

AKTUELNI PROBLEMI KONTAMINACIJE STOČNE HRANE MIKROORGANIZMIMA, POSEBNO GLJIVICAMA I MIKOTOKSINIMA

J. Žust, A. Vengušt, U. Pestevšek, N. Klemenc, Zvonka Kabaj

Pregledni znanstveni rad
Priljeno: 8. 7. 1988.

SAŽETAK

Opisuje se problem kontaminacije stočne hrane mikroorganizmima, posebno ubikvitarno rasprostranjenim bakterijama i gljivicama, koje mogu prouzrokovati kvašenje krme, a u određenim uslovima proizvoditi toksične metabolite štetne po zdravlje životinja. Opštom bakteriološkom i mikološkom pretragom na ukupni broj i pojedine grupe mikroorganizama ne može se u celini utvrditi higijenski kvalitet i štetnost stočne hrane za domaće životinje. Njih je potrebno dopuniti specijalnim mikrobiološkim metodama za izolaciju obligatno i fakultativno patogenih klica, koje po pravilu sačinjavaju manji deo kontaminenata stočne hrane, te organoleptičkim, mikroskopskim, a naročito toksikološkim metodama i biološkim ogledima. Nužno je pristupiti uvođenju jednoobraznih metoda mikrobiološkog ispitivanja stočne hrane i prilagoditi naše norme svetskim standardima.

Iznose se rezultati mikoloških i mikotoksikoloških pretraga stočne hrane na području Slovenije i Jugoslavije. U Sloveniji je u razdoblju 1979/88. mikološki pretraženo 5.317 uzoraka stočne hrane u prometu i utvrđeno da mikrobiološkom statusu nije odgovaralo njih 16,5%.

Na sadržaj aflatoksina B₁, F-2 toksina, ohratoksina A i sterigmatocistina pretraženo je 860 mikološki jako kontaminiranih uzoraka stočne hrane. Mikotoksini su utvrđeni u 155 (18,0%) uzoraka, najčešće F-2 toksin u 8,7% uzoraka u koncentracijama od 0,5 – 30 mg/kg, ohratoksina A u 7,5% (2 – 3000 µg/kg) i aflatoksin B₁ u 1,8% (4,0 – 150 µg/kg) uzoraka. Na dermatoksičnost ispitano je 426 različitih sirovina i krmnih smeša, koje su prouzrokovale ili se sumnjalo da su prouzrokovale zdravstvene poremećaje kod životinja. Pozitivno je reagovalo 34,5%, a s vrlo jakom reakcijom bilo je 10,3% uzoraka. Od 47 pregledanih jako dermatoksičnih uzoraka T-2 toksin (1 – 3,5 mg/kg) utvrđen je u 9,3%, diacetoksiscirpenol (1,2 mg/kg) u 2,3%, a deoksiinivalenol (0,75 – 3,5 mg/kg) u 29,4% uzoraka. Zbog velikog broja različitih trihotecena u stočnoj hrani preporučuje se obavezno testiranje svih mikološki jako kontaminiranih krmnih smeša na dermatoksičnost. Iz ogleđa na plesnivom kukuruzu kao osnovnoj sirovini za pripremu krmnih smeša u Jugoslaviji potvrđeno je da je u našim ekološkim prilikama najznačajniji i najčešći F-2 toksin i dermatoksični trihoteceni. Kontaminacija aflatoksinom B₁ je relativno retka, ipak je ne smemo potcenjivati zbog kancerogenosti ovog toksina. Češća je kontaminacija ohratoksinom A, dok sterigmatocistin nije utvrđen u našoj stočnoj hrani.

Uvod

Poslednjih godina se sve više pojavljuju u Jugoslaviji, kao i u drugim zemljama, brojni problemi u proizvodnji i zdravlju domaćih životinja koje uzrokuje stočna hrana koja ne odgovara higijenskim, nutritivnim i biološkim normativima neophodnim za dobro zdravlje i reprodukciju domaćih životinja.

Od niza faktora koji mogu uzrokovati masovnu pojavu bolesti kod domaćih životinja u ovom radu analizirati ćemo

u nas vrlo aktuelnu i čestu problematiku kontaminacije stočne hrane mikroorganizmima, posebno gljivicama i mikotoksinima.

Prof. dr. Janko Žust, dr. Anton Vengušt, doc. dr. Uroš Pestevšek, prof. dr. Nestor Klemenc, dipl. inž. Zvonka Kabaj, Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, Ljubljana.

Mikroorganizmi su više ili manje rašireni svuda u prirodi, pa se stoga mogu naći i u stočnoj hrani. Stočna hrana se kontaminira u sredinama gde se proizvodi, prerađuje, skladišti, transportuje ili upotrebljava. Razvoj i razmnožavanje mikroorganizama u stočnoj hrani zavisi od mnogo faktora: relativne vlage, temperature, aerobnih i anaerobnih uslova, vrste supstrata i njihovog hemijskog sastava, doba uskladištenja, primesa u krmi (korovi, zemlja i dr.), fizikalnih osobina (loma zrnja), pH vrednosti, produkta razgradnje hrane, te konkurentnih mikroorganizama. Mikroorganizmi svojim enzimima mogu uzrokovati hemijsku razgradnju ugljenih hidrata, belančevina, masti i esencijalnih materija. Produkti takve razgradnje mogu promeniti miris, ukus i izgled stočne hrane, koja može u većem ili manjem obimu izgubiti na hranljivoj vrednosti, a može sadržavati neke produkte hemijske razgradnje koji su štetni za zdravlje životinja. Neki mikroorganizmi mogu u određenim uslovima proizvoditi specifične toksične materije, a mogu biti i izvor različitih infekcija kod životinja. Iako nalaz pojedinih grupa mikroorganizama u stočnoj hrani zavisi od više nabrojanih faktora, ipak postoji određena dinamika u razvoju i pojavljivanju pojedinih mikroorganizama. S obzirom na prevalencu utvrđenih grupa mikroorganizama, može se ponekad zaključiti kako je došlo do kvarenja neke vrste hrane.

