

# AFLATOKSINI U STOČNOJ HRANI I MLIJEKU U REPUBLICI HRVATSKOJ OD 2012, DO 2017.

---

**Gotić, Ivana**

**Master's thesis / Specijalistički diplomski stručni**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Križevci college of agriculture / Visoko gospodarsko učilište u Križevcima**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:185:658538>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Križevci University of Applied Sciences](#)



REPUBLIKA HRVATSKA  
VISOKO GOSPODARSKO UČILIŠTE U KRIŽEVCIMA

Ivana Gotić, bacc. ing. agr.

**Aflatoksini u stočnoj hrani i mlijeku u  
Republici Hrvatskoj od 2012. do 2017.**

Završni specijalistički diplomski stručni rad

Križevci, 2018.

REPUBLIKA HRVATSKA  
VISOKO GOSPODARSKO UČILIŠTE U KRIŽEVCIMA

Specijalistički diplomski stručni studij

*Poljoprivreda*

Usmjerenje: *Održiva i ekološka poljoprivreda*

Ivana Gotić, bacc. ing. agr.

**AFLATOKSINI U STOČNOJ HRANI I MLIJEKU U  
REPUBLICI HRVATSKOJ OD 2012. DO 2017.**

Završni specijalistički diplomski stručni rad

Povjerenstvo za obranu i ocjenu završnoga rada:

1. Dr.sc. Tatjana Tušek, prof. v. š., predsjednica povjerenstva i članica
2. Dr.sc. Dražen Čuklić, prof. v. š., mentor i član
3. Dr. sc. Marcela Andreato-Koren, prof. v. š., članica



# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2.1. Mikotoksini.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2.1.1. Mikotoksini kroz povijest .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.2. Podjela mikotoksina .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.2.1. Aflatoksini.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.2.1.1. Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) u hrani za ljude i životinje .....</b> | <b>8</b>  |
| <b>2.2.1.2. Aflatoksin M<sub>1</sub> u mlijeku.....</b>                                       | <b>11</b> |
| <b>2.3. Izvori kontaminacije mikotoksinima .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2.4. Mikotoksikoze .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.5. Suzbijanje mikotoksina .....</b>  | <b>20</b> |
| <b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>4.1. Sadržaj AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani .....</b>                                     | <b>24</b> |
| <b>4.2. Sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku .....</b>   | <b>27</b> |
| <b>5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>SUMMARY .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>ŽIVOTOPIS.....</b>   | <b>39</b> |

## 1. UVOD

Danas je u svijetu poznato oko 400 raznih mikotoksina. Ovi toksični metaboliti plijesni onečišćuju hranu, uzročnici su različitih bolesti kod ljudi i životinja, dovodeći i do brojnih šteta u gospodarstvu. U zadnjih par godina, uslijed promjene klime te porasta brojnosti mnogih vrsta mikotoksina, pojačala se zainteresiranost struke i javnosti za ovaj noviji javno zdravstveni problem.

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja prisutnosti najznačajnijeg mikotoksina, aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) u stočnoj hrani i aflatoksina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) u uzorcima s područja Republike Hrvatske mlijeku. Podaci se odnose na razdoblje od 2013. do 2017. na području.

Cilj istraživanja je ukazati na važnost ispitivanja stočne hrane na sadržaj mikotoksina. Svrha je potvrditi da se ranim otkrivanjem aflatoksina B<sub>1</sub> u stočnoj hrani umanjuje mogućnost prijenosa na mliječne krave, točnije mlijeko, a preko mlijeka dalje prenošenje na ljude. Istražena je povezanost između sadržaja aflatoksina B<sub>1</sub> u stočnoj hrani sa sadržajem aflatoksina M<sub>1</sub> u mlijeku.

Pretpostavka je da će se istraživanjem utvrditi povezanost između sadržaja aflatoksina B<sub>1</sub> u stočnoj hrani i sadržaja aflatoksina M<sub>1</sub> u mlijeku, odnosno da će se s povećanjem sadržaja aflatoksina B<sub>1</sub> u stočnoj hrani javiti povećanje sadržaja aflatoksina M<sub>1</sub> u mlijeku.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Mikotoksini

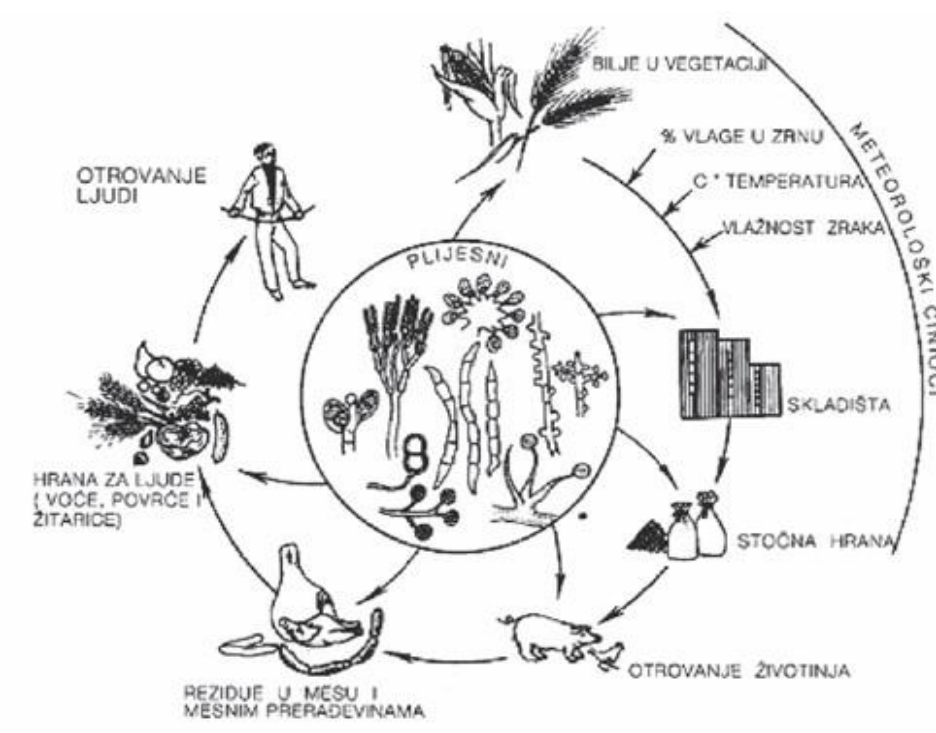
Mikotoksini (gr. mykes – gljiva, toxicon – otrov) su sekundarni produkti metabolizma koje plijesni sintetiziraju tijekom rasta na supstratima biljnog i životinjskog podrijetla. Kao česti onečišćivači hrane, uz brojne značajne štete u gospodarstvu, uzročnici su različitih bolesti, najčešće putem hrane, rjeđe respiratornim putem. Bolesti koje uzrokuju su mikotoksikoze. Mikotoksini predstavljaju veliki problem za ljude i životinje u brojnim zemljama svijeta. Prema procjeni FAO-a, 25% hrane koja se proizvodi u svijetu kontaminirano je mikotoksinima (IP<sup>1</sup>). Mikotoksini su kemijski spojevi različite strukture, različitoga biološkoga učinka, u pravilu bez boje i okusa. Stabilni su i u pravilu otporni na povišenu temperaturu. Njihova biosinteza ovisi o vrsti toksikotvorne plijesni, o klimatskim i okolišnim uvjetima, fizikalno-kemijskim čimbenicima (temperaturi: od -5 do 60 °C, sadržaju vode u namirnici: 13% i više, aw-vrijednosti: iznad 0,65; pH-vrijednosti: 3-9, te koncentraciji plinova u atmosferi i sastavu namirnice (Šarkanj i sur., 2010). Hrana onečišćena mikotoksinima predstavlja bitan problem za ljude i životinje. Posebno značajan problem predstavlja mogućnost prijenosa mikotoksina i njihovih metabolita na ljude, putem jestivih životinjskih proizvoda (Mašek i Šerman, 2006). Mikotoksini predstavljaju vrlo stabilne spojeve koji dugo ostaju u sirovinama i životinjskim proizvodima te predstavljaju velik rizik zbog mogućeg prijenosa na ljude (Valpotić i Šerman, 2006). Zdravstveno ispravna i kvalitetna hrana za životinje esencijalni je preduvjet zdravlja i produktivnosti životinja, kao i sprečavanja kontaminacije hrane za ljude (Sokolović, 2005). U današnjim, ekološki narušenim uvjetima življenja, problem mikrobne kontaminacije hrane (namirnica), primarno patogenim mikroorganizmima, odnosno njihovim toksinima, tijekom čitavoga prehrambenoga lanca (od polja do stola), na svjetskoj razini poprima sve veći značaj. Razlog tome je zaštita zdravlja u ljudi i životinja, zaštita ekonomije i trgovine, uz dosljedno pridržavanje zakonske regulative (Šarkanj i sur., 2010).

Čak i u malim količinama predstavljaju opasnost za zdravlje životinja i ljudi. Ljudi i životinje mikotoksine unose na tri načina:

1. putem hrane,
2. udisanjem i
3. preko kože.

Izravnom ili neizravnom kontaminacijom mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka ili životinja te osim što mogu biti prisutne u voću, povrću i žitaricama, također se izlučuju putem životinjskih proizvoda, odnosno putem mlijeka, mesa i jaja (Slika 1.).

Iz toga proizlazi postojanje primarne kontaminacije, u koju spada kontaminacija žitarica i hrane biljnog podrijetla, te sekundarne kontaminacije, koje podrazumijevaju da, ako su životinje hranjene kontaminiranim žitaricama, ostaci mikotoksina mogu se pronaći i u hrani životinjskog podrijetla (mesu, mlijeku, jajima).



Slika 1. Put mikotoksina u hranidbenom lancu

Izvor: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani* (Šarkanj i sur., 2010)

### 2.1.1. Mikotoksini kroz povijest

U povijesti se nailazi na podatke o masovnim trovanjima ljudi i životinja, koja su povezana s konzumiranjem pljesnive hrane i stočne hrane.

Tako se trovanja mikotoksinima, spominju već 943. godine kao “Vatra sv. Ante” uzrokovana ergot alkaloidima nastalim razvojem plijesni *Claviceps purpurea* na žitarici raži. Spominje se da su žrtve “Vatre sv. Ante”, ergotizma, bili izloženi i dietilamidu



lizergične kiseline (LSD), halucinogenom sredstvu, nastalom pri pečenju kruha od pšenice koja je sadržavala ergot. Ergotizam je bio odgovoran uzročnik smrti tisuća ljudi u Europi u srednjem vijeku. Obilježavaju ga simptomi otrovanja kao žareća bol u udovima, jaka žeđ, grčevi, povraćanje, proljev, halucinacije, napadaji, svrbež. Zbog jakog spazma arterija može doći do prekida cirkulacije u okrajcima tijela (prsti, uške, nos) i suhe gangrene. Godine 1039. zabilježena je epidemija ergotizma u Francuskoj. Za vrijeme ovog izboja Gaston de la Valloire je dao izgraditi bolnicu kako bi se pomoglo oboljelima. Bolnica je posvećena sv. Antunu, pa se stoga i bolest počela nazivati „vatra sv. Antuna“. Kasnije je osnovan i red sv. Antuna i izgrađeno je preko 370 bolnica kako bi se pružila pomoć oboljelima od „svete vatre“, u ime sv. Antuna (Brajdić, 2014). U Novom vijeku također postoje zapisi o slučajevima koji se pripisuju ergotizmu i to godine 1691. i 1692. na suđenju vješticama u Salemu. Prema zapisima pretežito su obolijevali djeca i mlade žene, a simptomi poput grčevitih napada, bockanja, grizenja te ukazanja demona i utvara, umjesto ergotizmu, pripisani su činovima vještica, koje su zbog toga bile optužene na smrt. Također je poznati slučaj masovnog trovanja ljudi koji se dogodio 15. kolovoza 1951. godine, u malom gradu Pont-Saint-Esprit u južnoj Francuskoj, poznat pod nazivom Le Pain Maudit. Oboljelo je više od 250 ljudi, a zabilježeno je 7 smrtnih slučajeva. Postojala je sumnja na bolest u prehrani jer se činilo da su žrtve imale jednu zajedničku vezu. Naime, svi su jeli kruh iz pekare Roch Briand. Znanstvenici su već u rujnu 1951., prema pisanju u British Medical Journalu, izjavili da je do izbijanja trovanja došlo zbog jedenja kruha od raženog zrna, koji je bio zaražen gljivicom.

Između 1930. i 1940. godine u SSSR-u je bila učestala pojava alimentarna toksična aleukija (ATA), povezana je s trihotecenima koje proizvode plijesni *Fusarium* na pšenici, prosu i ječmu. Godine 1934. na Srednjem zapadu u Sjedinjenim Američkim državama zabilježen je masovni pomor životinja u kojem je više od 5 000 konja uginulo od “bolesti uzrokovane kukuruznom plijesni”.

