

**REZULTATI MIKOLOŠKIH I MIKOTOKSIKOLOŠKIH
ISPITIVANJA HRANIVA NA BAZI KUKURUZA
NAMENJENIH ZA ISHRANU KRAVA MUZARA***
*RESULTS OF MYCOLOGICAL AND MYCOTOXICOLOGICAL
INVESTIGATIONS OF CORN-BASED FEED FOR DAIRY COW DIET*

**Marija Škrinjar, Dobrila Jakić-Dimić, Vladislava Šošo, Nevena Blagojev,
Slavica Vesković-Moračanin, Tamara Gerić****

U ovom radu utvrđen je stepen fungalne kontaminacije uzoraka stočnih hraniva na bazi kukuruza (n=35), koji su prikupljeni sa četiri različite farme u Vojvodini tokom svih godišnjih doba u toku jedne godine, kao i utvrđivanje prisustva i količine aflatoksina B1 (AB1), ohratoksina A (OTA) i zearalenona (ZEA) u navedenim hranivima. Oko 97% uzoraka je bilo kontaminirano plesnima koje su pripadale sledećim rodovima: Absidia, Acremonium, Aspergillus, Cladosporium, Geotrichum, Eurotium, Fusarium, Mucor, Mortierella, Oidiodendron, Penicillium, Rhizopus, Scopulariopsis, Syncephalastrum, Trichoderma, Ulocladium i Wallrothiella. Identifikovano je ukupno 58 vrsta. Ukupan broj plesni se kretao od 1,00 (suva kukuruzna silaža – jesen, sveža kukuruzna silaža – leto, i silaža od zrna kukuruza – proleće) do 7,32 log cfu/g (suva kukuruzna silaža – zima). Mikotoksini su detektovani u 28,5% uzoraka: ZEA je nađen u leto (220 i 240 µg/kg) i u proleće (240 µg/kg) u uzorcima koncentrata, OTA u toku zime u suvoj kukuruznoj silaži (16 µg/kg) i proleća (12 µg/kg), dok AB1 nije detektovan u ispitivanim uzorcima.

Ključne reči: aflatoksin B1, ohratoksin A, plesni, stočna hrana na bazi kukuruza, zearalenon

* Rad primljen za štampu 28. 07. 2011. godine

** Dr Marija Škrinjar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija; dr Dobrila Jakić-Dimić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija; Vladislava Šošo, dipl. inž., istraživač-pripravnik, Nevena Blagojev, dipl. inž., istraživač-saradnik, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija; dr Slavica Vesković-Moračanin, viši naučni saradnik, dipl. vet. spec. Tamara Gerić, istraživač-pripravnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija

Uvod / Introduction

Kukuruz, kao bogat izvor energije i proteina, predstavlja veoma važnu komponentu stočne hrane širom planete. Poljoprivredna praksa mnogih zemalja podrazumeva obaveznu upotrebu kukuruznog koncentrata i različitih vrsta kukuruzne silaže u ishrani muznih životinja (Richard i sar., 2009). Zahvaljujući svojim nutritivnim osobinama i uslovima u kojima se uzgaja i skladišti, stočna hrana na bazi kukuruza često može da bude kontaminirana različitim vrstama plesni i njihovim ekstracelularnim metabolitima – mikotoksinima (Oruc i sar., 2006). Mikotoksini su jedinjenja niske molekulske mase i predstavljaju sekundarne produkte metabolizma filamentoznih plesni, koje najčešće pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Ovi metaboliti čine toksikološki i hemijski heterogene grupe. Konzumiranjem hrane koja je kontaminirana mikotoksinima, zdravlje preživara izloženo je direktnom riziku (Bennett i Klich, 2003; Kalac i Woolford, 1982), a posredno, konzumiranjem namirnica animalnog porekla dobijenih od životinja koje su hranjene kontaminiranim hranivima, i zdravlje ljudi (Jouany, 2007).

Toksigene plesni mogu da kontaminiraju kukuruz još u polju pre žetve i nakon žetve, tokom manipulacije i skladištenja, kao i tokom prerade u proizvode namenjene animalnoj i ljudskoj ishrani. Tako se toksigene plesni grubo dele na dve grupe: 1) poljske plesni i 2) skladišne plesni (Placinta i sar., 1999). Najčešći predstavnici poljskih plesni pripadaju rodovima *Fusarium* kao i plesnima iz grupe *Hyphomycetes Dematiaceous* (*Alternaria* i *Cladosporium*), dok se vrste rodova *Aspergillus* i *Penicillium* obično javljaju prilikom skladištenja. Rod *Aspergillus* broji preko 200 vrsta od kojih su mnoge štetne po zdravlje ljudi i životinja. Visok nivo mikotoksina *Aspergillus* vrsta je primećen u toplim i vlažnim regionima, ali njihov nalaz je takođe čest i u regionima sa umerenom klimom (Škrinjar i sar., 2006).