Mikroorganizme u stočnoj hrani koji mogu uzrokovati njezino kvarenje po pravilu svrstavamo u grupu saprofitičkih bakterija iz rodova *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacter*, *Escherichia*, *Proteus*; u grupu gljiva iz rodova *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Thamnidium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticillium*, *Pullaria* i dr.; među kvasnice i aktinomicete (Schmidt, 1975, 1981). One mikroorganizme u stočnoj hrani koji mogu uzrokovati specifične bolesti i intoksikacije kod domaćih životinja većina autora (Gedek, 1974) svrstava u tri grupe:

1. Obligatno patogeni mikroorganizmi koji direktno preko hrane uzrokuju zarazne bolesti životinja, kao npr. bakterije iz rodova *Brucella*, *Mycobacterium*, bacil antraksa, virus slinavke i šapa i dr., a od gljivica su uzročnici trihofitije i mikrosporijaze. Ovi mikroorganizmi se u pravilu razmnožavaju u organizmu životinja.

2. Bakterije i gljivice koje se nakon kontaminacije moraju razmnožiti u stočnoj hrani da dostignu infekcijsku dozu, tj. broj klica koji je nužan da izazove bolest kod životinja. Među njima su najznačajnije enterobakterije, pre svega salmonele, listeria i *Cl. perfringens*, a od gljivica *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*.

3. Mikroorganizmi koji proizvode toksine u stočnoj hrani. Da dođe do biosinteze toksina potrebni su, pored hranjivih i drugih tvari za razmnožavanje mikroorganizama, još posebni uslovi koji pogoduju proizvodnji toksina.

Ovi mikroorganizmi se u pravilu ne razmnožavaju u telu životinja. U toj grupi su najznačajniji *Cl. botulium* i *Staphylococcus piogenes* među bakterijama, a među gljivicama toksični sojevi iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*.

Kod ovakve podele mikroorganizama, kojom se služimo samo zbog boljeg prikaza problematike, treba podvući da mnogi mikroorganizmi, naročito oni treće grupe, mogu izazvati kvarenje stočne hrane, a u određenim uslovima proizvode toksične metabolite.

Mikrobiološko ispitivanje stočne hrane

Za utvrđivanje pokvarenosti i štetnosti određene vrste stočne hrane s obzirom na to da li se radi o uzorcima koji se uzimaju kod redovne kontrole stočne hrane u prometu ili o stočnoj hrani za koju se sumnja da je uzrokovala proizvodne ili zdravstvene poremećaje kod domaćih životinja mogu se izvršiti opšta ili specijalna bakteriološka i mikološka ispitivanja. Opštom bakteriološkom i mikološkom pretragom na ukupni broj i grupe bakterija i plesni dobijamo uvid u stupanj mikrobiološkog kvarenja stočne hrane. Ova ocena ne daje u celini uvid i u štetnost ispitivane hrane za zdravlje životinja. Zbog toga je potrebno ponekad opštu i specijalnu mikrobiološku pretragu dopuniti organoleptičkim i mikroskopskim pregledom, hemijskom analizom i biološkim ogledom (Schmidt, 1981). Naravno da ovakva kompleksna ispitivanja zahtevaju dobro opremljene laboratorije i stručni kadar. Takva su ispitivanja, naročito specijalistička, skupa, pa ih treba provoditi u slučajevima kada je to opravdano s obzirom na uzroke većih šteta ili aktuelnosti njihovog preveniranja.

Osnovni uslov da bismo dobili rezultate bakteriološkog i mikološkog ispitivanja koji se mogu reproducirati i upoređivati je svakako upotreba standardnih metoda u svim laboratorijama koji se bave tim ispitivanjima. U našoj zemlji nisu do sada zakonom propisane obavezne metode bakteriološkog i mikološkog ispitivanja stočne hrane.

U vezi s našim važećim zakonskim regulativama s obzirom na maksimalno dozvoljen sadržaj saprofitičkih bakterija i gljivica moramo podvući da je iz raznih razloga, u koje ne bismo ulazili, dozvoljen broj ovih mikroorganizama prevelik i ne štiti u dovoljnoj meri korisnike stočne hrane, pa bi ga trebalo revidirati. Smatramo da bi bilo korisno da ih prilagodimo kriterijima koje preporučuje Internacionalna radna zajednica za ispitivanje stočne hrane (IAG).

Gljivice kao uzročnici mikrotoksikoza u domaćih životinja

Već dugo je poznato da se živežne namirnice i stočna hrana od proizvodnje do upotrebe mogu kontaminirati gljivicama. Krajem proteklog i prvih 30 godina ovog veka izvršena su prva istraživanja u vezi s plesnivom hranom



koja je uzrokovala mikotoksikoze kod ljudi i životinja. Ova istraživanja su bila usmerena, pre svega, na neke uže probleme, npr. ergotizam, jer se već razvila sistematska taksonomija gljivica i utvrđene su glavne grupe toksičnih vrsta. Od 1930. godine pa do otkrića aflatoksina 1960. godine veću pažnju problemima mikotoksikoza posvetili su istraživači u SSSR-u i Japanu. Ovaj je period važan za kasnije proučavanje toga problema, jer su od otkrića prvog antibiotika 1929. godine izvršena veoma opsežna istraživanja u vezi s antibiotskim i toksičnim svojstvima mnogih gljivica, za koje je kasnije utvrđeno da mogu uzrokovati mikotoksikoze ljudi i životinja. Interes za ta istraživanja povećao se nakon otkrića da neki mikotoksini mogu kao rezidue u namirnicama biti veoma karcinogeni za ljude i životinje. U tom periodu možemo naći u literaturi više hiljada naučnih radova s tog područja i više monografija o pojedinim značajnim mikotoksinima, odnosno mikotoksikozama. U vezi s time treba istaći da su istraživanja etiologije mikotoksikoza kod životinja i ljudi interdisciplinarna, dugotrajna i skupa zbog mnogih kompleksnih faktora koji mogu uticati na razvoj pojedinih vrsta gljivica i na proizvodnju njihovih toksina. Zato je razumljivo da je prošlo više decenija od zapažanja kliničkih simptoma pojedinih mikotoksikoza pa do otkrića njihovog stvarnog uzročnika. Tako je već 1910. godine utvrđeno da je gljivica *Aspergillus flavus* iz arašida toksična za životinje, dok je aflatoksin otkriven tek 1960. godine. Estrogenizam kod svinja uzrokovan kukuruzom kontaminiranim gljivicama roda *Fusarium* utvrdili su veterinari već 1927. godine, a F-2 toksin bio je identifikovan tek 40 godina kasnije. Toksičnost plesnivog žita inficiranog gljivicama roda *Fusarium* bila je utvrđena u istočnoj Sibiriji 1900. godine. Tek 70 godina kasnije otkriven je deoksinivalenol, koji je uzrokovao ova obolenja. Godine 1942. utvrđena je alimentarna toksična aleukija kod ljudi u Sovjetskom Savezu, a njen uzročnik T-2 toksin šest godina kasnije. Stahibotriotoksikoza kod konja utvrđena je 1929. godine u Mađarskoj, a mikotoksine trihotecene, koji proizvodi gljivica *Stachybotriatra*, utvrdili su tek 1973. godine.