Intenzivnije proučavanje toksičnih učinaka mikotoksina započinje 1960. zbog znatnih ekonomskih gubitaka u Velikoj Britaniji uzrokovanih pomorom mladih purana, svinja i fazana. Otkrivena je plijesan *Aspergillus flavus* i utvrđeno je da je za ugibanje životinja odgovoran karcinogen i toksičan aflatoksin B<sub>1</sub> koji je bio izoliran iz brašna kikirikija (Perši i sur., 2011), uvezenog iz Brazila. Ovo akutno otrovanje aflatoksinom poznato kao „X bolest purana“ uzrokovalo je uginuće 100 000 purića i 20 000 druge peradi od akutne nekroze jetre i hiperplazije žučnih kanala. Ta se godina smatra prekretnicom u snažnijem pristupu istraživanjima mikotoksina u modernoj povijesti. Također se 1972.

pojavio problem odbijanja hrane kod svinja u pojasu "Corn Belt", što se pripisuje prisutnosti mikotoksina u stočnoj hrani.

U najnovijoj povijesti naše regije, točnije 2013., izbila je vrlo poznata afera oko pojave aflatoksina M<sub>1</sub> u mlijeku. U kontroliranim uzorcima trajnog mlijeka s polica supermarketa i trgovina u Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj i Srbiji, količina aflatoksina M<sub>1</sub> iznosila je više od dozvoljene granice od 0,05 µg/kg mlijeka, što nije bilo prema standardu EU i naravno, predstavljalo je opasnost po same potrošače. Niti Slovenija nije bila pošteđena, jer je Nacionalni slovenski institut za veterinarstvo, analizom otkrio aflatoksin u mlijeku na dvije slovenske farme početkom 2014. Kako to poslije i biva, uslijedilo je prebacivanje krivice s jedne zemlje na drugu. Nitko nije želio priznati vlastitu pogrešku i opravdanje se tražilo u konstataciji da je nekvalitetan kukuruz uvezen iz druge zemlje (IP<sup>2</sup>). Iako nije poznato da je zabilježen slučaj trovanja kod ljudi ili životinja, ipak je to bio veliki moralni i ekonomski udarac proizvođačima mlijeka i mljekarama.

## **2.2. Podjela mikotoksina**

Mikotoksini se međusobno razlikuju na osnovu tipa plijesni, bioloških učinaka na organizam čovjeka ili životinje, zatim kemijske strukture i prema učinku kojeg ispoljavaju u organizmu. S obzirom na to postoji nekoliko načina njihove podjele:

1. Prema tipu plijesni:
  - Plijesni polja: *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium* i *Alternaria*
  - Plijesni skladištenja: *Penicillium* i *Aspergillus*
  - Plijesni uznapredovalog kvarenja: *Rhizopus*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Papulospora* i *Sordaria*
2. Prema biološkom učinku na organizam čovjeka ili životinje:
  - Mutageni
  - Karcinogeni
  - Imunosupresivni
  - Estrogeni
  - Teratogeni
3. Prema kemijskoj strukturi:
  - Seskviterpene
  - Kumarine
  - Laktone

#### 4. Prema učinku kojeg ispoljavaju u organizmu:

- Hepatotoksične: aflatoksini
- Nefrotoksične: ohratoksin i citrinin
- Neurotoksične: fumonizin i patulin
- Citotoksične: trihoteceni

Najvažniji mikotoksini su aflatoksini, ohratoksin A (OTA), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEN), fumonizini B1, B2 i B3 (FB1, FB2, FB3), citrinin (CTN) i drugi trihoteceni, patulin (PAT) i ergot alkaloidi (EA).

Glavne toksikogene vrste plijesni i njihovi glavni mikotoksini navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Glavne toksinogene vrste plijesni i njihovi glavni mikotoksini

| Rod gljivice    | Mikotoksin  |
|-----------------|---|
| Aspergillus sp. | Aflatoksin, Ohratoksin A, Ciklopiazonična kiselina  |
| Fusarium sp.    | Deoksinivalenol (Vomitoksin, DON), T-2 toksin, Diacetoksiscirpenol(DAS), Zearalenon, Fuminosini |
| Penicillium sp. | Patulin, Ohratoksin A   |
| Cladosporium sp | Emodin, Kladosporin   |

Izvor:IP<sup>3</sup>

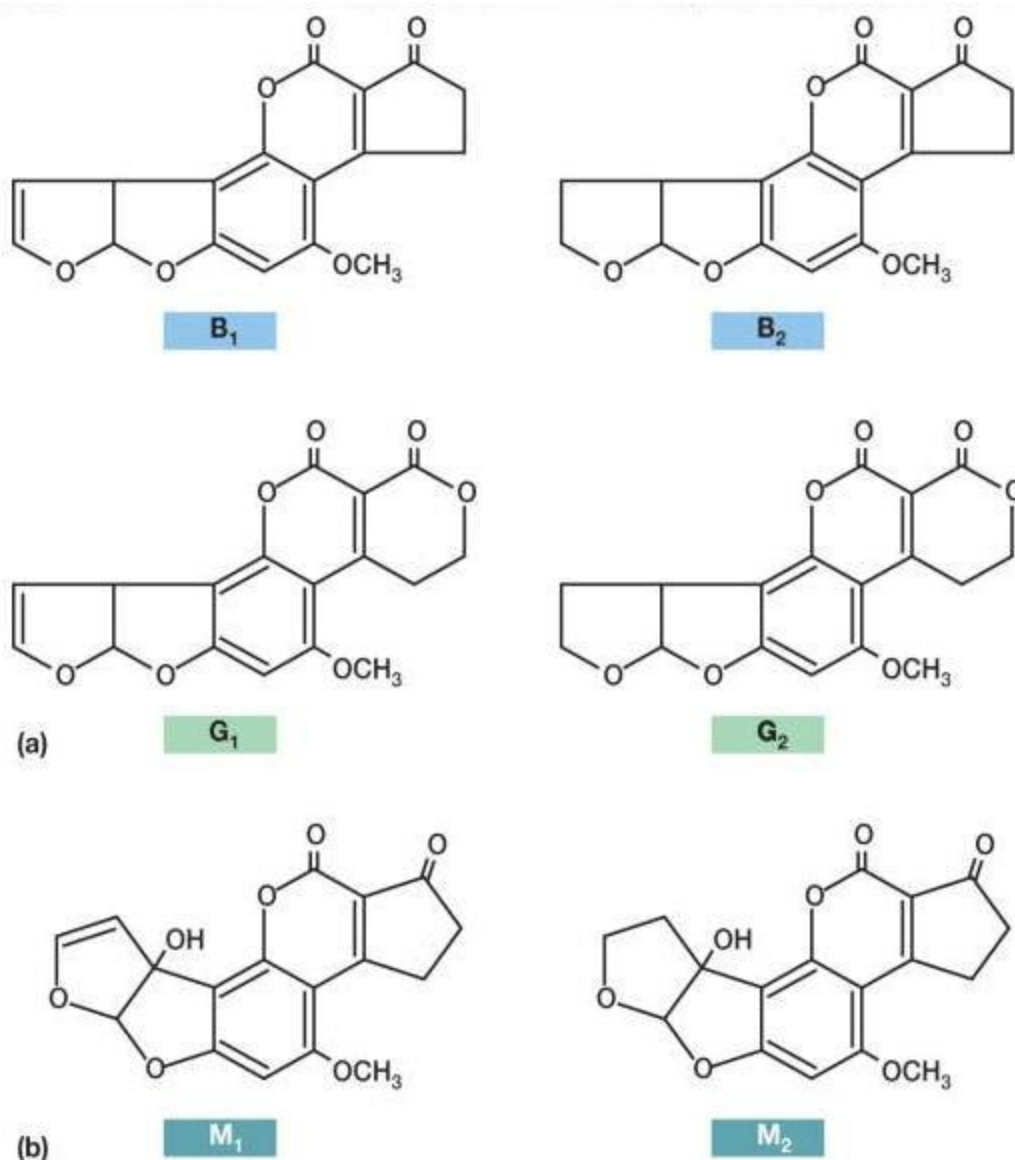
U ovom radu obrađena su dva mikotoksina i to aflatoksin AFB<sub>1</sub> i aflatoksin AFM<sub>1</sub>.

##### 2.2.1. Aflatoksini

Aflatoksini su najpoznatiji i najtoksičniji uzročnici mikotoksikoza u ljudi i životinja. Aflatoksini su metabolički produkti plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* koje ih sintetiziraju već u polju, kao i tijekom žetve te skladištenja i prerade žitarica. priPovoljne su temperature između 24 i 35 °C i vlažnost iznad 7%, a 10% u ventiliranom prostoru (Williams i sur., 2004). Svojstvo termostabilnosti tijekom prerade hrane aflatoksine svrstava u potencijalno opasne metabolite plijesni.

Danas je poznato dvadesetak aflatoksina, od kojih su najznačajniji aflatoksini B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> poznatiji kao ukupni aflatoksini te u mlijeku Aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>.

Na slici 2. prikazana je strukturna kemijska formula navedenih aflatoksina.



Slika 2. Strukturne kemijske formule aflatoksina

Izvor: IP<sup>4</sup>

Pobrojane plijesni iz tablice 1. se često nalaze među žitaricama, bademima, orasima, kikirikijem, pamučnim sjemenom i kineskom šećernom trskom. Razvoj mikroorganizama se može javiti kao posljedica oštećenja namirnica od strane insekata, sporog sušenja i uskladištenja u vlažnim uvjetima (IP<sup>8</sup>). Aflatoksini su prirodni derivati kumarina. Vidljivi su u UV–spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G dobili su prema boji fluorescencije. Tako oznaka B označuje plavu (eng. blue), a G za zelenu (eng. green) boju. Topljivi su u organskim otapalima poput alkohola, acetona i kloroforma, a u vodi se gotovo ne tope. Termostabilni su i u prirodnom stanju vežu se uz proteine koji ih štite od nepovoljnih vanjskih utjecaja (IP<sup>12</sup>). Utvrđivanje prisutnosti aflatoksina u hrani za životinje

je važno zbog moguće kontaminacije mlijeka u životinja hranjenih s aflatoksin-kontaminiranom hranom (Bilandžić i sur., 2013).

Limbikani i sur. (2014) ističu da se koncentracija aflatoksina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) u ukupnom aflatoksinu uglavnom kreće  $\geq 50\%$  te nam daje potvrdu da povišena koncentracija kod ukupnih aflatoksina najvećim dijelom dolazi od AFB<sub>1</sub>. Hidroksilacijom prethodno navedenih ukupnih aflatoksina, a prije svega AFB<sub>1</sub> i AFB<sub>2</sub> u hrani i krmivima nastaje njihov najtoksičniji metabolit aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), (Krska i sur., 2008).

### **2.2.1.1. Aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) u hrani za ljude i životinje**

AFB<sub>1</sub> je najtoksičniji aflatoksin koji se nalazi u brojnim namirnicama biljnoga i životinjskoga podrijetla. Nalazi ga se u poljoprivrednim proizvodima, žitaricama, uljaricama, kavi, riži, kikirikiju, pistacijama i dr. Od svih mikotoksina on je najvažniji kancerogen. Podnosi izuzetno visoke temperature (do 260 °C) te se stoga ne može ukloniti termičkom obradom namirnice.

Ciljni organ toksičnog djelovanja AFB<sub>1</sub> je jetra, a izraženost promjena ovisna je o dozi, dužini izloženosti, životinjskoj vrsti, uzgoju i uhranjenosti. Uz akutni i kronični toksični učinak, aflatoksini imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Otrovanje s velikim dozama AFB<sub>1</sub> može imati smrtni ishod, subletalne doze uzrokuju kronično otrovanje, a kronična izloženost niskim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno primarni karcinom jetre (Domaćinović i sur., 2012). AFB<sub>1</sub> svrstan je, zbog svoga dokazanoga karcinogenoga učinka na životinje i ljude, prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer - IARC), u Skupinu 1. (Šarkanj i sur., 2010). Prema Pravilniku o sigurnosti hrane za životinje, u daljnjem tekstu *Pravilnik 1* (NN 102/16) dopuštena količina aflatoksina propisana je Prilogom Uredbe Komisije (EU) br. 574/2011 od 16. lipnja 2011. o izmjeni Priloga I. Direktivi 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu najvećih dopuštenih količina za nitrit, melamin, *Ambrosia spp.* i neizbježnog prenošenja nekih kokcidiostatika i histomonostatika i o konsolidaciji Priloga I. i II. Direktivi (SL L 159, 17. 6. 2011.) (u daljnjem tekstu Uredba Komisije (EU) br. 574/2011). Uredba komisije (EU) 574/2011 donosi sljedeću tablicu u odjeljku II: Mikotoksini (tablica 2.).