Proizvodnja silaže je jedan od najboljih načina konzervisanja stočnog hraniva, jer ga održava svežim i zdravstveno bezbednim, a pri tom čuva njegovu visoku nutritivnu vrednost (Sparo i Mallo, 2001). Kukuruzna silaža se proizvodi tako što se usitnjeni biljni materijal (cela biljka ili samo zrno kukuruza) usitnjava i pakuje, a zatim se skladištenjem u anaerobnim uslovima konzervira. Razvoj bakterija mlečne kiseline u ovim uslovima izaziva prirodnu fermentaciju, čime se pH vrednost snižava do nivoa koji inhibira rast klostridija i drugih bakterija, kao i velikog broja plesni (Richard i sar., 2009), koje se mogu naći u silaži. Na primer, prema Sparo i Mallo (2001), inicijalna pH vrednost opada sa 6,40 na 4,10, pri čemu se broj mezofilnih aerobnih bakterija brzo redukuje, broj enterokoka postepeno, dok sadržaj klostridija na kraju procesa ostaje na vrlo niskom nivou. Međutim, nakupljanje kondenzata, samozagrevanje uskladištenih proizvoda, prokišnjavanje skladišta, insekti i drugi štetni faktori tokom procesa siliranja i skladištenja, mogu da podstaknu nepoželjan rast plesni, proizvodnju mikotoksina i smanjenje nutritivnog kvaliteta (Lanier i sar., 2010). Konzumiranje hraniva kontaminiranog mikotoksinima kod preživara može da izazove mikotoksikoze, različitih manifestacija i posledica, uprkos njihovoj mogućnosti da ova jedinjenja

transformišu u manje toksične metabolite, kao na primer aflatoksine u aflatoksiole ili ohratoksine u ohratoksin-alfa (Fink-Gremmels, 2008). Hepatoksični aflatoksin B1 se u telu preživara transformiše u aflatoksin M1, koji se izlučuje kroz mleko i time direktno ugrožava zdravlje ljudi koji to mleko konzumiraju (Corbett i sar., 1988; Richard i sar., 2009).

Visok rizik od izlaganja ljudi štetnom dejstvu mikotoksina posredstvom stočne hrane objašnjava veliki interes prehrambene industrije za prevenciju prodiranja mikotoksina u lanac ishrane, jer postoji svega nekoliko načina, varijabilne efikasnosti, za rešavanje ovog problema kada se mikotoksini već nađu unutar lanca (Oruc i sar., 2006; Jouany, 2007).

Jedan od prvih koraka u borbi protiv dospevanja mikotoksina u hranu je monitoring prisustva toksigenih plesni i mikotoksina u stočnoj hrani. Cilj ovog rada je, stoga, bio ispitivanje stepena kontaminacije plesnima nekoliko vrsta hrane za životinje na bazi kukuruza tokom različitih godišnjih doba, izolovanje plesni i njihova identifikacija, kao i prisustvo aflatoksina B1, ohratoksina A i zearale nona.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

U ovom radu je ispitivana mikološka i mikotoksikološka kontaminacija različitih stočnih hraniva na bazi kukuruza (n=35), koja se koriste u ishrani muznih krava. Uzorkovanja su izvedena na području Vojvodine u toku jedne godine, tokom sva četiri godišnja doba. Uzorci su poticali sa četiri farme. Vrste hraniva i njihov broj predstavljeni su u tabeli 1.

Tabela 1. Vrsta hraniva i broj sakupljenih uzoraka po godišnjim dobima /
Table 1. Feed type and number of collected samples per season

Hranivo / <i>Feed</i>	Broj uzoraka / <i>Number of samples</i>			
	Leto / <i>Summer</i>	Jesen / <i>Autumn</i>	Zima / <i>Winter</i>	Proleće / <i>Spring</i>
Koncentrat / <i>Concentrate</i>	4	4	4	4
Kukuruzna silaža, suva / <i>Corn silage, dry</i>	—	3	4	3
Kukuruzna silaža, sveža / <i>Corn silage, fresh</i>	3	—	—	1
Silaža od kukuruznog zrna / <i>Corn grain silage</i>	—	—	2	3

Mikološko ispitivanje. Određivanje ukupnog broja plesni u 1 g uzorka izvedeno je primenom standardnog Kohovog metoda (metod razređenja). Zasejane ploče sa Sabouraud maltoznim agarom (SMA) i streptomycinom (0,01 – 0,02%) inkubirane su tokom 7 do 10 dana na temperaturi od 25°C, nakon čega su

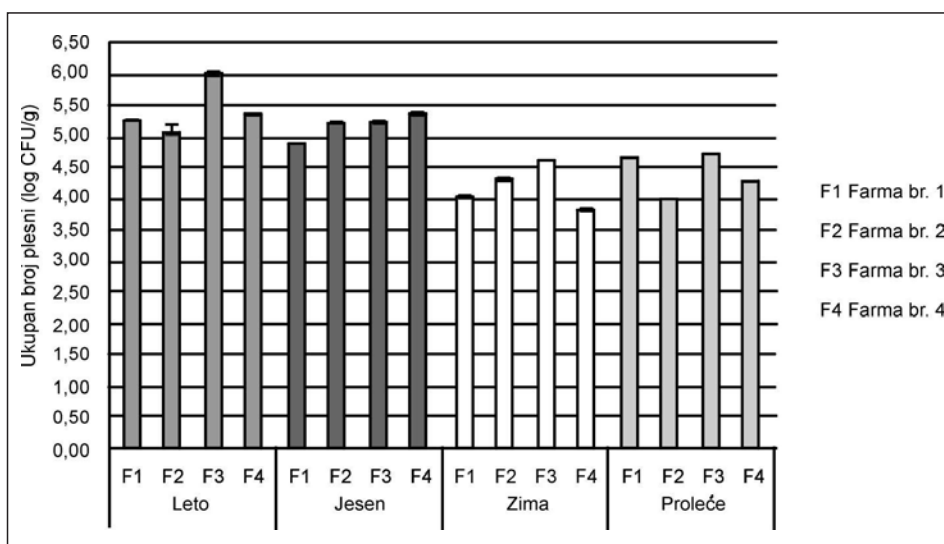
očitanje rezultati. Identifikacija izolovanih vrsta je urađena primenom ključeva za determinaciju gljivica prema sledećim autorima: Ellis (1971; 1976), Pidopličko i Miljko (1971), Nelson i sar. (1983) i Samson i sar. (2004).

