



## DETEKCIJA DEOKSINIVALENOLA I ZEARALENONA U UZORCIMA STOČNE HRANE I HRANE ZA LJUDSKU PREHRANU

Amir Ibrahimagić, Dženana Hasanbašić, Čamka Kovač

Služba za hemijsku dijagnostiku, Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica

### SAŽETAK

**Uvod** Mikotoksini su otrovni spojevi koje proizvode plijesni na sirovinama, poput žitarica i predstavljaju ozbiljnu opasnost za humano zdravlje i zdravlje životinja. Životinje i ljudi izloženi su uglavnom konzumiranjem kontaminirane hrane. Cilj istraživanja je utvrditi prevalenciju deoksinivalenola (DON) i zearalenona (ZEA) u proizvodima.

**Metode** Za detekciju deoksinivalenola i zearalenona korišten je enzimski imunosorbentni test (ELISA).

**Rezultati:** Među 40 uzoraka (24 hrane za životinje i 16 uzoraka hrane za humanu prehranu) ispitana je prisutnost mikotoksina. Najviše detektovane pojedinačne razine mikotoksina bile su, ZEA: 237,84 µg/kg u uzorku hrane za životinje i ZEA: 20,28 µg/kg u uzorku hrane za ljudsku prehranu, DON: 2927,00 µg/kg u uzorku hrane za životinje i DON : 973,00 µg/kg u uzorku hrane za ljudsku prehranu. ZEA je detektovan u 54,2% (13; od ukupno 24) uzoraka hrane za životinje u rasponu od < 10 do 237,84 µg/kg ( $p < 0,05$ ) i u 18,75% (tri; od ukupno 16) uzoraka hrane u rasponu od <10 do 20,28 µg/kg ( $p > 0,05$ ). DON je detektovan u 75,0% (18; od 24) uzoraka stočne hrane u rasponu od < 40 do 2927,00 µg/kg ( $p > 0,05$ ) i u 43,75% (sedam; od 16) uzoraka hrane za ljudsku prehranu u rasponu od <40 do 973,00 µg/kg ( $p > 0,05$ ). Istodobna pojava mikotoksina također je dokazana: 50,0% analiziranih uzoraka pokazalo je koegzistenciju oba mikotoksina u uzorcima hrane za životinje i 12,5% u uzorcima hrane za ljudsku prehranu.

**Zaključci** Zbog činjenice da se distribucija mikotoksina u sirovinama može uveliko promijeniti iz godine u godinu s klimatskim uvjetima ili globalizacijom tržišta, potrebno je redovito praćenje mikotoksina u hrani za životinje kako bi se spriječila integracija kontaminiranih materijala u prehrambeni lanac.

**Ključne riječi:** kontaminacija hrane, higijena, mikroorganizmi, mikotoksini

### **Autor za korespondenciju:**

*Prof. dr. sc. Amir Ibrahimagić, dipl. ing. MLD*

*Institut za zdravlje i sigurnost hrane Zenica*

*Služba za hemijsku dijagnostiku*

*Tel: 0038761/614-147*

*E-mail: [ibrahimagic.amir@gmail.com](mailto:ibrahimagic.amir@gmail.com)*





## UVOD

Mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka i životinja direktnom ili indirektnom kontaminacijom. U direktnoj kontaminaciji prehrambeni materijal je osnova rasta toksikogene plijesni. Namirnice mogu biti dobri domaćini za rast plijesni u nekim stadijima u toku njihove proizvodnje, prerade, transporta i skladištenja. Indirektna kontaminacija će se pojaviti kada su dodaci namirnicama kontaminirani mikotoksinima (1).

Prisutnost mikotoksina ovisi o klimatskim uvjetima, posebno o periodu žetve, uslova transporta i skladištenja. Sadržaj vode zrna u žetvi važan je parametar za naknadni porast plijesni. Nakon kikirikijeva brašna, kukuruz je

najveći izvor ulaska mikotoksina u krmu. Pri tome je važna i zemlja porijekla kukuruza, jer je u zemljama Dalekog istoka kukuruz redovito kontaminiran aflatoksinom (1).

Mikotoksikoze su akutna i hronična oštećenja zdravlja izazvana mikotoksinima (2). Mikotoksini mogu izazvati kod ljudi i životinja kancerogeni efekat, imunotoksični efekat, probavne smetnje, neurotoksični efekat, hepatotoksični efekat, nefrotoksični efekat, reproduktivne i razvojne poremećaje (Tabela 1.), pri čemu često mogu istovremeno djelovati na više mjesta u organizmu i na različite načine što ovisi o vrsti mikotoksina, dozi i vremenu izloženosti (1).