Tablica 2. Dopuštena količina aflatoksina B<sub>1</sub> u Republici Hrvatskoj kada udio vlage u hrani za životinje iznosi 12%

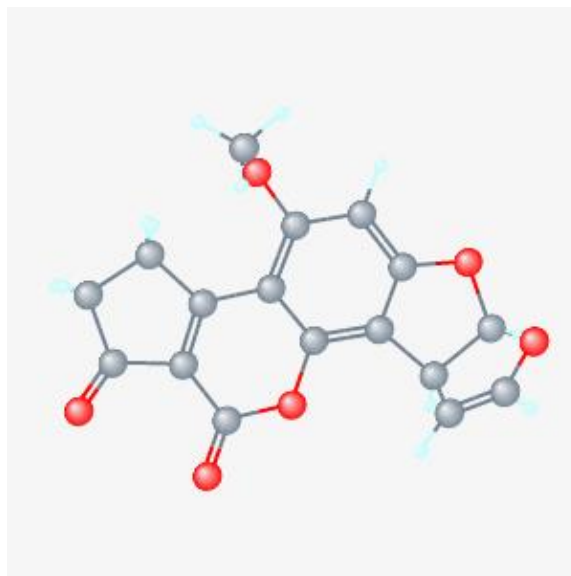
| Nepoželjne tvari                              | Proizvodi namijenjeni za hranu za životinje   | Najveća dopuštena količina u mg/kg (ppm) kada udio vlage u hrani za životinje iznosi 12% |
|---|---|--|
| 1.Aflatoksin B1                               | Krmiva  | 0,02   |
|   | Dopunske i potpune krmne smjese   | 0,01   |
|   | osim:   |  |
|   | - potpunih krmnih smjesa za mliječna goveda i telad, mliječne ovce i janjad, mliječne koze i jarad, prasadi i mladu perad   | 0,005  |
|   | - potpune krmne smjese 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   |
| 1.Glavnica raži ( <i>Claviceps purpurea</i> ) | Krmiva i krmne smjese koje se sastoje od nemljevenih žitarica   | 1 000  |

Izvor: Uredba komisije (EU) 574/2011

Kod sisavaca se AFB<sub>1</sub> i AFB<sub>2</sub> metaboliziraju u AFM<sub>1</sub> i AFM<sub>2</sub> i to u mliječnim žlijezdama. Tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka smanjuje se količina AFM<sub>1</sub>, ali bez obzira na to, AFM<sub>1</sub> može narušiti zdravlje ljudi, a prije svega ugrožena su djeca jer oni najviše konzumiraju mlijeko te mliječne proizvode.

Zbog promjene klimatskih uvjeta i globalnoga zatopljenja počeo se pojavljivati aflatoksin u žitaricama, mlijeku i mliječnim proizvodima i u umjerenim klimatskim područjima (Peraica i sur., 2014). Bitno je istaknuti da se tek unatrag 20-ak godina počela evidentirati prisutnost aflatoksina u uzorcima hrane i stočne hrane, premda većinom u koncentracijama unutar propisanih vrijednosti. Tako su Griessler i sur. (2010) na području južne Europe u razdoblju od 2005. od 2009. ispitali 416 uzoraka stočne hrane i utvrdili prosječnu koncentraciju ukupnog aflatoksina od 3 µg/kg. Autori su istaknuli da nije došlo do značajnije intoksikacije aflatoksinima u odnosu na ostale vrste mikotoksina. U istraživanju 2009. u Republici Hrvatskoj utvrđena je prisutnost AFB<sub>1</sub> kod 24-31% uzoraka, ali ispod količina dopuštenih *Pravilnikom 1* (Mitak i sur., 2013, cit. prema Šegvić i sur., 2009). Povoljni klimatski uvjeti 2012. potaknuli su proizvodnju plijesni na žitaricama, a s njima i veću pojavu aflatoksina. Hrvatska agencija za hranu u rezultatima studije iz 2012., gdje se navode podaci za 300 uzoraka stočne hrane, utvrdila 20%-tnu pojavnost AFB<sub>1</sub> u rasponu od 1-10 µg/kg. Istovremeno je Sinković (2012) potvrdio prisutnost aflatoksina na žitaricama iz ekološkog i konvencionalnog uzgoja u koncentraciji manjoj ili neznatno iznad 1,0 µg/kg. Da je pojavnost aflatoksina postala sve učestalija ukazala nam je Ninković

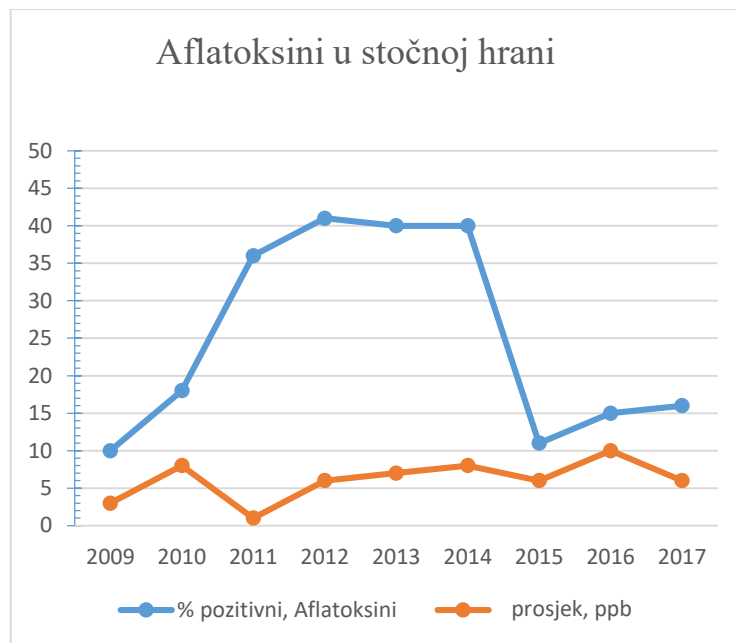
(2016), u čijem se radu utvrđivao sadržaj aflatoksina na 200 uzoraka zrna kukuruza i utvrđeno je da su ih 18% bili pozitivni s prosječnim sadržajem od 12,31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . S druge strane, u uzorcima silaže nije utvrđena prisutnost aflatoksina.



Slika 3. Aflatoksin B<sub>1</sub>

Izvor: IP<sup>5</sup>

Da je intoksikacija aflatoksinima u porastu pokazuju rezultati istraživanja tvrtke Biomin koja je u svojem "Romer" Laboratoriju u Tulin, Austrija ispitala 15 596 uzoraka stočne hrane s područja Europe u razdoblju od 2009.-2017. godine. U grafu 1. prikazano je kretanje broja pozitivnih (%) uzoraka i kretanje prosječnog sadržaja aflatoksina u  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , na uzorcima stočne hrane.



Graf 1. Kretanje sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani u Europi u razdoblju od 2009.- 2017.

Izvor: IP<sup>11</sup>

Iz istraživanja tvrtke Biomin vidi se kontinuirani porast broja pozitivnih uzoraka izraženo u postotku te porast prosječnog sadržaja aflatoksina u razdoblju od 2009.-2017. godine. Pri tome je bitno istaknuti da znanstvenici tvrtke ističu znatnu zastupljenost i intoksikaciju zrna kukuruza u odnosu na ostale istražene žitarice (pšenica, ječam, zob, tritikal i krmne smjese).

#### 2.2.1.2. Aflatoksin M<sub>1</sub> u mlijeku

AFM<sub>1</sub> je hepatokarcinogeni metabolit, dobiven hidrosilacijom aflatoksina B<sub>1</sub> pronađen u mlijeku krava koje su konzumirale hranu zagađenu aflatoksinom B<sub>1</sub> (Bilandžić i sur, 2013). Sintetiziraju ga plijesni iz roda *Aspergillus*. Nalazi se u mlijeku i mliječnim proizvodima. Dopuštena količina AFM<sub>1</sub> u Republici Hrvatskoj regulirana je Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani, u daljnjem tekstu *Pravilnik 2* (NN 146/2012) prema kojem je propisano sljedeće, prikazano u tablici 3.



Tablica 3. Dopuštena količina aflatoksina M<sub>1</sub> u Republici Hrvatskoj

| AFLATOKSIN M <sub>1</sub>  | Najveće dopuštene količine (µg/kg) |
|--|------------------------------------|
| Sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko i mlijeko za proizvodnju mliječnih proizvoda      | 0,05                               |
| Početna i prijelazna hrana za dojenčad, uključujući početno i prijelazno mlijeko za dojenčad | 0,025                              |
| Hrana za posebne medicinske potrebe namijenjena posebno dojenčadi                            | 0,025                              |

*Izvor: Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012)*

Prema navedenom pravilniku ako je razina aflatoksina M<sub>1</sub> u mlijeku veća od dopuštene, proizvod se ne smije koristiti za prehranu ljudi, niti za proizvodnju mliječnih proizvoda. U mnogim je zemljama Europe koje nisu članice EU i u zemljama Južne i Sjeverne Amerike, Azije i Afrike dozvoljena koncentracija AFM<sub>1</sub> do razine od 50 µg/kg.

Stopa apsorpcije aflatoksina i izlučivanje AFM<sub>1</sub> u mlijeku varira između pojedinih životinja, iz dana u dan te od jedne do druge mužnje i mnogim drugim faktorima. Općenito se smatra da se otprilike 1-3% AFB<sub>1</sub> prisutnog u hrani životinja pojavljuje kao AFM<sub>1</sub> u mlijeku (Bilandžić i sur., 2013). Nakon konzumiranja hrane u kojoj je prisutan aflatoksin B<sub>1</sub> mlijeko je kontaminirano s hidroksil-metabolitom AFM<sub>1</sub>. U krava s visokim prinosom mlijeka, zbog znatno veće potrošnje količine hrane, može doći do prijenosa (carry-over) i do 6,2% (EFSA, 2004; Fink-Gremmels, 2008). Ako se konzumira hrana kontaminirana s AFB<sub>1</sub>, u mlijeku će se pojaviti AFM<sub>1</sub> dva do tri dana nakon ingestije. Isto tako dva do tri dana nakon konzumacije hrane bez aflatoksina dolazi do smanjenja koncentracija AFM<sub>1</sub> u mlijeku. Ljudi mogu biti izloženi AFM<sub>1</sub> putem endogene proizvodnje ili unosom mliječnih proizvoda. Pretpostavlja se da su najviše izložena djeca jer su najveći potrošači mlijeka i mliječnih namirnica, a ne smije se zanemariti dojenčad zbog izlučivanja toksina u mlijeku žena koje doje. Smatra se da postupak pasterizacije ili prerade u sir ne djeluje na AFM<sub>1</sub> u sirovom i obrađenom mlijeku. Unatoč tome, zbog njegove slabe topljivosti u maslacu i dobre apsorpcije u skuti, proizvodi kao što su maslac, skuta i sirutka pokazuju odstupanja u sadržaju AFM<sub>1</sub> u odnosu na izvorno mlijeko.

Zbog njihove termostabilnosti aflatoksini se javljaju i u mlijeku obrađenom ultravisokim temperaturama tzv. UHT mlijeku (engl. high temperature processing) i fermentiranim proizvodima od mlijeka. Prijenos aflatoksina od stočne hrane do mlijeka u mliječnih krava je pod utjecajem različitih fizioloških i prehrambenih čimbenika,

uključujući i režim hranidbe, stupanj digestije, zdravstvenog stanja životinja, bio transformacijski kapacitet jetre te proizvodnju mlijeka. Na zagađenje aflatoksinima utjecaj imaju hladne i tople sezone time što su u proljeće i ljeto dostupne svježije namirnice za prehranu stoke kao što su ispaša, trava, korov i sirova hranjiva, dok u vrijeme hladnih mjeseci, životinje puno češće konzumiraju suha, pripremljena hranjiva ili koncentrate. U hrvatskim ruralnim područjima česta je ishrana suhim sijenom koje nepravilnim skladištenjem uz neadekvatne uvjete može rezultirati pojavom aflatoksina. Važni činitelji o kojima ovisi razina zagađenja aflatoksinima su temperatura i vlaga. Plijesni kao što su *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* lako rastu pri temperaturi od 28 °C na hranjivima sa sadržajem vlage između 13-18%, a pogodna relativna vlažnost zraka im je između 50 i 85%. Također, ako je prisutna vlažnost zemlje i oštećenje hranjiva koji su prouzročili insekti također povećavaju mogućnost razvoja takvih plijesni. Ipak, najčešći razlog zagađenju su i dalje neadekvatni uvjeti skladištenja. Zato se u Europskoj Uniji i svijetu provode kontrole čime se nadzire proizvodnja hrane za životinje i sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku (IP<sup>10</sup>).