Statistička analiza za ukupan broj plesni po 1 g uzorka je izvedena samo za uzorke koncentrata, tokom jedne godine za sva četiri godišnja doba. Podaci su obrađeni analizom varijanse (ANOVA), gde su vrednosti upoređene Dankanovim testom. Analize su izvedene upotrebom StatSoft paketa (STATISTICA 9.1 StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Mikotoksikološka ispitivanja obuhvatala su kvalitativno i kvantitativno određivanje aflatoksina B1 (AB1), ohratoksina A (OTA) i zearalenona (ZEA). Detekcija prisustva i sadržaja AB1, OTA i ZEA je izvedena fluorometrijski, korišćenjem VICAM fluorometrijskih metoda za njihovo utvrđivanje (*Afla BTM*, *Ochra TestTM*, *Zearala TestTM*).

Rezultati i diskusija / Results and discussion

Mikološka ispitivanja. Kontaminacija uzoraka plesnima je zabeležena tokom celog ciklusa istraživanja. U toku leta, zime i proleća stepen kontaminacije kod uzorkovanih hraniva je bio 100%, dok je u jesen 83,3% uzoraka bilo kontaminirano (grafikon 2). Vrednosti ukupnog broja plesni sa standardnom devijacijom kod uzoraka koncentrata, prikazane su na grafikonu 1. Statistička analiza je pokazala da između farmi tokom jednog godišnjeg doba nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$). Jedini izuzetak se pojavio tokom leta, kada je primećeno da



Grafikon 1. Ukupan broj plesni izolovan iz koncentrata tokom jedne godine
Graph 1. Total viable mould count in concentrate throughout one year

postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Visoka temperatura i vlažnost tokom ovog godišnjeg doba, kao i uslovi skladištenja mogu biti zaslužni za očigledno viši broj plesni izolovan po 1 g stočne hrane, što i potvrđuju rezultati statističke analize (Lanier i sar., 2010). Statistička analiza je takođe izvedena da se uporedi uticaj godišnjeg doba na ukupan broj plesni na svakoj farmi ponaosob. Značajna statistička razlika ($p < 0,05$) zapažena je na dve farme. Ova analiza takođe potvrđuje prethodnu pretpostavku, kojom je utvrđeno da klimatski faktori, promene vlažnosti vazduha imaju uticaj na ukupan broj izolovanih plesni. Do sličnih rezultata došli su i drugi istraživači (Biro i sar., 2009).

Rezultati fungalne kontaminacije ostalih hraniva predstavljeni su u tabeli 2. Najviši stepen kontaminacije suve kukuruzne silaže je bio tokom zime (7,32 log cfu/g), a najniži tokom leta (1,00 cfu/g). Sveža kukuruzna silaža uzorkovana je u leto i proleće. Najniža i najviša vrednost kontaminacije zabeležene su tokom leta, 1,00 cfu/g i 5,38 1,00 cfu/g. Uzorci silaže od kukuruznog zrna su bili najviše kontaminirani u proleće, gde je ukupan broj plesni bio 4,51 log cfu/g, a najmanje u zimu, sa 1,00 log cfu/g.

Tabela 2. Količina plesni po 1 gramu stočne hrane /
Table 2. Total mould count per 1 g of feed

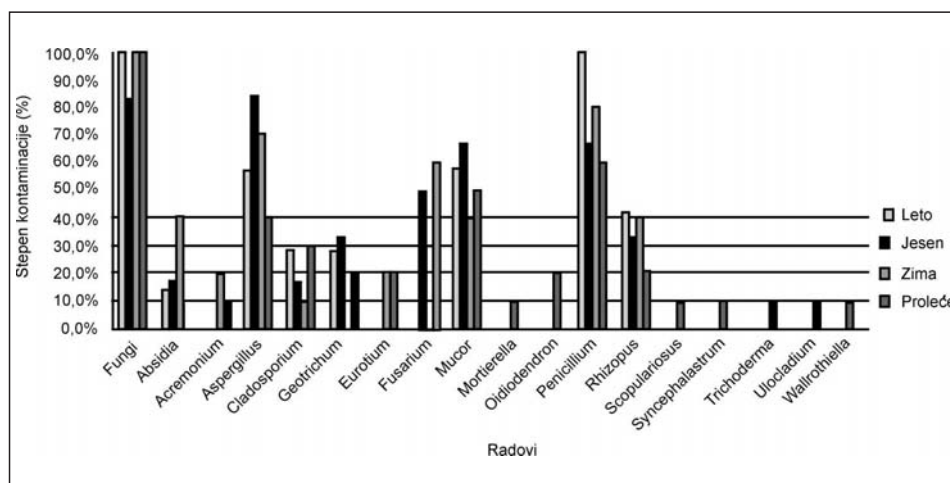
Hranivo / Feed	Količina plesni po 1 g (log cfu/g) / Total mould count per 1 g (log cfu/g)			
	Leto / Summer	Jesen / Autumn	Zima / Winter	Proleće / Spring
Kukuruzna silaža, suva / Corn silage, dry	—	1,00-3,79	1,30-7,32	3,28-4,41
Kukuruzna silaža, sveža / Corn silage, fresh	1,00-5,38	—	—	2,00-3,28
Silaža od kukuruznog zrna / Corn grain silage	—	—	1,00-1,18	1,30-4,51