Među brojnim otkrivenim mikotoksinima danas su za praksu najznačajniji oni izolirani iz prirodnih supstrata, za koje je utvrđeno da kod domaćih životinja uzrokuju zdravstvene, reproduktivne ili proizvodne poremećaje. To su aflatoksin B₁, F-2 toksin, ohratoksina A, slaframin, sporozemin, ergot alkaloidi, penicilinska kiselina, patulin, sterigmatocistin i toksini iz grupe trihotecena. Među njima, zbog aktuelnosti u svetu i kod nas, posebnu pažnju posvećujemo mikotoksikozama koje uzrokuju aflatoksini, F-2 toksin, ohratoksina A i trihoteceni. Zato je u svetskoj stručnoj literaturi najviše podataka o istraživanjima kontaminacije stočne hrane ovim mikotoksinima (Willie, 1978; Venguš, 1985).

Veliki broj ispitivanja izvršen je u vezi sa sadržajem aflatoksina u arašidovoj sačmi. Njihova koncentracija je po ispitivanju FAO iznosila u nekim područjima i do 25000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U kukuruzu su utvrdili od 6 do 308 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a manje količine toga toksina nađene su i u suncokretovoj sačmi, pšenici, senu i ostaloj stočnoj hrani.

F-2 toksin je veoma raširen u žitima, naročito u kukuruzu. Njegova količina je obično manja od 5 mg/kg, iako su utvrđene i veće količine – do 2000 mg/kg. U nekim područjima su ga našli čak u 31% pregledanih uzoraka.

Ohratoksina A kao uzročnik nefropatija kod domaćih životinja najviše je istraživana u Danskoj i Švedskoj, naročito u ječmu i zobi. Istraživanja su obavljena i u Engleskoj, Francuskoj, Poljskoj, Zapadnoj Nemačkoj i Kanadi. Utvrđene vrednosti ohratoksina u stočnoj hrani iznosile su od 16 do 27500 mg/kg.

Od trihotecena bio je svuda po svetu u velikom obimu utvrđen deoksinivalenol u kukuruzu, pšenici i drugim žitima, najčešće u količini od 50 mg/kg. Zajedno s deoksinivalenolom često je nađen i F-2 toksin. Nivalenol je utvrđen u pojedinim područjima Evrope i Azije, a T-2 toksin se javlja u stočnoj hrani relativno retko (Willie, 1978; Lacey, 1985).

Kontaminacija stočne hrane mikotoksinima u Jugoslaviji

U Jugoslaviji su među prvima upozorili na zdravstvene poremećaje koje je uzrokovala plesniva krma Stamatović i drugi, kada su 1963. godine utvrdili masovni vulvovaginitis kod svinja. Prve podatke o kontaminaciji stočne hrane mikotoksinima u Jugoslaviji objavili su Prbičević i drugi 1972. godine. U 27 od 30 pregledanih uzoraka arašidove sačme utvrdili su 57 do 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aflatoksina B₁. Od tada pa do danas objavljeno je s obzirom na značaj problematike relativno malo podataka o kontaminaciji stočne hrane mikotoksinima i o mikotoksikozama kod domaćih životinja u pojedinim područjima Jugoslavije.

U ovom referatu navodimo sumarne rezultate ispitivanja stočne hrane na sadržaj aflatoksina B₁, F-2 toksina, ohratoksina A i trihotecena, koja su izvršena kod nas i koja prikazujemo u tabelama 1, 2, 3 i 4.

Kontaminacija stočne hrane T-2 toksinom
Animal feed contamination by T-2 toxin

Tabela 1 – Table 1

stočna hrana Feed	broj pretraže- nih uzoraka Number of tested samples	procenat pozi- tivnih uzoraka Percentage of positive samples	sadržaj toksina u $\mu\text{g}/\text{kg}$ Toxin level in $\mu\text{g}/\text{kg}$	autor i godina Author and year
kukuruz – Maize	250	8,3	500 – 5000	Balzer, 1977
različita krma Different feed	111	5,9	$\bar{x} = 5,5$	Pepeljnjak, 1978
različita krma Different feed	50	3,8	$\bar{x} = 3,8$	Pepeljnjak, 1978
kukuruz – Maize	—	—	550 – 20520	Pepeljnjak, 1979
kukuruz – Maize	40	7,5	160 – 480	Pepeljnjak, 1986
ječam – Barley	5	20,0	160	Pepeljnjak, 1986
smeša za goveda Mixture for cows	19	15,7	80 – 200	Pepeljnjak, 1986
kukuruz – Maize	58	12,1	tr. – 15000	Vengušt, 1985

Kontaminacija stočne hrane aflatoksinom B₁
Animal feed contamination by aflatoxin B₁