Danas se pri određivanju AFM<sub>1</sub> koriste orijentacijske metode među kojima je najzastupljenija ELISA metoda kao brza, jednostavna i pouzdana metoda (Bilandžić i sur., 2013). ELISA metoda se pokazala najbržom, ekonomski i ekološki prihvatljivom metodom kojom se može ispitati veliki broj uzoraka u kratkom vremenu (Šegvić Klarić i sur., 2008). Najveće dopuštene količine (NDK) propisane su Pravilnikom o sigurnosti hrane za životinje (NN 102/16) gdje se dopuštena količina aflatoksina određuje kako je propisano Prilogom Uredbe Komisije (EU) br. 574/2011 od 16. lipnja 2011. te Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012) te preporukama Europske unije (2006/576/EC). Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata (N.N. 02/05.) definira uvjete o primjeni analitičkih metoda, no bez obzira koja se analitička metoda koristi, ista prethodno treba biti ispitana kroz određivanje validacijskih parametara te mora davati točne i precizne podatke, biti dovoljno specifična za određivanje vrlo niskih koncentracija mikotoksina, odnosno imati niske limite detekcije (Mitak i sur., 2011). Stočna hrana je najčešći kontaminant dok je mlijeko temeljni prehrambeni proizvod koji može sadržavati aflatoksine. Najtoksičniji metabolit AFM<sub>1</sub> u mlijeku potencijalno je opasan za zdravlje ljudi. *Pravilnik 2* (NN 146/2012) određuje NDK za AFM<sub>1</sub> u sirovom i toplinski obrađenom mlijeku od 0,050 µg/kg.

Isto kao što se u zadnjih desetak godina počela evidentirati pojavnost aflatoksina u stočnoj hrani tako se počela evidentirati i pojavnost AFM<sub>1</sub> u sirovom mlijeku. Već su

Markov i sur. (2010) utvrdili na uzorcima (n=60) mlijeka kontinentalne Hrvatske 86,7% pozitivnih uzoraka na AFM<sub>1</sub> od kojih je 7,7% bilo iznad NDK. Zatim su Bilandžić i sur. (2010) utvrdili koncentraciju AFM<sub>1</sub> na 61 uzoraka mlijeka na mliječnim farmama u RH od prosječno 0,018 µg /l tijekom razdoblja zima-proljeće te 0,04 µg/l tijekom ljetnog razdoblja. Bilandžić i sur. (2015) posebno ističu 2013. kao prijelomnu godinu sa maksimalno izmjerenim koncentracijama AFM<sub>1</sub> u sirovom mlijeku. Autori ukazuju na visoke sadržaje AFM<sub>1</sub> u uzorcima mlijeka tijekom 2014. Tvrde da su takvi rezultati uzrokovani izbijanjem afere zbog povišenih koncentracija AFM<sub>1</sub> tijekom 2013. prije svega u istočnom dijelu Hrvatske. Tamo su izmjerene maksimalne koncentracije AFM<sub>1</sub> u mlijeku od 0,764 µg/kg, nakon čega je uslijedio pojačani monitoring na aflatoksine u stočnoj hrani i mlijeku. Zatim Womack i sur. (2015) objavljuju da su u razdoblju od 2010.-2015. utvrdili na 7 841 uzorku mlijeka i mliječnih proizvoda gotovo 75% pozitivnih uzoraka na AFM<sub>1</sub> od kojih je 26% bilo iznad NDK. Da se povišeni sadržaj aflatoksina u mlijeku zadržao nakon krize ukazali su Markov i sur. (2010). Autori su utvrdili prisustvo AFM<sub>1</sub> u mlijeku (87%) kod individualnih proizvođača kontinentalne Hrvatske. Između ostalog utvrdili su i da gotovo 7% uzoraka ima koncentraciju AFM<sub>1</sub> iznad NDV. Da se povišeni sadržaj AFM<sub>1</sub> konstantno zadnjih par godina zadržava u uzorcima svježeg mlijeka ukazuju rezultati Bilandžić i sur. (2016). Autori su utvrdili na 548 uzoraka mlijeka prosječni sadržaj AFM<sub>1</sub> od 0,0369 µg/kg u zapadnoj, 0,0311 µg/kg u središnjoj te 0,0414 µg/kg u istočnoj regiji Hrvatske tijekom veljače i ožujka 2015.

### **2.3. Izvori kontaminacije mikotoksinima**

Razvoj i intenzitet pojavljivanja mikotoksina uvjetovan je mikroklimatskim čimbenicima u različitim dijelovima svijeta te uz pogodne ekološke prilike trajno ugrožavaju proizvodnju i skladištenje stočne hrane. Geografska rasprostranjenost mikotoksina vezana je uz klimatske uvjete rasta pojedinih vrsta plijesni. Tako se npr. aflatoksini (koje uglavnom sintetiziraju *Aspergillus spp.*) nalaze češće i u većim koncentracijama na krmivima u tropskom i subtropskom području (Južna Amerika, Oceanija, Indonezija), a ohratoksini, zearalenon i trihoteceni (koje uglavnom sintetiziraju *Penicillium i Fusarium spp.*) nalaze se u umjerenom klimatskom području (Sjeverna Amerika, Europa, Azija i Rusija). Ovo je vrlo važno za pravilno usmjeravanje analitike krmiva na mikotoksine ovisno iz kojeg podneblja ona dolaze (Domaćinović i sur., 2012).

Za pojavnost plijesni i njihovih metabolita odgovorni su:

1. odgovarajući sadržaj vlage (slobodna ili aktivna voda),

2. pogodne temperature,
3. prisutnost kisika,
4. fizička oštećenja na usjevima, i
5. prisutnost gljivičnih spora.

Najčešći izvori mikotoksina u hrani su: žitarice, brašno, kruh, mahunarke, riža, mlijeko i mliječni proizvodi, meso i suhomesnati proizvodi, masline i maslinovo ulje, kava, suho voće, vino, pivo, sokovi, začini, čajevi, a u tablici možemo vidjeti pregled žitarica u kojima su dokazani mikotoksini.

Tablica 4. Pregled žitarica u kojima su dokazani mikotoksini

| MIKOTOKSIN        | pšenica | raž | ječam | zob | kukuruz | riža | proso |
|-------------------|---------|-----|-------|-----|---------|------|-------|
| Aflatoksin        |         |     |       |     |         |      |       |
| Citrinin          |         |     |       |     |         |      |       |
| Kojična kiselina  |         |     |       |     |         |      |       |
| Luteoskirin       |         |     |       |     |         |      |       |
| Okratoksin        |         |     |       |     |         |      |       |
| Patulin           |         |     |       |     |         |      |       |
| Penicilinska kis. |         |     |       |     |         |      |       |
| Sterigmatocistin  |         |     |       |     |         |      |       |
| Trihoteceni       |         |     |       |     |         |      |       |
| Zearalenon        |         |     |       |     |         |      |       |

*Izvor: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani (Šarkanj i sur., 2010)*

#### 2.4. Mikotoksikoze

Mikotoksini izazivaju bolesti kod ljudi i životinja koje nazivamo mikotoksikoze. Mikotoksikoze u ljudi i životinja mogu biti akutne, kao posljedica jednokratnog uzimanja namirnica s visokom koncentracijom mikotoksina (u povijesti češće) i/ili kronične, nastale konzumiranjem namirnica s umjerenim do niskim koncentracijama mikotoksina tijekom dužeg vremenskog razdoblja, koje se povezuju s malignim bolestima. Akutne mikotoksikoze uzrokuju unutarnja krvarenja, oštećenje bubrega i jetre (nekrozu i fibrozu) i dr. te se pojavljuju u zemljama lošeg socijalno-ekonomskog stanja zbog lošeg poljoprivredno-veterinarskoga standarda (IP<sup>1</sup>). U kroničnih aflatoksikoza ciljani organ također su jetra, no simptomi nisu tako brzo vidljivi. Dugotrajna izloženost niskim koncentracijama aflatoksina može uzrokovati kronične bolesti i maligne tumore jetre (Peraica i sur., 2014).

U tablici 5. i 6. može se zorno pratiti djelovanja na organizam kod ljudi i bolesti koje se povezuju s unošenjem mikotoksina.

Tablica 5. Bolesti u ljudi koje se povezuju s unošenjem mikotoksina

| SUSTAV               | ZDRAVSTVENI PROBLEMI  | MIKOTOKSINI  |
|----------------------|---|--|
| Krvožilni sustav     | smanjena elastičnost žila<br>unutarnja krvarenja  | Aflatoksini, Safratoksini<br>Roridini                        |
| Probavni sustav      | proljevanje, povraćanje, krvarenje iz crijeva<br>oštećenje jetre, nekroza, fibroza<br>oštećenja sluznice probavnoga sustava<br>anoreksija | Aflatoksini<br>T – 2 toksini<br>Deoksinivalenol (vomitoksin) |
| Dišni sustav         | poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća  | Trihoteceni  |
| Živčani sustav       | drhtavica<br>nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja  | Tremorgen<br>Trihoteceni                                     |
| Koža                 | osip, osjet vrućine, fotosenzitivnost   | Trihoteceni  |
| Mokraćni sustav      | oštećenje bubrega   | Oktratoksin, Citrinin  |
| Reproduktivni sustav | sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima   | T – 2 toksin, Zearalenon                                     |
| Imunosustav          | promjene ili potpuno uništenje  | Mnogi mikotoksini  |

Izvor: kemijske i fizikalne opasnosti u hrani (Šarkanj i sur., 2010)

Tablica 6. Bolesti za koje se, prema rezultatima laboratorijskih ili epidemioloških istraživanja, pretpostavlja da ih uzrokuju mikotoksini

| BOLEST   | ŽIVOTINJSKA VRSTA             | SUPSTRAT  | ETIOLOŠKI AGENS                                 |
|--|-------------------------------|---|---|
| Alimentarna toksična aleukija<br>(ATA ili septička angina) | čovjek                        | zrnje žitarica<br>toksični kruh                                 | <i>Fusarium spp.</i><br><i>sporotrichioides</i> |
| Dendrodokiotoksikoza                                       | konj, čovjek                  | krma (dodir s kožom, udisanje<br>čestica krme)                  | <i>Dendrodochium toxicum</i>                    |
| Kashin-Beckova bolest                                      | čovjek                        | zrnje žitarica  | <i>Fusarium spp.</i><br><i>sporotrichiella</i>  |
| Stahibotritoksikoza  | čovjek, konj, ostala<br>stoka | sijeno, zrnje, krma (dodir s kožom,<br>udisanje prašine sijena) | <i>Stachybotrys atra</i>                        |
| Ergotizam  | čovjek                        | riža, zrnje žitarica  | <i>Claviceps purpurea</i>                       |
| Balkanska endemska<br>nefropatija (BEN)                    | čovjek                        | zrnje žitarica  | <i>Penicillium spp.</i>                         |
| Reyev sindrom  | čovjek                        | zrnje žitarica  | <i>Aspergillus</i>                              |
| Hepatokarcinom   | čovjek                        | zrnje žitarica, kikiriki  |   |
| Hepatokarcinom   | čovjek                        | zrnje žitarica, kikiriki  |   |

Izvor: Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani (Šarkanj i sur., 2010)

Mikotoksikoze u životinja predstavljaju veliki problem jer se pojavljuju iznenada, sa slabo izraženim i brzim tijekom. Obilježava ih njihova nezagađenost, učestala povezanost s hranom i nemogućnost povezivanja s drugim mikroorganizmima osim plijesnima (Robb, 1990).

Klinički simptomi koji se javljaju kod akutnih mikotoksikoza su nagli gubitak apetita, bezvoljnost životinja, poremećaji SŽS-a, izražene hemoragije na vidljivim dijelovima tijela, polidipsija i poliurija, i na kraju smrt. U perakutnoj fazi često se javlja smrt bez prethodno izraženih kliničkih simptoma. Kod kroničnih mikotoksikoza klinički simptomi

nisu specifični. Ispoljavaju se u vidu pada proizvodnih rezultata, slabije konverzije hrane, usporenog ili prekinutog rasta, smanjene mliječnosti, oslabljenog imuniteta što dovodi do povećane osjetljivosti životinja prema raznim infekcijama (Pinti<sup>ć</sup> Pu<sup>kec</sup>, 2011). Mikotoksikoze uzrokovane aflatoksinima nazivaju se aflatoksikoze. Ciljni organ djelovanja aflatoksina jesu jetra, no aflatoksini nisu samo toksični za jetru nego imaju i druga neželjena svojstva kao imunosupresivnost, mutagenost, teratogenost i karcinogenost. Klinički znaci akutne aflatoksikoze uključuju gubitak apetita, bezvoljnost, gubitak u težini, neurološke poremećaje, žuticu mukoznih membrana i grčeve. Mogu se također javiti i edemi u tjelesnim šupljinama i krvarenje bubrega i crijevnog trakta. Epidemiološki dokazi ukazuju na povezanost između primarnog raka jetre, aflatoksina, i načina ishrane. U velikim dozama, aflatoksini su akutno toksični, izazivajući značajno oštećenje jetre uz crijevno i peritonealno krvarenje, što na kraju dovodi do smrti (IP<sup>6</sup>).