Nakon utvrđivanja ukupnog broja, usledila je i identifikacija vrste plesni i ispitivanje prisustva i koncentracije mikotoksina. Uzorci su bili kontaminirani sa 17 različitih rodova plesni, iz kojih je izolovano i identifikovano 58 vrsta. Rezultati su prikazani po godišnjim dobima.

Leto – Tokom ovog godišnjeg doba, svi uzorci su bili kontaminirani plesnima (grafikon 2) i to 100% vrstama roda *Penicillium*; 57,1% vrstama rodova *Aspergillus* i *Mucor*; 42,9% vrstama roda *Rhizopus*; 28,6% *Cladosporium* i *Geotrichum* vrstama i, na kraju, 14,3% vrstama roda *Absidia*.

Nakon detaljnog mikološkog pregleda i identifikacije, iz koncentrata su izolovane brojne plesni, koje su svrstane u 8 rodova (*Absidia*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* i *Rhizopus*) i 20 vrsta (tabela 3). Vrste su: *Absidia corymbifera*, *Aspergillus flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A. protuberans*, *A. sulphureus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Eurotium her-*

bariorum, *Geotrichum candidum*, *Mucor hiemalis*, *M. pusillus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. capsulatum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. islandicum*, *P. simplicissimum*, *P. sublateritium* i *Rhizopus stolonifer*.



Grafikon 2. Stepen kontaminacije (%) plesnima stočne hrane na bazi kukuruza tokom istraživačkog ciklusa

Graph 2. Degree of contamination (%) of corn-based feed with moulds during investigation period

Plesni izolovane iz sveže kukuruzne silaže pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*, iz kojih je izolovano 6 različitih vrsta.: *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. herbarum*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevi – compactum* i *P. claviforme*.

Jesen – Kontaminacija uzoraka sakupljenih u jesen je prikazana na grafikonu 2. Utvrđeno je da je 83,3% uzoraka kontaminirano vrstama roda *Aspergillus*; 66,7% vrstama rodova *Penicillium* i *Mucor*; 50,0% *Fusarium* vrstama; 33,3% *Rhizopus* i *Geotrichum* vrstama i 16,7% vrstama rodova *Absidia* i *Cladosporium*.

Raznovrsni sojevi su tokom ovog perioda izolovani iz pojedinih uzoraka stočne hrane. Iz koncentrata izolovane plesni su svrstane u 8 rodova i 20 vrsta. Rodovi su: *Absidia*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* i *Rhizopus*. Vrste su: *A. corymbifera*, *Aspergillus carneus*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *C. cladosporoides*, *Fusarium lateritium*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *G. candidum*, *Mucor circinelloides*, *M. dimorphosporus*, *M. griseo-cyanus*, *M. hiemalis*, *M. pusillus*, *P. aurantiogriseum*, *P. echinulatum*, *P. commune* i *R. stolonifer*.

Sveža kukuruzna silaža je bila kontaminirana sledećim vrstama: *Aspergillus fumigatus*, *Oidiodendron tenuissimum* i *Penicillium claviforme*.

Tabela 3. Pregled rodova i vrsta plesni izolovanih iz stočne hrane /
Table 3. Review of fungal genera and species of moulds isolated from feed

Hranivo	Godišnje doba			Proleće
	Leto	Jesen	Zima	
Koncentrat	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Absidia corymbifera</i>
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. protuberus</i> , <i>A. sulphureus</i>	<i>Aspergillus carneus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i>	<i>Aspergillus caespitosus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i>
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		<i>Cladosporium herbarum</i>
	<i>Eurotium herbariorum</i>		<i>Eurotium herbariorum</i>	<i>Eurotium herbariorum</i>
	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Fusarium lateritium</i> , <i>F. solani</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i>
	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>M. pusillus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>		
		<i>Mucor circinelloides</i> , <i>M. dimorphosporus</i> , <i>M. griseo-</i> <i>cyanus</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>M. pusillus</i>	<i>Mortierella polycephala</i>	<i>Mucor hiemalis</i> , <i>M. racemosus</i>
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. capsulatum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. islandicum</i> , <i>P. simplicissimum</i> , <i>P. sublateritium</i>	<i>Mucor circinelloides</i> , <i>M. dimorphosporus</i> , <i>M. griseo-</i> <i>cyanus</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>M. pusillus</i>	<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. velutinum</i>
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus cohnii</i> , <i>R. stolonifer</i>	
			<i>Syncephalastrum racemosum</i>	

nastavak tabele 3 / cont. Table 3.