Tabela 2 – Table 2

stočna hrana Feed	broj pretraže- nih uzoraka Number of tested samples	procenat pozi- tivnih uzoraka Percentage of positive samples	sadržaj toksina u $\mu\text{g}/\text{kg}$ Toxin level in $\mu\text{g}/\text{kg}$	autor i godina Author and year
arašidova sačma Peanut meal	30	90,0	38 – 1600	Pribičević, 1972
arašidova sačma Peanut meal	56	100	30 – 370	Klemenc, 1972
smeša za goveda Mixture for cattle	25	96,0	20 – 70	Klemenc, 1972
kukuruz – Maize	68	17,6	tr. – 150	Klemenc, 1972, 1975
kukuruz – Maize	—	—	5 – 50	Pepeljnjak, 1979
kukuruz – Maize	57	3,5	$\bar{x} = 20$	Kordić, 1979
kukuruz – Maize	71	2,8	$\bar{x} = 250$	Šutić, 1979
lucerka – Alfalfa	22	68,2	—	Šutić, 1979
kukuruz – Maize	14	35,7	—	Šutić, 1979
kukuruz – Maize	203	0,9	1 – 2	Kordić, 1986
pšenica – Wheat	41	19,5	1 – 2	Kordić, 1986
suncokretova sačma Sunflower meal	6	33,2	1 – 2	Kordić, 1986
hrana za svinje Pig feed	48	2,0	1 – 2	Kordić, 1986
kukuruzna silaža Maize silage	27	11,1	1 – 2	Kordić, 1986
seno – Hay	30	6,7	1 – 2	Kordić, 1986
hrana za svinje Pig feed	23	17,4	20 – 1120	Pepeljnjak, 1986
pšenica – Wheat	7	28,6	—	Nemanić, 1986
sačma uljane repice Rape-seed meal	1	100	—	Nemanić, 1986
smeša za perad Mixture for poultry	33	3,0	—	Nemanić, 1986
različita krma Different feed	310	2,6	2 – 4	Hlubna, 1986

Kontaminacija stočne hrane F-2 toksinom
Animal feed contamination by F-2 toxin

Tabela 3 – Table 3

stočna hrana Feed	broj pretraže- nih uzoraka Number of tested samples	procenat pozi- tivnih uzoraka Percentage of positive samples	sadržaj toksina u $\mu\text{g}/\text{kg}$ Toxin level in $\mu\text{g}/\text{kg}$	autor i godina Author and year
kukuruz – Maize	54	42,6	700 – 27500	Klemenc, 1975
kukuruz – Maize	250	2,6	43 – 10000	Balzer, 1977
različita krma Different feed	111	6,2	\bar{x} = 360	Pepeljnjak, 1978
različita krma Different feed	—	—	\bar{x} = 4200	Pepeljnjak, 1978
kukuruz – Maize	—	—	10 – 275800	Pepeljnjak, 1979
različita krma Different feed	17	100	1500 – 25000	Kordić, 1979
kukuruz – Maize	57	35,0	2500 – 10000	Kordić, 1979
kukuruz – Maize	71	76,1	200 – 20000	Šutić, 1979
pšenica – Wheat	11	63,6	200 – 2500	Šutić, 1979
ječam – Barley	7	28,6	200 – 2500	Šutić, 1979
hrana za svinje Pigg feed	43	88,3	200 – 20000	Šutić, 1979
smeše za goveda Mixtures for cattle	10	100	200 – 10000	Šutić, 1979
sirovine za smeše Ingredients for mixtures	65	9,2	—	Hlubna, 1979
kukuruz – Maize	193	47,7	200 – 20000	Kordić, 1986
pšenica – Wheat	41	19,5	200 – 9000	Kordić, 1986
zob – Oats	5	40,0	200 – 1500	Kordić, 1986
suncokretova sačma Sunflower meal	6	16,7	200 – 1500	Kordić, 1986
hrana za svinje Pig feed	48	43,7	200 – 20000	Kordić, 1986
smeše za goveda Mixtures for cattle	10	70,0	200 – 9000	Kordić, 1986
kukuruzna silaža Maize silage	27	48,1	200 – 1500	Kordić, 1986
ječam – Barley	5	40,0	560 – 900	Pepeljnjak, 1986
kukuruz – Maize	40	12,5	560 – 3000	Pepeljnjak, 1986.
hrana za svinje Pig feed	23	13,0	100 – 1120	Pepeljnjak, 1986
smeše za krave Mixtures for cows	19	26,3	200 – 1200	Pepeljnjak, 1986
kukuruz – Maize	72	94,3	100 – 10000	Nemanić, 1986
hrana za perad Mixtures for poultry	49	67,3	100 – 10000	Nemanić, 1986
hrana za svinje Pig feed	3	100	100 – 10000	Nemanić, 1986
kukuruz – Maize	214	2,3	200 – 400	Hlubna, 1986

Kontaminacija stočne hrane ohratoksinom A
Animal feed contamination by ochratoxin A

Tabela 4 – Table 4

stočna hrana Feed	broj pretraže- nih uzoraka Number of tested samples	procenat pozi- tivnih uzoraka Percentage of positive samples	sadržaj toksina u $\mu\text{g}/\text{kg}$ Toxin level in $\mu\text{g}/\text{kg}$	autor i godina Author and year
kukuruz – Maize	250	26,0	45 – 5100	Balzer, 1977
različita krma Different feed	111	16,1	\bar{x} = 520	Pepeljnjak, 1978
različita krma Different feed	50	6,7	\bar{x} = 220	Pepeljnjak, 1978
kukuruz – Maize	—	—	10 – 68900	Pepeljnjak, 1979
kukuruz – Maize	172	25,0	—	Mužić, 1976
sirovine za smeše Ingredients for mixtures	65	3,1	—	Hlubna, 1979
kukuruz – Maize	40	40,0	40 – 31200	Pepeljnjak, 1986
pšenica – Wheat	5	20,0	70	Pepeljnjak, 1986
ječam – Barley	5	80,0	320 – 800	Pepeljnjak, 1986
zob – Oats	5	20,0	160	Pepeljnjak, 1986
suncokretova sačma Sunflower mill	8	37,5	50 – 600	Pepeljnjak, 1986
sačma uljane repice Rape-seed meal	1	100	50	Pepeljnjak, 1986
hrana za svinje Pig feed	23	39,1	50 – 800	Pepeljnjak, 1986
smeše za krave Mixtures for cows	19	63,0	380 – 1610	Pepeljnjak, 1986
kukuruz – Maize	20	25,0	20 – 180	Nemanić, 1986
pšenica – Wheat	9	44,4	20 – 180	Nemanić, 1986
smeše za perad Mixtures for poultry	128	2,3	20 – 180	Nemanić, 1986
smeše za svinje Mixtures for pigs	17	29,4	20 – 189	Nemanić, 1986
smeše za goveda Mixtures for cattle	6	33,3	20 – 180	Nemanić, 1986
kukuruz – Maize	214	4,7	40 – 80	Hlubna, 1986
pšenica – Wheat	153	1,3	40 – 80	Hlubna, 1986
zob – Oats	2	100	200	Hlubna, 1986
razne smeše Different mixtures	310	8,7	40 – 80	Hlubna, 1986

