50 mg/kg), što se, s obzirom na dužinu razdoblja, može smatrati izuzetnim slučajevima. Dobiveni rezultati istraživanja ukazuju na dugogodišnju učestalost ovih mikotoksina u krmivima za perad. Iako se uglavnom radi o malim količinama toksina u hrani koje ne mogu izazvati akutno trovanje, istraživanja su pokazala da su u terenskim uvjetima mikotoksikoze uzrokovane upravo dugotrajnim hranjenjem malim količinama toksina koje djeluju imunosupresivno. Tome pogoduje činjenica da moderne hibridne linije peradi u intenzivnoj proizvodnji imaju visok prirodni potencijal, a istovremeno umanjenu otpornost na vanjske utjecaje (MIKEC i LUKAČ, 1996.) pa nisu sposobne tolerirati hranu loše kakvoće, poglavito onečišćenu mikotoksinima. Tijekom proizvodnog ciklusa, nepovoljno djelovanje ovih toksina odražava se na povećanu osjetljivost na bolesti, umanjen odgovor na uporabljene vakcine te neučinkovitošću protukokcidijskih pripravaka što sve ima za posljedicu znatne štete u stočarskoj proizvodnji.

Grafikon 1. Učestalost trikotecenskih mikotoksina u krmnim smjesama za perad (1989. - 1998.)  
Figure 1. Frequency of trichothecenes mycotoxins in mixed poultry feed (1989. - 1998.)



Grafikon 2. Učestalost zearalenona i derivata u krmnim smjesama za svinje (1989. - 1998.)

Figure 2. Frequency of zearalenone and its derivatives in swine feed (1989. - 1998.)



Rezultati istraživanja učestalosti ZON-a i derivata u krmnim smjesama za svinje prikazani su grafikonom 2. U istraživanom razdoblju detektirani su prosječno u 12% uzoraka, a učestalost prema pojedinim godinama od 1989.-1996. bila je u rasponu od 4.3% do 19%. Godine 1995. i 1998. nije zabilježen niti jedan pozitivan uzorak. Najveća učestalost zearalenona zabilježena je 1997. godine (50%) čemu je vjerojatno pridonio visok postotak zagađenih uzoraka kukuruza (56%) zabilježen iste godine (PAVIČIĆ i sur., 1998.). Utvrđene koncentracije mikotoksina bile su u širokom rasponu od 0.06 mg/kg do 6.83 mg/kg, što je ujedno najveća utvrđena koncentracija tijekom istraživanog razdoblja, a zabilježena je 1990. godine. Osim nekoliko iznimnih slučajeva, prosječno niske utvrđene koncentracije ZON-a u krmnim smjesama često nisu bile u suglasnosti s kliničkim nalazom pri sumnji na zearalenontoksikozu. Moguće objašnjenje ovog stanja je postojanje nepoznatih estrogenih komponenti ili konjugata zearalenona tzv. "maskiranih" mikotoksina, koji se ne mogu utvrditi uobičajenim analitičkim postupcima, a razlažu se tijekom probave, oslobađajući toksin koji prouzrokuje poremećaje na reproduktivnim organima (GAREIS i sur., 1990.). Tako MITAK i sur., 1995. nalaze subtoksične količine ZON-a (100-250 ng/kg) u serumu krmača s izraženim reproduktivnim promje-

nama u proizvodnji, a MEYER i sur., 1997. detektiraju ZON i  $\alpha$ -zearalenol u obliku glukuronid konjugata u nazimica s izraženim znakovima zearalenontoksikoze te potvrđuju pretpostavku da se ZON nalazi puno češće u krmnim smjesama nego što pokazuju rezultati pretraga.

#### ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- učestalost T-2 toksina u istraživanom razdoblju zabilježena je prosječno u 18%, a DAS-a u 50,5% uzoraka krmnih smjesa za perad. U istom razdoblju ZON i derivati nađeni su prosječno u 12% krmnih smjesa za svinje.

- višegodišnja prisutnost ovih fuzarijskih mikotoksina nedvojbeno se odražava na zdravlje i proizvodne rezultate životinja u intenzivnom uzgoju.

- s obzirom da do danas ne postoje dovoljno učinkovita sredstva koja bi umanjila njihovu toksičnost i spriječila pojavu mikotoksikoza, pažnju valja usmjeriti na preventivu njihovog nastanka, što zahtijeva suradnju svih stručnjaka koji su uključeni u proces proizvodnje i kontrole stočne hrane, te uzgoj i kontrolu zdravlja životinja.