Hranivo	Godišnje doba			Proleće
	Leto	Jesen	Zima	
Kukuruzna silaža suva			<i>Absidia corymbifera</i>	
			<i>Acremonium strictum</i>	
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i>	<i>Aspergillus niger</i>
				<i>Cladosporium herbarum</i>
				<i>Fusarium moniliforme</i>
				<i>Geotrichum candidum</i>
			<i>Mucor heterosporus</i>	<i>Mucor dimorphosporus</i>
		<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	
		<i>Penicillium claviforme</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. frequentans</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. velutinum</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. velutinum</i>
			<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	
		<i>Waltheriella subiculosa</i>		
Sveža kukuruzna silaža	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger</i>			
	<i>Cladosporium herbarum</i>			<i>Cladosporium herbarum</i>
				<i>Geotrichum candidum</i>
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. brevi - compactum</i> , <i>P. claviforme</i>			<i>Mucor hiemalis</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>

nastavak tabele 3 / cont. Table 3.

Hranivo	Godišnje doba			Proleće
	Leto	Jesen	Zima	
Kukuruzna silaža od zrna kukuruza				<i>Chaetomium globosum</i>
				<i>Cladosporium herbarum</i>
				<i>Fusarium moniliforme</i>
				<i>Geotrichum candidum</i>
				<i>Mucor dimorphosporus</i>
				<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
				<i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Ulocladium botrytis</i>

Zima – U toku zime 100% uzoraka je bilo kontaminirano plesnima, i to: 80% uzoraka *Penicillium* vrstama, 70% *Aspergillus* vrstama, 40% *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus* vrstama, 30% vrstama roda *Fusarium*, 20% *Acremonium*, *Eurotium* i *Oidiodendron* vrstama, i 10% vrstama rodova *Cladosporium*, *Mortierella*, *Scopulariopsis*, *Syncephalastrum* i *Wallrothiella*.

Izolovane plesni su svrstane u 11 rodova (*Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Syncephalastrum*) i 20 vrsta: *Absidia corymbifera*, *Acremonium strictum*, *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *E. herbariorum*, *F. moniliforme*, *Mortierella polycephala*, *Mucor heterosporus*, *O. tenuissimum*, *P. aurantiogriseum*, *P. decumbens*, *P. islandicum*, *P. miczynskii*, *P. purpurogenum*, *Rhizopus cohnii*, *R. stolonifer* i *Syncephalastrum racemosum*.

Iz suve kukuruzne silaže izolovano je 6 rodova i 13 vrsta. Izolovani rodovi: *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Oidiodendron* i *Penicillium*. Izolovane vrste su: *Absidia ramosa*, *Acremonium strictum*, *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *M. heterosporus*, *O. tenuissimum*, *P. aurantiogriseum*, *P. commune*, *P. frequentans*, *P. funiculosum*, *P. janthinellum*, *P. velutinum* i *Wallrothiella subiculosa*.

Silaža od zrna kukuruza je bila kontaminirana *Scopulariopsis brevicaulis*, *Cladosporium herbarum* i *Penicillium aurantiogriseum* vrstama.

Proleće – Na grafikonu 1 je prikazan stepen kontaminacije uzoraka obrađenih u prolećnom periodu. Uzorci su plesnima različitih rodova bili kontaminirani u sledećim procentima: 60% uzoraka je bilo kontaminirano *Fusarium* i *Penicillium* vrstama, 50% vrstama roda *Mucor*, 40% *Aspergillus* vrstama, 30% *Cladosporium* vrstama, 20% vrstama rodova *Geotrichum*, *Eurotium* i *Rhizopus* i 10% vrstama rodova *Absidia*, *Acremonium*, *Trichoderma* i *Ulocladium*.

Koncentrat je bio kontaminiran plesnima svrstanim u 8 rodova (*Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor* i *Penicillium*) i 20 vrsta (*Absidia corymbifera*, *Acremonium strictum*, *Aspergillus caespitosus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Cladosporium herbarum*, *Eurotium herbariorum*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Mucor hiemalis*, *M. racemosus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. claviforme*, *P. expansum* i *P. velutinum*).

Plesni izolovane iz suve kukuruzne silaže su: *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum*, *Mucor dimorphosporus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. claviforme*, *P. expansum* i *P. velutinum*.

Iz sveže kukuruzne silaže izolovane su 4 različite vrste: *Cladosporium herbarum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor hiemalis* i *Penicillium chrysogenum*.

Kukuruzna silaža od zrna kukuruza je bila kontaminirana sledećim vrstama plesni: *Chaetomium globosum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium moniliforme*, *Geotrichum candidum*, *Mucor dimorphosporus*, *Rhizopus stolonifer* i *Ulocladium botrytis*.

Tabela 4. *Fungalne vrste izolovane iz hraniva na bazi kukuruza u toku istraživačke godine / Table 4. Fungal species isolated from corn-based feed in one research year*