**Mikološka i mikotoksikološka ispitivanja stočne hrane
koja je bila u prometu u Sloveniji u periodu
1979/88. godine**

Sa sistematičnim ispitivanjima kontaminacije stočne hrane gljivicama i mikotoksinima počeli smo u Sloveniji 1979. godine. Sumarni rezultati pretrage stočne hrane po vrstama životinja i po godinama prikazani su u tabelama 5 i 6.

Među ispitanim uzorcima stočne hrane uzetim kod redovne, obavezne inspeksijske kontrole higijenskog kva-

liteta stočne hrane, koja je bila u prometu u Sloveniji od 1979/88. godine ispitali smo 3480 uzoraka krmnih smeša za 17 različitih vrsta i kategorija životinja i 1837 uzoraka različitih sirovina za krmne smeše, najviše kukuruza. Mikološka ispitivanja izvršena su po metodama Schmidta, Mišustina i Trisvajtskiga i po International Rules for Seed Test ISTA (Vol. 3, 1966). Pretragu na sadržaj aflatoksinu B₁, F-2 toksina, ohratoksinu A i sterigmatocistinu izvršili smo simultanom, semikvantitativnom metodom po Vosperniku i dr. (1978). Od ukupno 5317 pregledanih uzoraka higijensko neispravnih bilo je 877 ili 16,5%.

Rezultati mikoloških ispitivanja stočne hrane u periodu 1979/88
Results of animal feed mycological tests from 1979–1988

Tabela 5 – Table 5

stočna hrana Animal feed	broj pregledanih uzoraka Number of tested samples	broj higijenski neispravnih uzoraka Number of hygienically inadequate samples
krmne smeše za krave Feed mixtures for cows	257	32 (12,5%)
krmne smeše za telad Feed mixtures for calves	322	81 (25,2%)
krmne smeše za prasad Feed mixtures for piglets	189	50 (26,5%)
krmne smeše za svinje Feed mixtures for pigs	409	92 (22,5%)
krmne smeše za piliće Feed mixtures for chickens	925	216 (23,4%)
krmne smeše za nesilje Feed mixtures for laying hens	1378	113 (8,2%)
kukuruz – Maize	942	182 (19,3%)
druge sirovine za krmne smeše Other ingredients of feed mixtures	895	111 (12,4%)
ukupno – Total	5317	877 (16,5%)

Rezultati mikoloških ispitivanja stočne hrane po godinama
Results of animal feed mycological tests by years

Tabela 6 – Table 6

godina Year	broj pregledanih uzoraka Number of tested samples	broj higijenski neispravnih uzoraka Number of hygienically inadequate samples	%
1979.	233	108	46,4
1980.	307	42	13,7
1981.	880	136	15,5
1982.	727	89	12,2
1983.	904	71	7,9
1984.	630	102	16,2
1985.	479	106	22,1
1986.	677	124	18,5
1987.	480	99	20,6

Relativno visok procenat uzoraka krmnih smeša slabog higijenskog kvaliteta očekivali smo zbog poznatih problema oko plesnivog kukuruza kod nas, a iznenadio nas je relativno veliki procenat takvih uzoraka drugih sirovina za krmne smeše. Iz tabele 6 može se videti da se mikrobiološki kvalitet stočne hrane postepeno popravljao do 1983. godine, a zatim se ponovo povećao procenat uzoraka slabog higijenskog kvaliteta. To je, pre svega, povezano s dobro poznatim variranjima kvaliteta kukuruza u pojedinim godinama.

Na sadržaj aflatoksina B₁, F-2 toksina, ohratoksina A i sterigmatocistina pregledali smo 860 od 877 uzoraka, koji su bili jako kontaminirani gljivicama. Jedan ili više mikotoksina utvrdili smo u 155 (18,0%) uzoraka, najčešće toksin F-2 u 8,7% uzoraka (0,5 – 30 mg/kg), ohratoksin A utvrđen je u 7,5% (2 – 3000 μg/kg), a aflatoksin B₁ u 1,8% (4 – 150 μg/kg) uzoraka. Sterigmatocistin nismo našli u našoj stočnoj hrani (tabela 7).

Kontaminacija stočne hrane F-2 toksinom, ohratoksinom A, aflatoksinom B₁ i sterigmatocistinom u Sloveniji (1979/87)
Animal feed contamination by F-2 toxin, ochratoxin A, aflatoxin B₁ and sterigmatocystine in Slovenia (1979/87)

Tabela 7 – Table 7

broj pregledanih uzoraka	procenat kontaminiranih uzoraka	F-2 toksin F-2 toxin	ohratoksin A ochratoxin A	aflatoksin B ₁ * aflatoxin B ₁ *
Number of tested samples	Percentage of contaminated samples	%		
860	18,0	8,7	7,5	1,8

* Ispitivanja svih uzoraka na sadržaj sterigmatocistina bila su negativna.
 Tests of all samples for sterigmatocystine were negative.

Na dermatoksičnost, koja ukazuje na prisustvo mikotoksina iz grupe trihotecena, ispitati smo 426 različitih sirovina i krmnih smeša koje su bile higijenski neispravne zbog previsoke kontaminacije gljivicama ili su uzrokovale zdravstvene, odnosno proizvodne poremećaje (tabela 8).