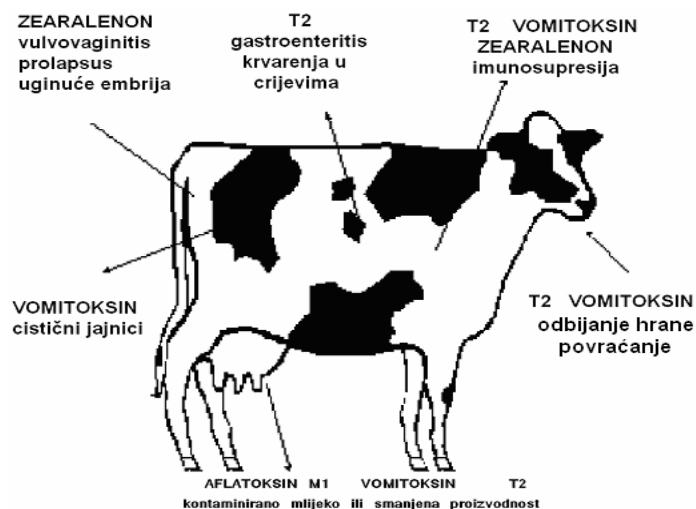
Tablica 7. Mikotoksikoze povezane s akutnim primarnim bolestima u stoke i peradi

| Mikotoksikoza                       | Vrsta životinje            | Primarni sindrom   |
|-------------------------------------|----------------------------|--|
| Aflatoksikoza                       | perad, svinje, goveda, psi | Akutni hepatitis, hemoragije, ugibanje                                   |
| Ergotizam                           | goveda, ovce, pilići       | Gangrenozna nekroza, živčani napadi, izostanak sposobnosti razmnožavanja |
| Facijalni ekcem                     | ovce, goveda               | Kolangiohepatitis, fotoosjetljivost                                      |
| Fuzariotoksikoze, vomitoksikoza     | svinje                     | Enteritis, povraćanje  |
| T-2 toksikoza                       | svinje, goveda, perad      | Dermatonekroza, gastroenteritis  |
| Diacetoksiscirpenol                 | svinje                     | Gastroenterička nekroza, hemoragije                                      |
| Leukoencefalomalacija               | konji                      | Živčana depresija, nesposobnost koordinacije                             |
| F-2 toksikoza (zearalenon)          | svinje                     | Estrogenizam   |
| Oktratoksikoza                      | svinje, purani             | Nefropatija  |
| Slafaminska toksikoza               | goveda, ovce               | Slinjenje, dijareja  |
| Stahibotritoksikoza                 | konji                      | Dermatonekroza, gastroenteritis  |
| Otrovanje tremorgenim mikotoksinima | goveda, ovce, psi          | Poremećena koordinacija mišića (ataksija), malaksalost                   |

Izvor: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani (Šarkanj i sur., 2010)*

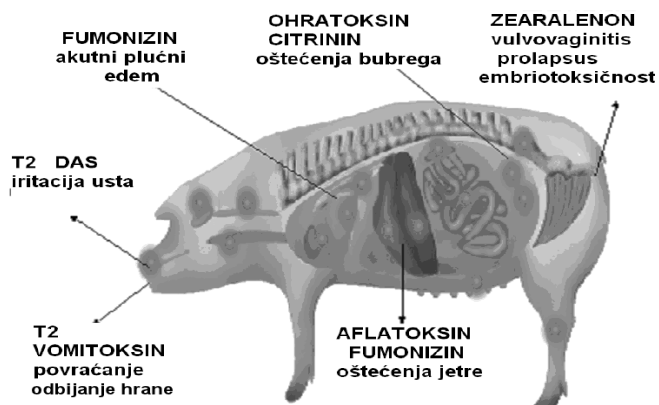
Negativni učinci mikotoksina na zdravlje životinja očituju se smanjenim unosom hrane (odbijaju hranu), smanjenjem nutritive vrijednosti hrane, manjom resorpcijom i promjenama u metabolizmu hranjivih tvari, nepovoljnim utjecajem na lučenje endokrinih i egzokrinih žlijezda te slabljenjem imunološkog odgovora. Trovanja mikotoksinima ovise o čimbenicima poput vrste, koncentracije i dužine izloženosti nekom mikotoksinu te njegovim farmakodinamičkim osobinama, zatim vrsti i dobi životinje. Smatra se da su preživaci otporniji na negativne učinke od monogastričnih životinja zbog toga jer dolazi do razgradnje mikotoksina mikrobiotima buraga. U našim krajevima toksična koncentracija je razmjerno rijetka (Mašek i Šerman, 2006).

Na slikama 4., 5. i 6. može se vidjeti prikaz djelovanja mikotoksina kod krava, svinja i peradi.



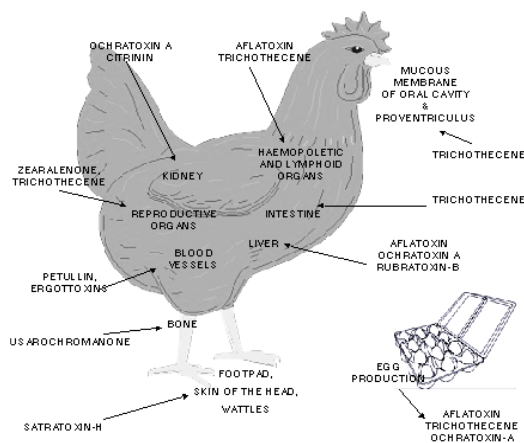
Slika 4. Prikaz djelovanja mikotoksina kod krava

Izvor: IP<sup>7</sup>



Slika 5. Prikaz djelovanja mikotoksina kod svinja

Izvor: IP<sup>7</sup>



Slika 6. Prikaz djelovanja mikotoksina kod peradi

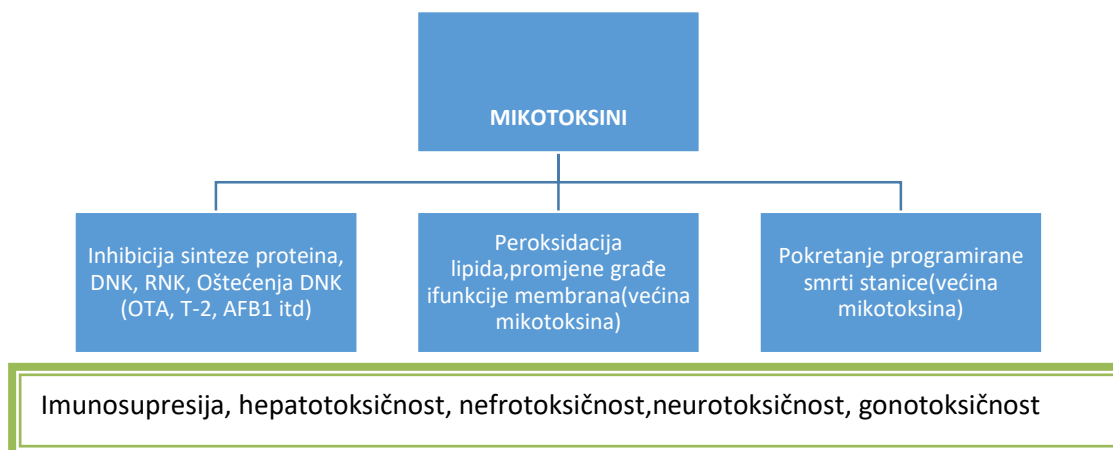
Izvor: IP<sup>7</sup>

Mehanizmi djelovanja mikotoksina su:

1. Inhibicija aktivnosti glukoneogenetskih enzima i aktivacija enzima koji sintetiziraju preteče glikogena i glikogen (aflatoksin B<sub>1</sub>, ohratoksin A, rubratoksin A).
2. Inhibicija funkcije mitohondrija – inhibicija aktivnosti enzima trikarboksilnog (Krebsovog) ciklusa, s posljedično smanjenim iskorištavanjem kisika, inhibicija transporta elektrona i raskopčavanje oksidativne fosforilacije te inhibicija transporta bjelančevina u mitohondrijima (aflatoksin B<sub>1</sub>, rubratoksin B i ohratoksin A).
3. Remete funkcije nukleinskih kiselina i sinteze bjelančevina (aflatoksini i trihoteceni). Aflatoksini reagiraju s DNK što mijenja kalup za produkciju RNK, inhibiraju RNK polimerazu pa remete transkripciju. Transkripciju u sintezi bjelančevina remete i trihoteceni, jer se vežu na 60S podjedinicu ribosoma i inhibiraju aktivnost enzima peptidil transferaze.
4. Kompetitivno inhibiraju biološki aktivne komplekse (fumonizini - kemijski analozi sfinganina i sfinganin-1-fosfata: inhibiraju aktivnost ceramid sintetaze, odnosno sintezu kompleksa sfingolipida. Time se mijenja funkcija bjelančevina na membrani stanica, mijenja se aktivnost protein kinaze, funkcija aktivnih lipida te rast i vitalnost stanice (apoptoza).
5. Peroksidacija lipida, što je osnova hepato toksičnosti i hepato karcinogenosti mikotoksina.
6. Mikotoksini mogu djelovati kao imunomodulatori (mijenjaju normalnu imunološku reakciju organizma) i kada su u hrani u koncentraciji ispod granice detekcije. Radi se o supresiji celularnog i humoralnog dijela imunološke reakcije: aktivnosti T i B limfocita,



produkcije antitijela i poremetnji funkcije makrofaga i retikuloendotela (aflatoksin B<sub>1</sub>, T-2 toksin, vomitoksin i deoksinivalenol) ( IP<sup>7</sup>).



Shema 1. Glavni mehanizmi toksičnosti  
Izvor: IP<sup>7</sup>

### 2.5. Suzbijanje mikotoksina

Aflatoksini su proizvod plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* na žitaricama u vrijeme rasta u polju prije žetve, tijekom skladištenja i tijekom vremena prerade.

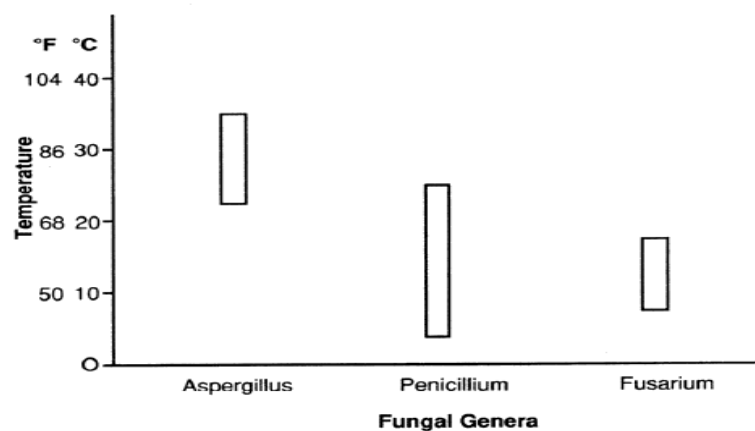
Načelo preventivnih mjera u sprečavanju mikotoksikoza temelji se na smanjivanju ili onemogućavanju kontaminacije uroda mikotoksinima, a ne na toleriranju kontaminacije uroda raznim preparatima u cilju pokušaja resorpcije toksina. Odsutnost plijesni u nekom proizvodu ne znači da je taj proizvod bez mikotoksina, oni mogu biti u namirnicama i onda kada je plijesan odsutna. Provođenje preventivnih mjera na poljoprivrednim površinama, pravilno skladištenje žitarica, prvi su postupci u smanjivanju mikotoksina u namirnicama. Agronomi, tehnolozi, veterinari i medicinski stručnjaci trebaju pravilnom procjenom rizika i više nego do sada stalnom zdravstvenom kontrolom osigurati ispravnu hranu za prehranu ljudi i domaćih životinja (Cvjetković, 2014).