## LITERATURA

1. Bauer, J., M. Gareis, B. Gedek (1989): Metabolism of trichothecenes T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, and deoxynivalenol by farm animals. U: Chelkowski, J. (ured.): *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, Vol. 2 Elsevier 139-165.
2. Bennet, G., O. L. Shotwell, W. F. Kwolek (1985): Liquid chromatographic determination of  $\alpha$ -zearalenol and zearalenone in corn: collaborative study. *J. A. O. A. C.* 68, 958-961.
3. Brlek, Vlasta, Perica Pavičić, Jasna Vedrinar (1998): Kontaminacija kukuruza i smjesa za ishranu životinja fuzarijum vrstama i njihovim mikotoksinima. Zbornik radova DDD '98, Stubičke toplice, 22. do 24. travanj 1998.
4. Chelkowski, J. (1989): Mycotoxins associated with corn cob fusariosis. U: Chelkowski, J. (ured.): *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, Vol. 2. Elsevier 53-62.
5. Diaz, G. E., E. J. Squires, R. J. Jullian, H. J. Boermans (1994): Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *British Poultry Sci.* 35, 393-405.
6. D'Mello, J. P. F., A. M. C. Macdonald (1997): Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Techn.* 69, 155-166.
7. Erlich, K. C., L. S. Lee (1984): Mycotoxins in grain dust. *J. A. O. A. C.* 67
8. Gareis, M., J. Bauer, C. Enders, B. Gedek (1989): Contamination of cereals and feed with *Fusarium* mycotoxins in European countries. U: Chelkowski, J. (ured.): *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*, Vol. 2 Elsevier 441-472.
9. Gareis, M., J. Bauer, J. Thlem, G. Plank, S. Grabley, B. Gedek (1990): Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxins, during digestion in swine. *J. Vet. Med. B.* 37, 236-240.
10. Kralj, M., Z. Bidin, Ankica Nemanič (1988): Skupni prikaz sindroma otrovanja mikotoksinima prema podacima iz literature s naročitim osvrtom na pojavu u peradi. *Peradarstvo.* 23, 215-265.
11. Leeson, S., G. Diaz, J. D. Summers (1995): *Poultry metabolic disorders and mycotoxins.* University Books, Guelph, Ontario, Canada.
12. Meyer, K., E. Usleber, E. Martlbauer, J. Bauer (1997): Nachweis von Zearalenon-Metaboliten in Gallen von Zuchtsauen mit Fertilitätsstörungen, *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* 110, 281-283.
13. Mikec, M., Irena Lukač (1996): Djelovanje stresa na zdravlje i proizvodnost peradi. Zbornik radova Peradarski dani '96 Poreč, 17-19. listopada 1996. 76-81.
14. Mitak, M. (1993): Prirodna kontaminacija mikotoksinom zearalenonom i mogućnost brzog dokazivanja u terenskim uvjetima. *Vet. stanica* 24 (3) 139-148.
15. Mitak, M., S. Topolko, Ž. Cvetnić (1995): Određivanje zearalenona u serumu nazimica imunoenzimskim testom (ELISA). *Vet. stanica* 26 (1) 11-16.
16. Mitak, M., Ž. Cvetnić (1997): Estrogenizam u svinja kao posljedica intoksikacije zearalenonom. *Vet. stanica* 28 (4) 213-217.
17. Nemanič, Ankica, Vlasta Brlek, Danica Ramljak, Dubravka Matešić (1986): Nalazi mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama za ishranu peradi i drugih domaćih životinja. Zbornik radova II Simpozij o mikotoksinima. Sarajevo 19. studeni 1985. ANUBIH, knjiga LXXX 51-57.
18. Nemanič, Ankica, Vlasta Brlek (1989): Odnos gljivica *Fusarium* na nalaz nekih trikotecenskih toksina u sirovinama i smjesama za perad. Zbornik radova III. Simpozij o mikotoksinima Sarajevo, 14. do 15. travanj 1989. ANUBIH, knjiga LXXXIX 55-59.
19. Nemanič, Ankica, H. Mazija, Z. Bidin (1989): Imunosupresivno djelovanje subtoksične količine T-2 toksina. Zbornik radova III Simpozij o mikotoksinima Sarajevo, 14. do 15. travanj 1989. ANUBIH, knjiga LXXXIX 31-35.
20. Nijis, M. de., H. P. van Egmond, F. M. Rombouts, S. H. W. Notermans (1997): Identification of hazardous *Fusarium* secondary metabolites occurring in food raw materials. *J. Food Safety* 17, 161-191.
21. Ožegović, L., S. Pepeljnjak (1995): *Mikotoksikoze.* Školska knjiga Zagreb, 1995.
22. Pavičić, Perica, Vlasta Brlek, Ankica Nemanič (1998): Žitarice kao izvorište mikotoksina u hrani za perad. *Praxis vet.* 46 (1-2) 43-48.
23. Pepeljnjak, S. (1989): Učestalost i održivost T-2 toksina u prirodnim uvjetima. Zbornik radova III Simpozij o mikotoksinima. Sarajevo 14. do 15. travnja 1988. ANUBIH, knjiga LXXXIX 47-54.
24. Peters, C. A. (1972): Photochemistry of zearalenone and its derivatives. *J. Med. Chem.* 15, 867-868.
25. Romer, T. R., T. M. Boiling, J. L. MacDonald (1978): Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. *J. A. O. A. C.* 61, 801-808.
26. Sano, A., Y. Asabe, S. Takitanl, Y. Ueno (1982): Fluorodensitometric determination of trichothecenes mycotoxins with nicotinamide and 2-acetylpyridine on silica gel layer. *J. Chrom.* 235, 257-265.
27. Vesonder, R. F., P. Golinski (1989): Metabolites of *Fusarium*. U: Chelkowski, J. (ured.): *Fusarium mycotoxins, taxonomy and pathogenicity.* Elsevier 1-39.

## SUMMARY

The paper present results of *Fusarium* mycotoxins frequency in 2562 samples of mixed poultry feed (2379) and pig feed (183) over the ten years of research (1989-1998). Trichothecenes mycotoxins T-2 toxin and diacetoxyscirpenol (DAS) were found in 18% and 50,5% respectively of the tested mixed poultry feed samples by the thin-layer chromatography. The T-2 toxin frequency was highest in 1991 and 1992 (50%, 42%) and DAS was more frequent in 1992, 1995 and 1997 (75%, 50%,73%). The average concentrations of trichothecenes was around 0,20 mg/kg and the maximal was 1,50 mg/kg. Zearalenone (ZON) and its derivates ( $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol) were determined by high pressure liquid chromatography in the pig feed suspected of zearalenontoxicosis. ZON and its derivates were found in average of 12% tested samples and the highest percentage of the positive samples was noted in 1997 (50%). Minimal noted ZON and derivates concentrations were 0,06 mg/kg while the maximal were 6,83 mg/kg noted in 1990.

Kej words: T-2 toxin, DAS, zearalenole, animal feed