Rezultati kožnog testa bili su pozitivni kod 147 (34,5%) uzoraka, a od toga je 44 (10,3%) pokazalo vrlo jake reakcije (ocena 3 i 4). Kako kožni test nije specifičan, nema sumnje da ćemo morati posvetiti više pažnje uvođenju odgovarajućih rutinskih, hemijskih i bioloških metoda za identifikaciju dermatoksičnih materija u stočnoj hrani.

Rezultati ispitivanja stočne hrane na dermatoksičnost
Results of animal feed tests for dermatotoxicity

Tabela 8 – Table 8

godina Year	broj uzoraka Number of samples	procenat pozitivnih uzoraka Percentage of positive samples	procenat jako pozitivnih uzoraka Percentage of very positive samples
1983.	81	35,0	13,6
1984	53	33,9	16,9
1985.	119	34,5	12,6
1986.	82	42,7	7,3
1987.	91	27,5	3,3
ukupno – Total	426	34,5	10,3

Hemijski smo do sada pretražili na prisutnost T-2 toksina i diacetoksiscirpenola 43 uzorka sirovina i krmnih smeša koje su bile jako dermatoksične. T-2 toksin u količini 1 do 3,5 mg/kg utvrdili smo u 9,3% uzoraka, a diacetoksiscirpenol samo u dva (2,3%) uzorka (1,2 mg/kg).

Na sadržaj deoksinivalenola pretražili smo 17 dermatoksičnih uzoraka. Pozitivno je bilo 29,4% (0,75 – 3,5 mg/kg) uzoraka. Zbog velikog broja različitih trihotecena koji mogu biti u stočnoj hrani predlažemo za sada obavezno testiranje na dermatoksičnost svih krmnih smeša i

sirovina za krmne smeše koje su higijenski neispravne zbog prevelike kontaminacije gljivicama ili ako uzrokuju zdravstvene, odnosno proizvodne poremećaje kod domaćih životinja.

Opisana ispitivanja pokazuju da je higijenski kvalitet stočne hrane u pogledu kontaminacije gljivicama i mikotoksinima u periodu 1979/88 u Sloveniji bio dosta slab, i da je problem mikotoksikoza posebno supklinički aktuelan kod svih vrsta domaćih životinja.

Dinamika kontaminacije plesnivog kukuruza mikotoksinima

Uporedo s opisanim ispitivanjima proučavali smo u periodu 1978/83. godine dinamiku kontaminacije kukuruza mikotoksinima. Cilj ovih ispitivanja bio je dobiti orijentaciju o raširenosti mikotoksina u ovoj najvažnijoj komponenti krmnih smeša u nas. Materijal za ispitivanje dobili smo od Instituta za kukuruz, Zemun-Polje. Ispitali smo 234 uzorka više ili manje plesnivog kukuruza, koji su bili uzeti na području Kragujevca, Brčkog, Đakovice, Doboja, Bačke Topole, Vrbasa, Zaječara, Duge Rese, Kraljeva, Niša, Zaboka, Smedereva, Kruševca, Sombora, Zemun-Polja, Križevaca, Zrenjanina, Varaždina, Negotina, Adaševaca, Čakovca, Skoplja, Titograda, Titela, Orahovca, Gnjilana, Padsinske Skele, Bresnog Polja, Bihaća, Bjelovara, Sremske Mitrovice, Vranja, Velike Plane, Velike Kikinde, Subotice, Belog Manastira, Sente, Jankovaca, Banja Luke, Živnice, Mirkovaca i Požarevca.

Uzorke kukuruza pretražili smo mikološki i mikotoksikološki na sadržaj aflatoksina B₁, F-2 toksina, ohratoksina A i sterigmatocistina već spomenutim metodama. Za utvrđivanje dermatoksičnosti ekstrahirali smo uzorke plesnivog kukuruza po Eppleyu (1968) i ekstrakt naneli na kožu zeca. Kožnu reakciju ocenjivali smo po metodi Chunga (1974). Hemijsku identifikaciju toksina T-2 i diacetoksiscirpenola izvršili smo po metodi Vospernika

i drugih (Vengušt, 1985), a nivalenola metodom po Trucksessovoj i drugima (1984).

Rezultati ovih ispitivanja navedeni su u tabeli 9. Jedan ili više mikotoksina utvrdili smo u 64,5% uzoraka. F-2 toksin utvrđen je u 45,3% (0,6 – 150 mg/kg), jak dermatoksičan agens u 21,4%, ohratoksin A u 9,4% (24 – 60 µg/kg) i aflatoksin B₁ u 9,4% (3,6 – 100 µg/kg) uzoraka. Toksin T-2 bio je prisutan u 4 (0,95 – 15 mg/kg), a diacetoksiscirpenol u 3 (>2 mg/kg) od 49 jako dermatoksičnih uzoraka. U 2 pregledana uzorka pored toksina T-2 i toksina F-2 utvrđeni su deoksinivalenol (32 i 10 mg/kg) i 3-acetoksideoksinivalenol (12 i 2,1 mg/kg).

Na osnovu ovih ispitivanja možemo zaključiti da su u našim ekološkim uslovima najznačajniji i najčešći F-2 toksin i dermatoksični agensi. Kontaminacija aflatoksinom B₁ relativno je retka, ipak je ne smemo potcenjivati zbog karcinogenosti tog toksina i mogućnosti rezidua u namirnicama animalnog izvora. Češća je kontaminacija ohratoksinom A, koju pojedini autori kod nas povezuju s još nedovoljno istraženim nefropatijama kod svinja i peradi. Sterigmatocistin nismo utvrdili u našem kukuruzu.

Prva istraživanja o sastavu dermatoksičnog agensa, koji može biti vrlo kompleksan, pokazala su da naša stočna hrana pored T-2 toksina, diacetoksiscirpenola, deoksinivalenola i 3-acetoksideoksinivalenola sadrži još druge, do sada neidentificirane mikotoksine.