Rod	Vrsta	Rod	Vrsta
<i>Absidia</i>	<i>Absidia corymbifera</i> (Cohn) Sacc. & Trotter	<i>Oidiodendron</i>	<i>Oidiodendron tenuissimum</i> (Peck) Hughes
<i>Acremonium</i>	<i>Acremonium strictum</i> Gams	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx <i>P. brevi - compactum</i> Dierckx <i>P. capsulatum</i> Raper and Fennell <i>P. claviforme</i> Bain <i>P. chrysogenum</i> Thom <i>P. commune</i> Thom <i>P. decumbens</i> Thom <i>P. echinulatum</i> Fassatiava <i>P. expansum</i> Link ex Gray <i>P. frequentans</i> Westling <i>P. funiculosum</i> Thom <i>P. islandicum</i> Sopp <i>P. janthinellum</i> Biourge <i>P. miczynskii</i> Zaleski <i>P. purpurogenum</i> Stoll <i>P. simplicissimum</i> (Oudemans) Thom <i>P. sublateritium</i> Biourge <i>P. velutinum</i> van Beyma
<i>Aspergillus</i>	<i>A. caespitosus</i> Raaper and Thom <i>A. candidus</i> Link <i>A. carneus</i> (van Tiegh.) Blochwitz <i>A. clavatus</i> Desm. <i>A. flavus</i> Link <i>A. fumigatus</i> Fresen <i>A. niger</i> van Tiegh <i>A. ochraceus</i> Wilhelm <i>A. parasiticus</i> Speare <i>A. protuberus</i> Muntanola - Cvetković <i>A. sulphureus</i> (Fres.) Thom and Church <i>A. terreus</i> Thom <i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus cohnii</i> Berl. et de Toni <i>R. stolonifer</i> Ehrenb
<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries	<i>Scopulariopsis</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fr.) de Vries <i>C. herbarum</i> (Pres.) Link ex Gray	<i>Syncephalastrum</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i> Cohn ex Schroet
<i>Eurotium</i>	<i>Eurotium herbariorum</i> (Wiggers) Link	<i>Ulocladium</i>	<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium lateritium</i> Ness <i>F. moniliforme</i> Sheldon <i>F. solani</i> (Mart) Sacc. <i>F. oxysporum</i> Berk. & Curt	<i>Wallrothiella</i>	<i>Wallrothiella subiculosa</i> Höhn
<i>Geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i> Link ex Pres.		
<i>Mortierella</i>	<i>Mortierella polycephala</i> Coem.		
<i>Mucor</i>	<i>M. circinelloides</i> van Tiegh <i>M. dimorphosporus</i> Lendin. <i>M. griseo - cyanus</i> Hagem <i>M. heterosporus</i> Fisch. <i>M. hiemalis</i> Wehmer <i>M. pusillus</i> Lindt. <i>M. racemosus</i> Fres.		

Mikotoksikološke analize su sprovedene takođe na svim uzorcima tokom jedne godine. Rezultati su predstavljeni u tabeli 5. Svi uzorci su bili negativni na nalaz AB1. OTA je detektovan u zimu u svim uzorcima suve kukuruzne silaže (n=4) u koncentraciji od 16,00 µg/kg dok je u proleće samo jedan uzorak suve kukuruzne silaže bio pozitivan na nalaz OTA u manjoj koncentraciji u odnosu na zimu (12,00 µg/kg). Ostali uzorci su bili negativni na OTA. ZEA je nađen samo u koncentratu u koncentracijama od 220,00 i 240,00 µg/kg u letnjem periodu (n=2) i u proleće u količini od 240,00 µg/kg (kontaminirana su bila 3 uzorka od 4, sa podjednakim količinama ZEA).

Tabela 5. Nalaz mikotoksina u stočnoj hrani /
Table 5. Findings of mycotoxins in feed

Hranivo / Feed	AB1 (µg·kg ⁻¹)				OTA (µg·kg ⁻¹)				ZEA (µg·kg ⁻¹)			
	L	J	Z	P	L	J	Z	P	L	J	Z	P
Koncentrat / Concentrate	—	—	—	—	—	—	—	—	220.00 240.00	—	—	240.00
Kukuruzna silaža, suva / Corn silage, dry	—	—	—	—	—	—	16.00	12.00	—	—	—	—
Sveža kukuruzna silaža / Fresh corn silage	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kukuruzna silaza od zrna kukuruza / Corn grain silage	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

L - leto, J - jesen, Z - zima, P - proleće / L - Summer, J - Autumn, Z - Winter, P - Spring

Sumiranjem rezultata u toku jedne istraživačke godine, može se uočiti da je stepen fungalne kontaminacije tokom cele godine bio znatno visok i da je tokom leta, zime i proleća bio čak 100%. Od izolovanih plesni, svakako najinteresantniji su rodovi *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*, jer su zastupljeni sa po nekoliko vrsta od kojih je većina toksigena (Marasas i sar., 1984; Ožegović i Pepeljnjak, 1995; Samson i sar., 2004).

Interesantno je da su *Aspergillus* vrste najčešće registrovane u toku jeseni, kada su niže temperature vazduha u odnosu na leto ili proleće, jer su one poznate po tome da im pogoduju više temperature za razmnožavanje i rast, a pogotovo za stvaranje sekundarnih metabolita (Samson i sar., 2004).

Dejstvom metabolizma nekih vrsta od izolovanih rodova (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Geotrichum*) nastaju lako isparljiva organska mikrobna jedinjenja (MVOCs) koja daju specifičan plesnivi miris stočnoj hrani, koji uzrokuje smanjenje unosa hrane ili produžuje vreme obroka (Fink-Gremmels, 2008).