S obzirom na vrijeme primjene mjera možemo ih podijeliti u tri skupine:

- Pred žetvene mjere
- Žetvene mjere
- Poslije žetvene mjere

Pred žetvene mjere suzbijanja mikotoksina sastoje se u primjeni postupaka koji smanjuju infekciju gljivicama na stabljici, odnosno klasu, klip i sl. U tu svrhu odabiru se hibridi /

sorte otporne na infekciju plijesnima te na lom zrna, primjenjuju se primjerene agrotehničke mjere (vrijeme sjetve, izmjena usjeva, obrada tla, gustoća sklopa, navodnjavanje) te zaštita usjeva od korova. Navedenim mjerama se nastoje smanjiti negativni učinci okolišnih čimbenika koji pogoduju razvoju plijesni kao što su visoka temperatura i vlaga. To su dva ključna čimbenika koji uvjetuju razvoj plijesni i produkciju mikotoksina. Relativna vlage zraka od 80 do 90% pogoduje stvaranju plijesni. Temperatura razvoja plijesni nam je prikazana na sljedećem grafu (Graf 2.), iz kojeg možemo vidjeti da za razvoj plijesni roda *Aspergillus* su pogodne više temperature (25-38 °C), za *Fusarium* 8-19 °C, a za plijesni roda *Penicillium* već od od 3 pa do 25 °C.



Graf 2. Pogodne temperature za razvoj plijesni

Izvor: IP<sup>7</sup>

Biljke izložene nepovoljnim uvjetima (suša, poplave) koji djeluju kao stresor, uvjetuju veću prijemljivost za toksične gljivice i veći rizik za pojavu mikotoksina. Tako Grbeša (2005) smatra da lokalne sorte/hibridi imaju bolju sposobnost prilagodbe na agroklimatološke uvjete od introduciranih, npr. kukuruza. Ranija sjetva i berba, dublje oranje i navodnjavanje tijekom suše smanjuju zaraženost mikotoksinima. Zatim vrijeme žetve/ berbe ima glavni utjecaj na konačni sadržaj mikotoksina u zrnju. Vlaga u zrnju u polju je dovoljna za razvoj gljivica koje su se naselile na njega, a insekti se nastavljaju hraniti žitaricom i pred berbu te tako pospješuju napad gljivica na zrnje. Tako kasna berba daje gljivicama više vremena da proizvedu više mikotoksina na zrnju prije njegova sušenja. Tijekom berbe i transporta zrnje žitarica se mehanički oštećuje, a mjesta oštećenja su idealna za razvoj gljivica i proizvodnju mikotoksina. Ranija žetva smanjuje razinu mikotoksina.

Odstranjivanje sitnih, oštećenih i pljesnivih zrna je bitno za smanjenje količine mikotoksina u mjestu skladištenja žitarica. Međutim, odstranjivanje oštećenih zrna bi trebalo biti što manje, zbog velikih ekonomskih gubitaka. Nakon berbe umjetnim sušenjem zrna se sprečava razvoj gljivica. Radi minimiziranja mogućnosti rasta plijesni i proizvodnje mikotoksina, vlažnost zrna treba smanjiti u roku od 48 sati nakon berbe na ispod 15%. Međutim, utvrđeno je plijesni mogu proizvoditi mikotoksine i pri niskoj vlazi i temperaturi zrna. U skladištima je mogući razvoj gljivica zbog povećanja vlage uzrokovanog različitom vlagom zrna, migracijom vlage na zidovima skladišta i proizvodnjom vode od strane insekata i drugih mikroorganizama. Skladišta se prije korištenja moraju dobro očistiti kako bi se odstranila stara zrna koja su bogata plijesnima i mikotoksinima, a ako je kontaminacija jaka, trebalo bi koristiti inhibitore rasta gljivica i primijeniti detoksikaciju silosa (Grbeša, 2005).

Uskladištene žitarice treba redovito pregledavati, što uključuje kontrolu temperature, vlage, plijesni na zrnu, miris i sl. Uočene nepravilnosti se moraju ukloniti, tj. smanjiti temperaturu, ozračiti skladište, izbaciti zaražena zrna. Insekti svojom aktivnošću pomažu razvoju gljivica, pa njihova kontrola smanjuje koncentraciju mikotoksina. Unatoč mjerama, prisutnost mikotoksina je neizbježna. Stoga je potrebno što bolje kontrolirati hranu. Sustavna kontrola mikotoksina u hrani je neophodna kako bi se izbjegli negativni učinci na zdravlje kako ljudi tako i životinja i kako bi se izbjegli ekonomski gubici u poljoprivrednoj i animalnoj proizvodnji (Pintiće Pukec, 2011).

### 3. MATERIJAL I METODE

Podaci sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani i sadržaj AFM<sub>1</sub> u svježem mlijeku uzeti su iz baze podataka Laboratorija za kontrolu meda i stočne hrane Hrvatske poljoprivredne agencije, Poljana križevačka 185, Križevci. U razdoblju od 2013.-2017. ukupno je analizirano 203 uzorka stočne hrane na AFB<sub>1</sub>, dok je u razdoblju od 2012.- 2017. analizirano 552 uzorka svježeg mlijeka na AFM<sub>1</sub>. Uzorci stočne hrane koji su analizirani bili su kukuruz, raž, tritikal, ječam, zob, pšenica i silaže.

Treba napomenuti većina uzoraka stočne hrane nije potjecala s istih gospodarstava s kojih su uzimani uzorci mlijeka.

Utvrđivanje sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani provedena je validiranom imunoenzimskom Elisa metodom prema uputama "Romer Labs Diagnostic GmbH" (Tehnopark 1, 3430 Tulin, Austrija; [www.romerlabs.com](http://www.romerlabs.com)), vlasništvo tvrtke Biomin GmbH iz Austrije. Utvrđivanje sadržaja AFM<sub>1</sub> provedeno je validiranom imunoenzimskom Elisa metodom prema uputama "EuroClone SpA" (Via Figino, 20/20, 20016 Pero, Italija) (IP<sup>9</sup>).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$ SD (standardna devijacija) uz minimalne i maksimalne vrijednosti te koeficijent varijabilnost (Cv). U Statističkoj obradi podataka korišten je SAS. 8.0. program (SAS Institute Cary, NC.USA, 1997).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### *4.1. Sadržaj AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani*

Rezultati utvrđivanja sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani u Republici Hrvatskoj (RH), čiji je sadržaj utvrđivan u razdoblju od 2013. do 2017. u Laboratoriju za kontrolu meda i stočne hrane Hrvatske poljoprivredne agencije u Poljani križevačkoj, pokazali su da je 52,2% uzoraka stočne hrane bilo pozitivno na AFB<sub>1</sub>. Ukoliko se utvrđene vrijednosti usporede sa sličnim istraživanjima drugih autora, može se uvidjeti da je bio prisutan vrlo visok postotak pozitivnih uzoraka. Primjerice, Mitak i sur. (2013), cit. prema Šegvić Klarić i sur. (2009), u istraživanju 2009. u RH utvrdili su prisutnost AFB<sub>1</sub> u 24-31% uzoraka. U 2012. je Hrvatska agencija za hranu objavila studiju u kojoj se navodi da je od 300 uzoraka stočne hrane u 20% utvrđena pojavnost AFB<sub>1</sub>. Ninković (2016) je u 200 uzoraka zrna kukuruza utvrdila 18% pozitivnih uzoraka na prisutnost aflatoksina. Najopširnije istraživanje je provela tvrtka Biomin, na čak 15 596 uzoraka stočne hrane iz Europe, u razdoblju od 2009. do 2017. Visoke vrijednosti bilježe od oko 40%, u 2011., 2012., 2013. i 2014. godini. U ostalim godinama istraživanja vrijednosti su bile ispod 20% (IP<sup>11</sup>).

Podaci za prosječni sadržaj istraživanih mikotoksina u ovom radu po godinama istraživanja prikazani su u tablici 8.

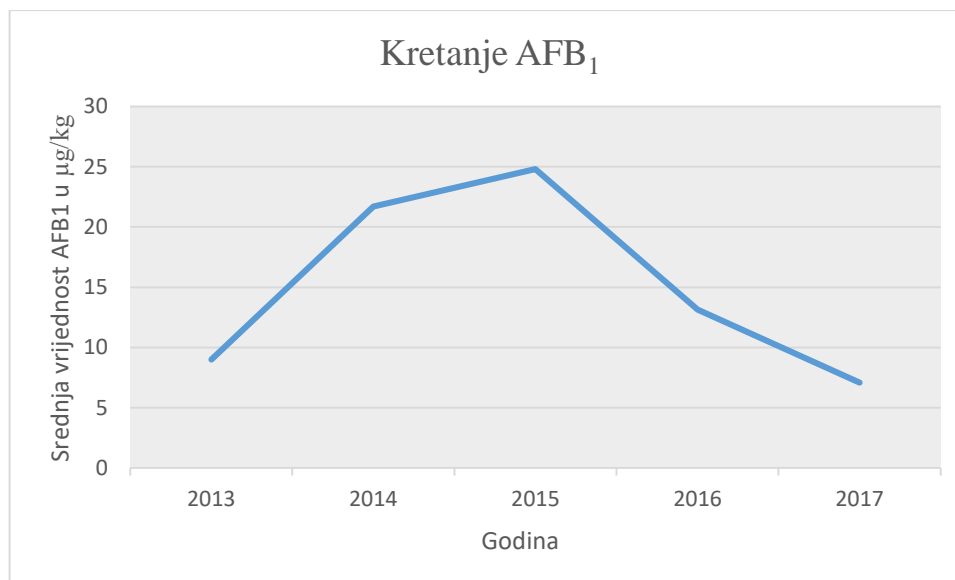
Tablica 8. Kretanje sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2013.do 2017.

| <b>Godina</b>              | <b>2013.</b> | <b>2014.</b> | <b>2015.</b>  | <b>2016.</b> | <b>2017.</b> |
|----------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| $\bar{x}$<br>μg/kg         | 9,012        | 21,710       | 24,800        | 13,140       | 7,097        |
| <b>Min.-Max./</b><br>μg/kg | 0,150-50,950 | 0,150-91,810 | 1,130-183,600 | 7,390-26,400 | 0,010-50,180 |
| <b>Sd</b>                  | 9,15         | 21,50        | 36,1          | 8,17         | 10,72        |
| <b>Cv/</b><br><b>%</b>     | 101,51       | 99,05        | 145,5         | 62,19        | 151          |
| <b>N</b>                   | 83           | 56           | 24            | 7            | 33           |

*Izvor: Gotić (2018)*

Iz tablice se može vidjeti da se prosječni sadržaj AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani kretao od najnižeg od 9,012 µg/kg u 2013., bio je veći u 2014. (21,71 µg/kg), a najveći u 2015. kada je iznosio 24,8 µg/kg, nakon čega se smanjivao i u 2016. iznosio 13,14 µg/kg, a u 2017. 7,097 µg/kg.

Kretanje prosječnog sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani zorno prikazuje Graf 3.



Graf 3. Kretanje prosječnog sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani od 2013. do 2017.

*Izvor: Gotić, 2018.*

Maksimalna koncentracija mikotoksina u poljoprivrednim i prehrambenim proizvodima zakonski je regulirana. Za AFB<sub>1</sub>, koji se smatra najtoksičnijim od svih mikotoksina, dozvoljene vrijednosti, odnosno najveća dopuštena količina (NDK) u stočnoj hrani, izuzev dopunskih i potpunih krmnih smjesa, iznosi 0,02 mg/kg (ppm) kada udio vlage u hrani za životinje iznosi 12%, odnosno izraženo i kao 20 µg/kg (EU 574/2011, NN 102/2016).

Prema navedenom vidljivo je da je prosječni sadržaj AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani u istraživanom razdoblju bio ispod NDK tijekom 2013., 2016. i 2017. dok su vrijednosti tijekom 2014. i 2015. bile iznad dopuštenih navedenih *Pravilnikom 1*.

Međutim bitno je istaknuti da je od ukupnog broja pozitivnih uzoraka njih 19,2% imalo vrijednosti iznad *Pravilnikom 1*, iznad 20 µg/kg.

Najveći prosječni sadržaj AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani, kao što je već navedeno, utvrđen je 2015. u količini od 24,80 µg/kg. U tablici je vidljivo da je postojala izuzetno velika oscilacija u sadržaju AFB<sub>1</sub> u uzorcima. To znači da su se pojedinačni uzorci znatno raspršili oko srednje prosječne vrijednosti budući da Cv izražava distribuciju uzoraka od

najmanje do najveće koncentracije. U 2015. sadržaj AFB<sub>1</sub> bio je u rasponu od svega 1,130 do čak 183,600 µg/kg (Cv 145,5%). U 2014. je utvrđena također velika prosječna količina AFB<sub>1</sub> od 21,710 µg/kg, također uz visoki Cv od 99,05%, zbog oscilacije od 0,15 do 91,81 µg/kg. Najveći Cv, od 151,00%, utvrđen je 2017., kada su vrijednosti bile u rasponu od 0,01 do 50,18 µg/kg. Treba napomenuti da visoki Cv može biti i rezultat malog broja uzoraka.