Rezultati mikotoksikoloških ispitivanja 234 uzorka plesnivog kukuruza Results of mycotoxicological tests in 234 samples of mouldy maize

Tabela 9 – Table 9

ukupan broj uzoraka s mikotoksinima Total number of samples with mycotoxins	F-2 toksin F-2 toxin	dermatoksičan agens* dermatotoxic agent*	aflatoksin B ₁ aflatoxin B ₁	ohratoksin A ochratoxin A
151 64,5 %	106 45,3 %	50 21,4 %	22 9,4 %	22 9,4 %

* Uzorci s jakom kožnom reakcijom (ocena 3 i 4).
Samples showing a strong skin reaction (notes 3 and 4).

Preventiva kontaminacije stočne hrane gljivicama i mikotoksinima

Do kontaminacije stočne hrane gljivicama i mikotoksinima može doći u svim fazama njene proizvodnje na polju, kod konzerviranja, skladištenja i upotrebe. Zato je potrebno primeniti u preventivi određene agrotehničke mere, kao što su nepreterana gnojidba, ne pregusti biljni sklopovi, sejanje ranijih hibrida, selekcija na otpornost prema gljivicama, upotreba insekticida i fungicida i dr.

U toku konzerviranja i skladištenja stočne hrane rast i razmnožavanje gljivica, te proizvodnja mikotoksina zavise

od vrste supstrata, odnosno od njegovih hemijskih i fizičkih svojstava, od uticaja okoline, intenzivnosti kontaminacije, vrsti prisutne mikroflore i dr. Najznačajniji faktori koji su u praksi bitni za brzi razvoj i razmnožavanje mikroorganizama i proizvodnju toksina su vlaga, temperatura i vreme skladištenja. Najvažnije je da se reducira vlaga ispod nivoa koji je potreban za germinaciju i razmnožavanje spora i da se takva količina vlage u supstratu održava za čitavo vreme skladištenja.

U godinama kada su klimatski uslovi veoma neugodni često postoje objektivne teškoće oko pravovremenog konzerviranja ogromnih količina stočne hrane, pa je zato

potrebno šire upotrebljavati različita hemijska sredstva koja mogu inhibirati ili uništiti različite mikroorganizme. Najčešće se u tu svrhu upotrebljavaju organske kiseline i njihove soli, organske boje i formaldehid.

U literaturi ima dosta podataka o detoksikaciji stočne hrane, s ciljem da se mikotoksini unište ili vezuju u neškodljive spojeve. Najčešće se primenjuju različite kiseline, alkalije, različiti polimeri i dr. Takvo tretiranje je skupo i do sada nije dalo očekivane rezultate. Najviše je bilo pokušaja detoksikacije stočne hrane kontaminirane aflatoksinom.