Prema navodima iz literature (Marasas i sar., 1984; Ožegović i Pe-
peljnjak, 1995; Samson i sar., 2004; i dr.), mikotoksine ispitivane u ovom radu po-
tencijalno proizvode neke od plesni koje su izolovane tokom ovog istraživanja:

- AB1 *Aspergillus flavus* (31,42% uzoraka je bilo kontaminirano ovom vrstom) i *A. parasiticus* (2,85%),
- OTA *Aspergillus niger* (17,14%) i *A. ochraceus* (2,85%) i
- ZEA *Fusarium moniliforme* (31,42%), *F. oxysporum* (5,71%) i *F. solani* (2,85%).

Iako je veliki broj uzoraka bio kontaminiran plesnima potencijalnim proizvođačima AB1, do sinteze tog toksičnog metabolita nije došlo. Ovi rezultati pokazuju da uslovi skladištenja, vlažnost vazduha, a pre svega genetička predispozicija za stvaranje određene vrste toksina, imaju značajan uticaj na metabolizam mikotoksigenih plesni. Aflatoksini predstavljaju mnogo manji problem u našoj zemlji nego u suptropskim i tropskim delovima Afrike i Amerike, gde postoje izuzetno povoljni klimatski uslovi za razvoj aflatoksigenih plesni i aflatoksina. To potvrđuju dobijeni rezultati, kao i rezultati istraživanja Kordić i sar. (1996), koji su utvrdili prisustvo AB1 samo kod 2% prirodno osušenih uzoraka kukuruza, za razliku od ZEA, koji je konstatovan u čak 61% uzoraka, nezavisno od načina sušenja.

S obzirom na to da su vrste roda *Fusarium* takođe poznate kao i „poljske plesni”, nastanak toksičnih metabolita, zearalenona, moguć je već u polju, u toku uzgoja kukuruza. Metaboliti se zadržavaju na biljci, a razvoj plesni i toksina se nastavlja i kasnije, tokom skladištenja (Krnjaja i sar., 2007; Bagi i sar. 2008; Lević, 2008).

Zaključak / Conclusion

Stočna hrana na bazi kukuruza ispitana u ovom radu bila je kontaminirana plesnima tokom celog perioda istraživanja. Najzastupljeniji rodovi su bili *Aspergillus* (12 vrsta), *Fusarium* (4 vrste), *Mucor* (7 vrsta) i *Penicillium* (20 vrsta). Mnoge izolovane plesni su potencijalno patogene. Ochratoxin je detektovan u suvoj kukuruznoj silaži u 5 uzoraka tokom godine, a zearalenon u koncentratu u 5 uzoraka tokom istraživačkog perioda. Osim klimatskih faktora, na stepen kontaminacije su veoma uticali i uslovi skladištenja i higijena svake farme ponaosob, što je pokazano statističkom analizom, gde je za jedno isto stočno hranivo bilo razlike u stepenu kontaminacije u istom godišnjem dobu. Prevencija kontaminacije plesnima, kako u toku uzgoja, tako i u periodu skladištenja stočne hrane je od najveće važnosti jer efikasnih metoda za dekontaminaciju i detoksikaciju ima veoma malo.

ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENT

Ovo istraživanje je realizovano uz finansijsku podršku Ministarstva za Nauku Republike Srbije, u sklopu projekta III46009.

These investigations were realized with the financial support of the Ministry for Science of the Republic of Serbia within Project III46009.

Literatura / References

1. AFLA B TEST™, Instruction Manual, VICAM, Watertown, USA, 1997.
2. Bagi F, Balaž F, Jajić I, Stojšin V. Mycotoxin content in different parts of *Fusarium* infected weath heads. *Cereal Res Commun* 2008; 36: 341-2.
3. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol* 2003; 16: 497-516.
4. Bíro D, Juráček M, Kačániová M, Šimko M, Gálik B, Michálková J, Gyöngyová E. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Ann Agric Environ Med* 2009; 16: 227-32.
5. Black RD, McVay DS, Oehme FW. Immunotoxicity in the bovine animal. *Vet Hum Toxicol* 1992; 34: 438-42.
6. Castegnaro M, Barsch H, Chernozemsky I. Endemic nephropathy and urinary tract tumors in Balkans. *Cancer Res* 1987; 47: 3606-9.
7. Corbett WT, Brownie CF, Hagler SB, Hagler Jr WM. An epidemiological investigation associating aflatoxin M1 with milk production in dairy cattle. *Vet Hum Toxicol* 1988; 30: 5-8.
8. Dänicke S, Matthaus K, Lebzien P, Valenta H, Stemme K, Ueberschar KH, Razzazi-Fazeli E, Bohm J, Flachowsky G. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. *J Anim Physiol An N* 2005; 89: 303-15.
9. Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*, Commonwealth Mycological institute, Kew, Surrey, England, 1971.
10. Fink-Gremmels J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet J* 2008; 176: 84-92.
11. Hult K, Palestina R, Habazin-Novak V, Radić B, Čeović S. Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch Toxicol* 1982; 51: 313-7.
12. Jouany JP. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Tech* 2007; 137, 342-62.
13. Kalac P, Woolford MK. A review of some aspects of possible associations between the feeding of silage and animal health. *Bov Vet J* 1982; 138: 305-20.
14. Kordić B, Panin M, Kandić S, Lončarević A, Muntanjola-Cvetković M. Rezultati višegodišnjeg mikrobilološkog i mikotoksikološkog istraživanja stočne hrane u SR Srbiji. Posebna izdanja ANU BiH, LXXX. Odeljenje medicinskih nauka 1986; 12: 17-28.
15. Krnjaja V, Lević J, Tomić Z, Nešić Z, Stojanović Lj, Trenkovski S. Dynamics and incidence and frequency of populations of *Fusarium* species on stored maize grain. *Biotechnology In Animal Husbandry* 2007; 5-6: 589-600.
16. Lanier C, Richard E, Heutte N, Picquet R, Bouchart V, Garon D. Airborne molds and mycotoxins associated with handling of corn silage and oilseed cakes in agricultural environment. *Atmos Environ* 2010; 44: 1980-6.
17. Lević J. Vrste roda *Fusarium*. Beograd: Cicero, 2008.
18. Macgerorge KM, Mantle PG. Nephrotoxic fungus in a Yugoslavian community in which Balkan endemic nephropathy is hyperendemic. *Mycol Res* 1991; 95: 660-4.
19. Marasas WFO, Nelson PE, Toussonn TA. Toxigenic *Fusarium* species. University Park and London: The Pennsylvania State University Press, USA, 1984.

20. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 1983.
21. OCHRA TEST™, Instruction Manual, VICAM, Watertown, USA, 1997.
22. Oruc HH, Cengiz M, Kalkanli O. Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. *Anim Feed Sci Tech* 2006; 128: 337-41.
23. Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Zagreb: Školska knjiga, 1995.
24. Pidopličko NM, Miljko AA. Atlas mukoraljnih gribov. Kijev: Naukova dumka, 1971.
25. Placinta CM, D'Mello JPF, Mac Donald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Tech* 1999; 78: 21-37.
26. Richard E, Heute N, Bouchart V, Garon D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Tech* 2009; 148: 309-20.
27. Samson RAE, Hoekstra S, Frisvad JC. Introduction to food- and airborne fungi. 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2004.
28. Samson RA, Frisvad JC. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extralites. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands 2004.
29. Sparo MD, Mallo RA. Evaluation of the bacterial flora in natural corn silage. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33(2): 75-80.
30. Škrinjar M, Könyves T, Ač M. Frequency of *Aspergillus fumigatus* fres. - a toxigenic and allergenic fungal species in milking cows feeds throughout one research year. *Matica Srpska Novi Sad. Proc Nat Sci* 2009; 116: 101-12.
31. ZEARALA TEST™, Instruction Manual, VICAM, Watertown, USA, 1997.

ENGLISH

RESULTS OF MYCOLOGICAL AND MYCOTOXICOLOGICAL INVESTIGATIONS OF CORN-BASED FEED FOR DAIRY COW DIET

Marija Škrinjar, Dobrila Jakić-Dimić, Vladislava Šošo, Nevena Blagojev, Slavica Vesković-Moračanin, Tamara Gerić

In this study, fungal contamination was determined as well as total aflatoxin B1(AB1), ochratoxin A (OTA) and zearalenon (ZEA) levels in corn-based feed samples obtained from four different farms in Serbia (n=35) during one year. Mycotoxins were detected in feed using the VICAM fluorometric method. It was determined that 97.14% of all samples were contaminated with moulds which belonged to following genera: *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Mortierella*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Ulocladium* and *Wallothiella*. A total of 58 different species were identified. Total mould count per 1 g ranged from 1.00 log cfu/g (dried corn silage – autumn, fresh corn silage - summer and corn grain silage - spring) to 7.32 log cfu/g (dried corn silage - winter). Mycotoxins were isolated from 28.5% of samples: ZEA was found in summer (220-240 µg/kg)

and in spring (240 µg/kg) in concentrate samples; OTA was detected in winter in dried corn silage (16 µg/kg) and in spring (12 µg/kg); all samples were AB1 free.

Key words: corn based feed, moulds, aflatoxin B1, ochratoxin A, zearalenon

РУССКИЙ

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКОЛОГИЧЕСКИХ И МИКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ КОРМОВ НА БАЗЕ КУКУРУЗЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КОРМЛЕНИЯ ДОЙНЫХ КОРОВ

**Мария Шкриняр, Добрила Якич-Димич, Владислава Шошо, Невена Благоев,
Славица Вескович-Морачанин, Тамара Герич**

В этой работе совершено утверждение степени фунгальной контаминации, образчиков кормов для скота на базе кукурузы (n=35), собранные с четырёх различных ферм в Воеводине в течение всех времён года в течение одного года, словно и утверждение присутствия и количества афлатоксина В1 (АВ1), охратоксина А (ОТА) и зearаленона (ЗЕА) в приведённых кормах. Около 97% образчиков было контаминировано плеснями, которые принадлежали следующим родам: *Ab-sidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Mortierella*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Syncephalastrum*, *Tri-choderma*, *Ulocladium* и *Wallrothiella*. Идентифицировано совокупно 58 видов. Совокупное число плесней двиглось от 1,00 (сухого кукурузного силосования - осень, свежее кукурузное силосование - лето и силосоване от зерна кукурузы - весна) до 7,32 лог цфу/г (сухое кукурузное силосование-зима). Микотоксины детектованы в 28,5% образчиков: ЗЕА найден в лето (220 и 240 мг/кг) и весной (240 мг/кг) в образчиках концентрата, ОТА в течение зимы в сухом кукурузном силосовании (16 мг/кг) и весна (12 мг/кг), пока АВ1 не детектован в испытанных образчиках.

Ключевые слова: корм для скота на базе кукурузы, плесни, афлатоксин В1, охратоксин А, зearаленон