Usporede li se druga istraživanja na tu temu, može se vidjeti da je Ninković (2016) utvrdila prisutnost aflatoksina u zrnju kukuruzu u prosjeku od 12,31 µg/kg, dok na niti jednom uzorku silaže nije utvrđena prisutnost aflatoksina. U istraživanju tvrtke Biomin (IP<sup>11</sup>) najveća prosječna količina AFB<sub>1</sub> utvrđena je u uzorcima u 2016., oko 10 µg/kg, dok su vrijednosti ostalih godina u razdoblju od 2013. do 2017. bile ispod (7-10 µg/kg).

#### **4.2. Sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku**

Rezultati utvrđivanja sadržaja AFM<sub>1</sub> u stočnoj hrani u RH, čiji je sadržaj utvrđivan u razdoblju od 2012. do 2017., pokazali su da je 98,7% uzoraka mlijeka bilo pozitivno na AFM<sub>1</sub>, od kojih je više od 57,8% imalo vrijednosti iznad NDK. Ukupno je analizirano 552 uzorka svježeg mlijeka.

Na razini EU dozvoljena je NDK od 0,05 µg/kg (Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012), preporuke Europske unije (2006/576/EC)), *Pravilnik 2*.

Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima mnogih autora koji su također u svojim istraživanjima dobili povećane količine AFM<sub>1</sub> u uzorcima mlijeka. Naime, već su Markov i sur. (2010), ispitujući 60 uzoraka mlijeka nasumično uzetih od individualnih proizvođača iz različitih krajeva kontinentalne Hrvatske da je njih 86,7% pozitivnih na AFM<sub>1</sub>, a 6,7% ih je imalo vrijednosti iznad NDK. Womack i sur. (2015) ispituju 7 841 uzoraka mlijeka i mliječnih proizvoda u razdoblju od 2010. do 2015. i dobili su rezultat da je bilo gotovo 75% pozitivnih uzoraka na AFM<sub>1</sub>, od kojih je 26% iznad NDK

U tablici 9 prikazani su rezultati istraživanja kretanja sadržaja AFM<sub>1</sub> u svježem mlijeku u RH u razdoblju od 2012. do 2017.



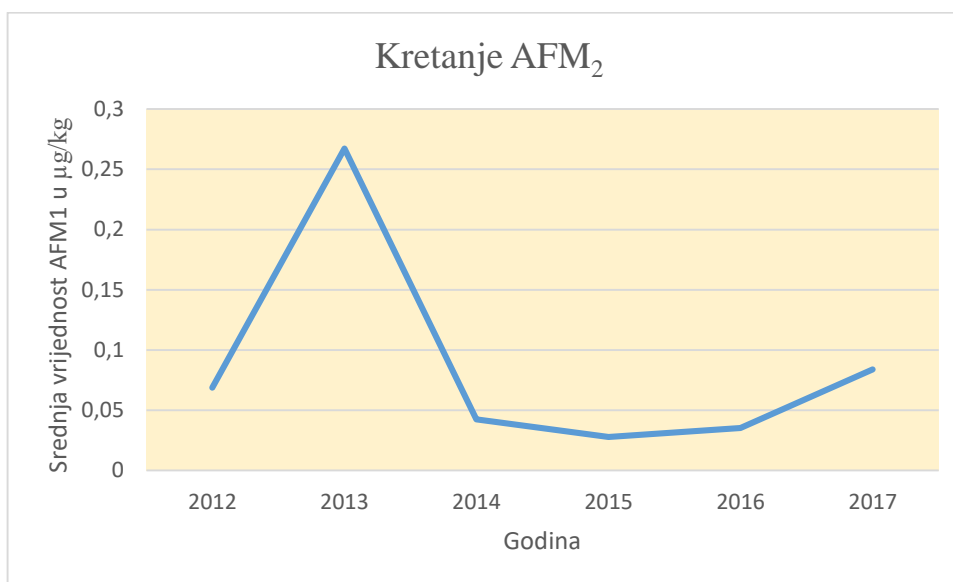
Tablica 9. Kretanje sadržaja AFM<sub>1</sub> u svježem mlijeku u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2012.-2017.

| <b>Godina</b>              | <b>2012.</b>  | <b>2013.</b>  | <b>2014.</b>  | <b>2015.</b>  | <b>2016.</b>  | <b>2017.</b>  |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $\bar{x}$<br>μg/kg         | 0,0689        | 0,2673        | 0,0424        | 0,0279        | 0,0354        | 0,0840        |
| <b>Min.-Max./</b><br>μg/kg | 0,0086-0,5926 | 0,0010-3,0330 | 0,0105-0,0771 | 0,0010-0,1050 | 0,0760-0,1050 | 0,0139-0,1050 |
| <b>Sd</b>                  | 0,09          | 0,34          | 0,013         | 0,03          | 0,03          | 0,027         |
| <b>Cv/</b><br><b>%</b>     | 129,6         | 128,3         | 30,0          | 97,5          | 98,6          | 32,2          |
| <b>N</b>                   | 76            | 317           | 59            | 70            | 6             | 24            |

*Izvor: Gotić (2018)*

Kao što prikazuje tablica 9, veći sadržaj AFM<sub>1</sub> od propisanih *Pravilnikom 2* utvrđene su u 2012. kada je utvrđeno 0,0689 µg/kg, u 2013. kada je prosječni sadržaj bio 0,2673 µg/kg i u 2017. kada je utvrđeno 0,0840 µg/kg. Dakle, najveći prosječni sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku utvrđen je u 2013. u količini od 0,2673 µg/kg. Iste godine dobiven je i najveći pojedinačni sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku od 3,033 µg/kg te utvrđen najveći Cv (128,3%).

Kretanje prosječnog sadržaja AFB<sub>1</sub> u sirovom mlijeku zorno prikazuje Graf 4.



Graf 4. Kretanje sadržaja AFM<sub>1</sub> u mlijeku od 2012. do 2017.

*Izvor: Gotić 2018.*

Ukoliko rezultate ovog istraživanja usporedimo s drugim istraživanjima u RH koja su se bavila istom tematikom, vidljivo je vrlo slično stanje. Bilandžić i sur. (2010) utvrđivali su koncentraciju AFM<sub>1</sub> na 61 uzorku mlijeka na mliječnim farmama u RH u periodu zima-proljeće i ljetno razdoblje. Na uzorcima mlijeka iz razdoblja zima-proljeće sadržaj je u prosjeku bio 0,018 µg/l, a iz ljetnog razdoblja 0,04 µg/l. U svom radu iz 2015., Bilandžić i sur. ispituju uzorke mlijeka od listopada 2013. do rujna 2014. Posebno se ističe mlijeko uzeto u 2013., prije svega u istočnom dijelu Hrvatske, gdje su izmjerene maksimalne koncentracije AFM<sub>1</sub> u mlijeku od 0,764 µg/kg. U ovom istraživanju (Bilandžić i sur., 2015) se navodi, ali i u drugim vezanim za taj period, da su tako visoki sadržaji doveli su do alarmantnog stanja te da se nakon toga krenulo s brižljivijim pristupom kontroli prvenstveno stočne hrane, ali i mlijeka kao proizvoda u kojem se nalazi AFM<sub>1</sub>. Da se povišeni sadržaj AFM<sub>1</sub> konstantno zadnjih par godina zadržava u uzorcima svježeg mlijeka u svojim daljnjim istraživanjima utvrđuju Bilandžić i sur. (2016). Autori su ispitali 548

uzoraka mlijeka uzetih tijekom veljače i ožujka 2015. i utvrdili prosječni sadržaj AFM<sub>1</sub> od 0,0369 µg/kg u zapadnoj, 0,0311 µg/kg u središnjoj i ponovo najviše u istočnoj regiji Hrvatske gdje je zabilježen prosječni sadržaj od 0,0414 µg/kg. Prosječni sadržaj upućuju, na dopušten sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku. Međutim, to ne znači da pojedini uzorci nisu bili iznad NDK za mlijeko.

Iako zbog metodologije uzimanja uzoraka, a to je da većina uzoraka stočne hrane nije potjecala s istih gospodarstava s kojih su uzimani uzorci mlijeka nije uputno tvrditi o direktnoj povezanosti rezultata sadržaja AFB<sub>1</sub> i AFM<sub>1</sub>, ipak se usporedbom rezultata za sadržaj AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani i AFM<sub>1</sub> u mlijeku u uzorcima analiziranim u Laboratoriju za kontrolu meda i stočne hrane Hrvatske poljoprivredne agencije može reći da je vidljiva njihova povezanost. Tijekom razdoblja od 2013. do 2017. bio je prisutan porast sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani do 2015., kada je bio vrhunac od visokih 24,80 µg/kg AFB<sub>1</sub>, što je iznad maksimalno dopuštenih vrijednosti od 20 µg/kg, a nadalje je opadao. Također je sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku rastao. Pri tome se izdvaja 2013., kao godina u kojoj se posebno istaknula visoka vrijednost AFM<sub>1</sub> od 0,2673 µg/kg.

Visoke vrijednosti sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani i AFM<sub>1</sub> u mlijeku u praćenom razdoblju ukazuju na moguću visoku prisutnost i u mliječnim proizvodima.

Dobiveni rezultati ukazuju na važnost kontinuiranog praćenje aflatoksina, prvenstveno u stočnoj hrani, ali i u mlijeku, te kontinuirane edukacije svih uključenih u proizvodnju i promet mlijeka u RH.

## 5. ZAKLJUČAK

U praćenom razdoblju od 2013. do 2017. godine utvrđeno je da od ukupno analiziranih 203 uzoraka stočne hrane, 52,2% bilo je pozitivno na AFB<sub>1</sub>, a 19,02% pozitivnih uzoraka imalo je vrijednosti krmiva iznad dopuštenih 20 µg/kg kako je propisano Pravilnikom o sigurnosti hrane za životinje (NN 102/16). Najveći prosječni sadržaji AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani utvrđeni su u 2015. (24,80 µg/kg) i u 2014. (21,710 µg/kg). Prosječne vrijednosti u ostalim godinama bile su ispod praga NDK.

Od ukupno analiziranih 552 uzorka svježeg mlijeka sakupljenih u razdoblju od 2012. do 2017., 98,7% su bili pozitivni na AFM<sub>1</sub>, a od njih je više od 57,8% imalo vrijednosti iznad dopuštenih 0,05 µg/kg kako je propisano Pravilnikom o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (NN 146/2012). Najveći prosječni sadržaj AFM<sub>1</sub> u mlijeku utvrđen je 2013. u količini od 0,2673 µg/kg, znatno manje, ali iznad dopuštenih količina u 2017. (0,084 µg/kg) i u 2012. (0,0689 µg/kg). Dobiveni rezultati ukazuju na važnost kontinuiranog praćenje aflatoksina te stalna edukacija svih uključenih u proizvodnju i promet mlijeka u RH.

## 6. LITERATURA

1. Battilani, P., Toscano, P., Klerx, H., Moretti, A., Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., Robinson, T. (2016): Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change, Sci. Rep. 6, [https://www.researchgate.net/publication/301228654\\_Aflatoxin\\_B1\\_contamination\\_in\\_maize\\_in\\_Europe\\_increases\\_due\\_to\\_climate\\_change](https://www.researchgate.net/publication/301228654_Aflatoxin_B1_contamination_in_maize_in_Europe_increases_due_to_climate_change).
2. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun, B. (2010): Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in Croatia. Food Control, 21: 1279-1281.
3. Bilandžić, N., Varenina, I., Božić, Đ., Sedak, M., Đokić, M., Solomun Kolanović, B. i Cvetnić, Ž. (2013): Aflatoxin M<sub>1</sub> u mlijeku i mliječnim proizvodima. Veterinarska stanica 44 (3): 195-203
4. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Božić, Đ., Đokić, M., Sedak, M., Tanković, S., Potočnjak, D., Cvetnić, Ž. (2015): Monitoring of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk during four seasons in Croatia. Food Control 54: 331-337.
5. Bilandžić, N., Varenina, I., Solomun Kolanović, B., Božić Luburić, Đ., Benić, M., Cvetnić, L., Tanković, S., Cvetnić, Ž. (2016): Monitoring of aflatoxin in raw cow milk in Croatia during winter 2015, Mljekarstvo 66 (1): 81-85.
6. Bilandžić, N. (2016): Aflatoxini od hrane za životinje do stola. 42. hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka, Lovran 9-12. studeni 2016. Zbornik sažetaka: 21-22.
7. Brajdić, N. (2014): Ražena glavica (*Claviceps purpurea*), ergotizam i ergot alkaloidi, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Biološki odsjek, <http://digre.pmf.unizg.hr/3295/1/Ražena%20glavica%20%28Claviceps%20purpurea%29%2C%20ergotizam%20i%20ergot%20alkaloidi.pdf> (preuzeto 11.11.2018.)
8. Cvjetković, B. (2014) : Upravljanje rizikom od mikotoksina počinje u polju. Glasilo biljne zaštite, 4.: 317-328.
9. Domačinović, M., Čosić, J., Klapac, T., Peraica, M., Mitak, M. (2012): Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje, OB-34-01, Hrvatska agencija za hranu, [https://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi\\_misljenje=27](https://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi_misljenje=27). (preuzeto 11.11.2018.).