Literatura

- Balzer, I., Bogdanić, Č., Mužić, S., Pepeljnjak, S. (1977): Neki vanjski faktori koji utječu na zagađenje kukuruza plijesnima. *Krmiva* 19, 101-104.
- Chung, W. C., Truckness, M. W., Giles, A. L., Friedeman, L. (1974): Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 57, 5, 1121-1127.
- Eppley, R. M. (1968): Screening method for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 51, 174-178.
- Gedek, B. (1974): Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 81, 29-76.
- Ghosal, S., Biswas, K., Srivastava, R. S., Chakrabarti, D. K., Chaudhar, K. C. (1978): Occurrence of zearalenone, diacetoxyscirpenol and T-2 toxin in moldy corn infected with *Fusarium modiliforme*. *Sheld. J. Phar. Sci.* 67, 12, 1768-1769.
- Hlubna, D.: Istraživanja aflatoksina, zearalenona i ohratoksina A na žitaricama i grahu u području endemske nefropatije u Semberiji. *Simp. mikotoksinima, Sarajevo, 1979*, 81-85.
- Hlubna, D., Ožegović, L.: Rezultati istraživanja mikotoksina (aflatoksina B₁, ohratoksina A i zearalenona) u Bosni i Hercegovini. *II simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo 1986*, 65-70.
- Klemenc, N., Vospernik, P., Brglez, I., Žust, J. (1972): Raziskovanje plesnivosti krmil u Sloveniji s posebnim ozikom na prisotnost aflatoksinova. *Zb. biotehn. fak. UL, Vet.* 9, 61-74.
- Klemenc, N., Vospernik, P., Žust, J. (1975): Mikotoksikoze zaradi plesnive koruze. *Kontaminacija koruze z aflatoksinom B₁ in toksinom F-2 (zearalenonom)*. *Zb. biotehn. fak. UL, Vet.* 12, 83-95.
- Kordić, B., Muntanola-Cvetković, M., Panin, M. (1979): Field and laboratory studies of swine mycotoxicosis in the S. R. of Serbia (Yugoslavia). *Zb. Vet. Med. B.* 26, 540-550.
- Kordić, B., Panin, M., Kandić, S., Lončarević, A., Muntanola-Cvetković, M.: Rezultati višegodišnjeg mikrobiološkog i mikotoksikološkog istraživanja stočne hrane u SR Srbiji. *II. simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 1986*, 17-28.
- Lacey, J.: *Trichothecenes and other mycotoxins. Proceedings of the international mycotoxin symposium, Sydney 1984*, Wiley and Sons, 1985.
- Medanić, B., Žakula, S.: *Bakteriološka pretraga hrane za stoku. Priručnik za laboratorijsku diagnostiku*, Beograd, 1984.
- Mišustin, E. N., Trisvjatskij, L. A.: *Mikrobi i zerno*. Moskva, 1963.
- Mužić, S., Pepeljnjak, S., Bogdanović, C., Balzer, I. (1976): Nalazi ohratoksina A u kukuružu. *Vet. arh.* 46, 69-73.
- Nemanić, A., Brlek, V., Ramljak, D., Matečić, D.: Nalazi mikotoksina u krmivima i krmnim smjesama za ishranu peradi i drugih životinja. *II simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 1986*, 51-58.
- Pepeljnjak, S., Čturić, S. (1978): Pregled istraživanja mikotoksina. *Vet. Arh.* 48, 33-35.
- Pepeljnjak, S., Čturić, S., Topolko, S., Munk, M. (1979): Faktori koji utječu na stvaranje mikotoksina kod kukuruza. *Krmiva* 5, 109-112.
- Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z.: Mikološka i mikotoksikološka kontaminacija žitarica na širem anefropatičnom području SR Hrvatske. *II simpozijum o mikotoksinima, Sarajevo, 1986*, 29-42.
- Pozvari, M. (1985): Bakteriologisch-mykologische Untersuchung von Futtermitteln. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 92, 205-244.
- Pribičević, S., Rajić, I., Kordić, B. (1972): Prilog poznavanju sadržaja aflatoksina u arašidovoj sačmi i nekim drugim stočnim hranivima. *Vet. Glasn.* 26, 5-10.
- Romer, T. R., Boling, T. M., McDonald, J. L. (1978): Gas-liquid chromatographic determination of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 61, 4, 801-808.
- Rukmini, C., Bjač, R. V. (1973): Occurrence of T-2 toxin in *Fusarium* - infested sorghum from India. *Agric. Food. Chem.* 26, 3, 647.
- Schmidt, H. L. (1968): Zur Mikrobiologie der Handels-Futtermittel. *Landw. Forsch.* 21, 2.
- Schmidt, H. L. (1975): Über Vorkommen und Häufigkeit von hohen Pilzkeimgehalten sowie einzelner Pilzarten in Futtermitteln. *Landwirtsch. Forsch.* 28, 3, 224-233.
- Schmidt, H. L. (1975): *Futtermittelmikrobiologie und Futtermittelqualität. Bodenkultur* 28, 362-370.
- Schmidt, H. L., Bucher, E., Spicher, G. (1981): Keimgehaltbestimmung von Bakterien Schimmelpilzen und Hefen in Futtermitteln Nährböden und Methodik. *Landwirtsch. Forsch.* 34, 4, 242-250.
- Schmidt, H. L.: *Mikrobiologische Aspekte der Futtermittelbewertung. Landwirtsch. Forsch., Sonderh. 38, Kongressband Trier, 95-104, 1981.*
- Stamatović, S., Lješević, Ž., Đuričković, S. (1963): O jednoj fungionalj alimentarnoj intoksikaciji svinja. *Vet. Glasn.* 17, 507-510.
- Šutić, M., Pantović, D., Kordić, B., Matić, S., Lješević, O., Svilar, N.: Aflatoksini u hrani i hranivima. *Simpozium o mikotoksinima, Sarajevo, 63-74, 1979.*
- Trucksess, Mary, W., Nesheim, S., Eppley, R. M. (1984): Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, 1, 40-45.
- Vospernik, P., Klemenc, N., Žust, J., Vengušt, A., Pestevšek, U. (1978): Določanje sterigmatocistina, zearalenona, aflatoksina B₁ in ohratoksina A v krmnih mešanica. *Zb. biotehn. fak. UL, Vet.* 15, 1, 21-30.
- Vengušt, A.: Etiologija mikotoksikoz pri domačih živalih v Sloveniji. *Doktorska disertacija, Ljubljana 1985.*
- Willie, T. D., Morehouse, L. G.: *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicosis. Vol. 2, Mycotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry and aquatic invertebrates and vertebrates.* New York; Basel: Dekker, 1978.

CURRENT PROBLEMS CONCERNING ANIMAL FEED CONTAMINATION BY MICROORGANISMS, ESPECIALLY BY FUNGI AND MYCOTOXINS

SUMMARY

The article describes the problem of feed contamination by microorganisms, especially by ubiquitously spread bacteria and fungi, which can cause feed deterioration and under certain circumstances produce toxic metabolites which are harmful to the animal health. General bacteriological and mycological tests for the total number and for single groups of microorganisms can not lead to a satisfactory evaluation of hygienic status and the degree of harmfulness of feed mixtures for domestic animals. Such tests should be completed by special microbiological methods for isolation of obligatory and facultatively pathogenic germs – which regularly represent a smaller part of feed contaminants – and also by organoleptic microscopic and especially by toxicological methods and biological experiments. There is an urgent need to start with the inauguration of uniform methods for microbiological tests of feed mixtures and the adjustment of our standards to the world standards.

The results are quoted of mycological and mycotoxicological feed tests in Slovenia and Yugoslavia. From 1979 to 1988 5317 regularly used feed samples were tested in Slovenia. 16.5% of samples were found to have an inadequate microbiological status.

860 mycologically strongly contaminated feed samples were tested for levels of aflatoxin B₁, F-2 toxin, ochratoxin A and sterigmatocystine. Mycotoxins were found in 155 (18%) samples: most frequently F-2 toxin e. g. in 8.7% of samples in concentrations of 0.5 – 30 mg/kg, ochratoxin A in 7.5% of samples (2 – 3000 µg/kg) and aflatoxin B₁ in 1.8% of samples (4.0 – 150 µg/kg).

426 different ingredients and feed mixtures which have caused or were believed to have caused health disturbances in animals were tested for dermatotoxicity. A positive reaction was stated in 34.5% of samples and a very strong reaction was found in 10.3% of samples. Among 47 tested and very dermatotoxic samples the T-2 toxin (1 – 3.5 mg/kg) was found in 9.3% of samples, diacetoxiscirpenol (1.2 mg/kg) in 2.3% and deoxynivalenol (0.75 – 3.5 mg/kg) in 29.4% of samples. Because of a large number of various trichotecenes in animal feed, obligatory tests for dermatotoxicity are recommended for all mycologically strongly contaminated feed mixtures.

A trial with mouldy maize as basic ingredient for preparation of feed mixtures in Yugoslavia has proved that in our ecological circumstances, the F-2 toxin and dermatotoxic trichotecenes are the most frequent and the most important toxins. Although the contamination with aflatoxin B₁ is relatively rare, it should not be neglected because of cancerogene effects of this toxin. More frequent is the contamination by ochratoxin A, whereas sterigmatocystine has not been found in our feed mixtures.