10. 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. The EFSA Journal 39: 1–27.
11. European Commission (2006): Commission regulation (EC) No 401/2006, methods of sampling analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, 170,;12-34.
12. Fink-Gremmels, J. (2008): Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. Food Addit. Contam. A 25: 172–180
13. Grbeša D. (2005); Mikotoksini zrna kukuruza i mikotoksikoze svinja: agronomski načini sprječavanja//Mogućnosti razvoja hrvatske svinjogojske proizvodnje: Zbornik radova. Zagreb: Hrvatski stočarski centar: 53-66
14. Griessler, K., Rodrigues, J., Handl, J., Hofstetter, U. (2010): Occurrence of mycotoxins in southern Europe. World Mycotoxin Journal 3 (3): 301-309.
15. Internet portal:
  - IP<sup>1</sup> – Hrvatska agencija za hranu: Što su mikotoksini?, <https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini> (preuzeto 1. 8. 2018.)
  - IP<sup>2</sup> – Pašalić, A.: Tko je odgovoran za pojavu aflatoksina u mlijeku? <https://www.agroklub.com/stocarstvo/tko-je-odgovoran-za-pojavu-aflatoksina-u-mlijeku/21105/> (preuzeto 1. 8. 2018.).
  - IP<sup>3</sup>- Tomić, S.: <http://www.pisvojvodina.com/RegionKV/Lists/Photos/Forms/DispForm.aspx?ID=221&RootFolder=%2FRegionKV%2FLists%2FPhotos%2FKukuruz%2FMonitoring%20kukuruz%202014%20-%20Tabele> (preuzeto 16. 8. 2018.).
  - IP<sup>4</sup> – Horvat, M.: Mikotoksini, [https://www.crolab.hr/userfiles/file/KAL/Horvat\\_Mikotoksini\\_4.6.2014.pdf](https://www.crolab.hr/userfiles/file/KAL/Horvat_Mikotoksini_4.6.2014.pdf) (preuzeto 16. 8. 2018.)
  - IP<sup>5</sup>-Open chemistry database <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/186907#section=3D-Conformer> (preuzeto 02.09.2018.)
  - IP<sup>6</sup>- Vasić, B.: Otrovní kukuruz i na našim trpezama <https://www.nezavisne.com/novosti/drustvo/Otrovni-kukuruz-i-na-nasim-trpezama/169946> (preuzeto 1. 8. 2018.).

- IP<sup>7</sup>- Prevedar Crnić, A., Mikotoksini, <http://www.jelena-surana.com/predavanja/MIKOTOKSINI%201.pdf> (preuzeto 1. 8. 2018.).
- IP<sup>8</sup> – Šumić, Z.: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/mikotoksini>, (25. 9. 2018.).
- IP<sup>9</sup> – [www.Euroclone.it](http://www.Euroclone.it) (preuzeto 25.9.2018.).
- IP<sup>10</sup> - Bilandžić, N., Varenina, I., Božić, Đ., Sedak, M., Đokić, M., Solomun Kolanović, B. i Cvetnić, Ž.(2013): Aflatoksin M1 u mlijeku i mliječnim proizvodima <http://veterina.com.hr/?p=21123> (preuzeto 1.09.2018.)
- IP<sup>11</sup> - Biomin annual report (2009-2017): World mycotoxin survey. <https://www.biomin.net/at/biomin-mycotoxin-survey/> (preuzeto 25.09.2018)
- IP<sup>12</sup> -Mitak, M., Bilandžić, N., Pleadin, J.: Aflatoksini od krmiva do mlijeka <http://veterina.com.hr/?p=24808> (preuzeto 01.08.2018.)
16. Krska, R., Ullrich-Scubert, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., Crews, C. (2008): Mycotoxin analysis: An update, Food Additives and Contaminants. Part A, Vol. 25. Symposium on Mycotoxin, Istanbul 2007.
17. Limbikani, M., Sulyok, M., Njoroge, S.M.C., Ediage, E.Nj., Van Pouche, C., De Saeger, S., Krska, R. (2014): Uncommon occurrence ratios of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> in maize and groundnuts from Malawi, *Micotoxin Res* <http://www.icrisat.org/wp-content/uploads/Uncommon-occurrence-ratios-of-aflatoxin-B1-B2-G1-and-G2-in-maize-and-groundnuts-from-Malawi.pdf>. (preuzeto 25.9.2018.).
18. Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F. (2010): Aflatoksin M<sub>1</sub> u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* 60 (4): 244-251.
19. Mašek, T., Šerman, V. (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost preživača. *Krmiva* 48: 19-31.
20. Mitak, M., Pleadin, J., Perši, N., Vulić, A., i Zadravec, M. (2011): Mikotoksini u krmnim sirovinama i smjesama tijekom 2009. i 2010. godine. *Veterinarska stanica* 42: 342-343.
21. Mitak, M., Bilandžić, N., Pleadin, J., (2013): Aflatoksini od krmiva do mlijeka. *Veterinarska stanica* 5: 363-369.
22. NN 146/2012: Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani.
23. NN 102/2016: Pravilniku o sigurnosti hrane za životinje

24. Ninković, M. (2016): Kontaminacija zrna kukuruza aflatoksinima u 2015. godini. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
25. Peraica, M., Rašić, D., Gluščić, V. (2014): Utjecaj aflatoksina na zdravlje ljudi, Glasilo biljne zaštite 4: 310-316.
26. Perši N., Pleadin J., Vulić A., Zadavec M., Mitak M. (2011): Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla. Veterinarska stanica 42: 335-345.
27. Pintiće Puček, N. (2011): Važnost ispitivanja mikotoksina u stočnoj hrani. Sedmo savjetovanje uzgajivača svinja u Republici Hrvatskoj. Hrvatska poljoprivredna agencija. Stubičke toplice.
28. Robb, J. (1990): Effects of mycotoxins on animal performance. In: W. Haresign and D.J.A. Cole, Editors, Recent Advances in Animal Nutrition, Butterworths, London: 61–76.
29. Sinković, G. (2012): Prisutnost mikotoksina u ekološki i konvencionalno uzgojenim žitaricama namjenjenim hranidbi stoke, Diplomski rad, Visoko gospodarsko učilište u Križevcima
30. Sokolović, M. (2005): Značaj trikotecenskih mikotoksina u hrani za perad. Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva, Vol.59 (4):, 289-300.
31. Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić-Rački, Đ., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapac, T. (2010): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani. Osijek. [https://www.hah.hr/pdf/Knjiga\\_kemijske\\_i\\_fizikalne\\_opasnosti.pdf](https://www.hah.hr/pdf/Knjiga_kemijske_i_fizikalne_opasnosti.pdf) (preuzeto 25.9.2018.).
32. Šegvić Klarić, M., Pepeljnjak, S., Cvetnić, Ž., Kosalec, I. (2008): Comparison between ELISA and TLC/HPLC methods for determination of zearalenon and ochratoxin A in food and feed. Krmiva 50: 235-244.
33. Turk, D. (2017): Mikotoksini u hrani za ljude i životinje, <http://www.bioinstitut.hr/blog/biologija/mikotoksini-hrani-ljude-i-zivotinje-72/> , (preuzeto 08.011.2018.).
34. Valpotić, H., Šerman, V. (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja. 48 (1): 33.
35. 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.



36. Womack, E.D., Sparks, D.L., Brown, A.E. (2015): Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk products: a short review. *World Mycotoxin Journal* 9 (2): 305-315.
37. Uredba komisije (EU) br. 574/2011: O izmjeni Priloga I. Direktivi 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu najvećih dopuštenih količina za nitrit, melamin, *Ambrosia* spp. i neizbježnog prenošenja nekih kokcidiostatika i histomonostatika i o konsolidaciji Priloga I. i II. Direktivi (SL L 159, 17. 6. 2011.)

## SAŽETAK

Mikotoksini, sekundarni metaboliti nastali u procesu metabolizma plijesni, imaju negativan biološki utjecaj na zdravlje ljudi i životinja. Najznačajniji među njima, aflatoxin B<sub>1</sub>, svojim inhibirajućim djelovanjem uzrokuje znatnu materijalnu štetu proizvođačima stočne hrane, dok je njihov metabolit aflatoxin M<sub>1</sub> u mlijeku potencijalno opasan za zdravlje ljudi. U razdoblju od 2013. do 2017. analizirano je 203 uzorka stočne hrane na AFB<sub>1</sub>. Od 52,2% pozitivnih uzoraka u 19,02% sadržaj AFB<sub>1</sub> bio je iznad dopuštenih 20 µg/kg. Najveći prosječni sadržaj bio je u 2015. (24,88 µg/kg) i 2014. (21,71 µg/kg). U razdoblju od 2012. do 2017. analizirano je 552 uzorka svježeg kravljeg mlijeka na AFM<sub>1</sub>. Od 98,7% pozitivnih uzoraka u 57,8% prosječni sadržaj bio je iznad dopuštenih 0,05 µg/kg. Najveći sadržaj AFM<sub>1</sub> bio je u 2013. (0,2673 µg/kg), znatno manje, ali iznad dopuštenih količina, u 2017. (0,084 µg/kg) i u 2012. (0,0689 µg/kg). Visoke vrijednosti sadržaja AFB<sub>1</sub> u stočnoj hrani i AFM<sub>1</sub> u mlijeku u praćenom razdoblju ukazuju na povezanost ovih mikotoksina, a samim time i na važnost njihova kontinuiranog praćenja.

Ključne riječi: aflatoksini, stočna hrana, mlijeko

## SUMMARY

Mycotoxins, the secondary metabolites produced in the process of mould metabolism, have an adverse biological effect on the health of humans and animals. With their inhibitive action, the most important ones among them, aflatoxins B<sub>1</sub> cause significant material damage to the producers of animal feed, while their metabolite, aflatoxin M<sub>1</sub> in milk, is potentially harmful to human health. In the period from 2013 to 2017, 203 samples of animal feed were analyzed at AFB<sub>1</sub>. Of the 52.2% positive samples in 19.02% the content of AFB<sub>1</sub> was above the permissible 20 µg/kg. The highest average content was in 2015 (24.88 µg/kg) and 2014 (21.71 µg/kg). Between 2012 and 2017, 552 samples of fresh cow's milk were analyzed on AFM<sub>1</sub>. Of the 98.7% positive samples in 57.8% the average content was above 0.05 µg/kg. The highest content of AFM<sub>1</sub> was in 2013 (0.2673 µg/kg), significantly lower, but above the permitted levels, in 2017 (0.084 µg/kg) and in 2012 (0.0689 µg/kg). levels, in 2017 (0.084 µg/kg) and in 2012 (0.0689 µg/kg). The high values

of AFB<sub>1</sub> content in animal feed and AFM<sub>1</sub> in milk in the observed period indicate the linkage of these mycotoxins, and thus the importance of their continuous monitoring.

**Key words:** aflatoxins, animal feed, milk

## ŽIVOTOPIS

Ivana Gotić rođena je 11.04.1983. u Koprivnici.

U Križevcima završava osnovnu i srednju školu (gimazija). Na Visokom gospodarskom učilištu u Križevcima završava preddiplomski stručnij studij *Poljoprivreda*, stočarski smjer, i upisuje specijalistički diplomski stručni studij *Poljoprivreda*, smjer Održiva i ekološka poljoprivreda.

Zaposlena je u Hrvatskoj poljoprivrednoj agenciji od 2005. godine.

Svojom izuzetnom znatiželjom u otkrivanju drugačijeg i kvalitetnijeg života na Zemlji, 2013. postaje član udruge Zelena mreža aktivističkih grupa (ZMAG). Glavni cilj ZMAG-a je razvijanje i promoviranje permakulture, ekoloških znanja i vještina, primjenjivih modela i tehnologija, važnih za održivi razvoj te podizanje kvalitete života ljudi. Od 2014., kao jedan od osnivača Zadruga za dobru ekonomiju, Ivana se zalaže za ekonomiju koja je dobra, a to je ekonomija koja podupire kvalitetu života u cijeloj zajednici; koja stvara obilje prilika i mogućnosti da zadovoljimo svoje potrebe bez ugrožavanja drugih; koja prihvaća odgovornost, a njeguje solidarnost; koja pravedno koristi i dijeli resurse; koja poštuje održivost ekosustava. Godine 2016. postaje član Zadruga za etično financiranje (ZEF), neprofitne organizacije koja u ovom trenutku okuplja više od 1 200 fizičkih i pravnih osoba, koje zajedničkim snagama rade na razvoju demokratične, transparentne, solidarne te društveno i okolišno odgovorne ekonomije.