**Tabela 1. Prikaz bolesti uzrokovanih mikotoksinima (3)**

Sistem	Zdravstveni problemi	Mikotoksini
krvotok	smanjena elastičnost žila, unutrašnja krvarenja	aflatoksini, satratoxini, roridini
digestivni sistem	dijareja, povraćanje, krvarenje iz creva, oštećenje jetre, nekroze, ibrioze, rane na mukoznim membranama, anoreksija	aflatoksini, T-2 toksini, deoksinivalenol (vomitoksin )
respiratorni sistem	ozbiljne poteškoće s disanjem, krvarenje iz pluća	trikotehekeni
nervni sistem	drhtavica, nekoordinirani pokreti, depresija, glavobolja	tremogeni, trikotehekeni
koža	osip, fotosenzitivnost	trikotehekeni
urinarni sistem	oštećenje bubrega	ohratoksin, citrinin
reproduktivni sistem	sterilnost, promjene u reproduktivnim ciklusima	T-2 toksin, zearalenon
imuni sistem	promjene ili potpuno uništenje	mnogi mikotoksini



Žitarice su najčešće kontaminirane aflatoksinom, deoksinivalenolom (DON), zearalenonom, fumonizinima i T-2 toksinom (4).

Najbolji pristup za uništavanje mikotoksina u hrani je spriječavanje rasta plijesni u svim fazama proizvodnje, prikupljanja, transporta, obrade, skladištenja i prodaje.

Mikotoksini se produciraju na nivoima aktiviteta vode iznad 0,83, ili približno 8% do 12% vlažnosti zrna, što zavisi od tipa žitarice (2). Stoga je neophodno, brzo i temeljno sušenje i skladištenje u suhim uslovima.

Zemlje članice EU su uskladile zakonsku regulativu o maksimalno dopuštenim koncentracijama mikotoksina u hrani za životinje i ljude (EC/576/2006 i EC/1881/2006). U žitaricama i njihovim prerađevinama namijenjenim ljudskoj prehrani maksimalno dozvoljene koncentracije za ohratoksin i zearalenon kreću se od 0,5 mg/kg, odnosno 20 mg/kg (diječja hrana) do 5 mg/kg, odnosno 200 mg/kg (neprerađene žitarice). U stočnoj hrani su najveće dopuštene koncentracije između 0,05 i 0,25 mg/kg za ohratoksin te između 0,1 i 3 mg/kg za zearalenon (5).

## **ZNAČAJ MIKOTOKSINA SA ZDRAVSTVENOG ASPEKTA**

### ***Zearalenon***

Toksigeni efekat zearalenona zavisi od koncentracije, vremena izlaganja i opštem fiziološkom stanju organizma. Obično izaziva poremećaje urogenitalnog sistema, a hronična trovanja ili jača akutna trovanja ostavljaju trajne posljedice na reproduktivnim organima kao degenerativne

promjene (6, 7). Simptomi su upala rodnice (vulvovaginitis), a u životinja koje nisu spolno zrele prolaps rektuma i rodnice. Smanjen je spolni nagon, životinje su neplodne, dolazi do mumifikacije fetusa, pobačaja, mrtvorodenosti i smanjenog okota. Kod muških životinja može uzrokovati atrofiju sjemenika i povećanje mliječnih žlijezda. Zearalenon inhibira lučenje folikulstimulirajućeg hormona zbog čega potiskuje razvoj folikula ovarija i inhibira proces ovulacije te ima luteotropan efekt, pa izaziva retenciju žutog tijela, pseudotrudnoću i anestriju. Uzrokuje hormonsku neravnotežu i dovodi do hiperestrogenizma kod domaćih životinja. Svinje su najosjetljivija vrsta i kod njih su mikotoksikoze zearalenonom najčešće (1).

### ***Deoksinivalenol***

Kod životinja akutna izloženost DON-u izaziva smanjeni unos hrane (anoreksiju) i povraćanje, a kod duže izloženosti uzrokuje smanjeni prirast te promjene na prsnoj žlijezdi (timusu), slezeni, srcu i jetri. DON se brzo i djelotvorno apsorbira pa se više od 95% unesenog DON-a izluči mlijekom, urinom i fecesom krava i svinja (8).

Dokazano je sinergističko djelovanje DON-a u kombinaciji s drugim mikotoksinima. U kombinaciji s aflatoksinom B1, DON ima izražajnije mutageno djelovanje.

## **ZAKONSKA REGULATIVA U BIH**

U Bosni i Hercegovini trenutno su na snazi dva Pravilnika:

- Pravilnik o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, Sl. glasnik BiH, br. 72/11



- Pravilnik o izmjenama i dopuni Pravilnika o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje, Sl. glasnik BiH, br. 23/16
- Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminata u hrani, Sl. glasnik BiH, br. 49/14.

Pravilnici su usklađeni sa zakonima, normama i direktivama na nivou EU.

## MATERIJAL I METODE

Među 40 uzoraka (24 hrane za životinje i 16 uzoraka hrane za humanu prehranu) ispitana je prisutnost mikotoksina. Analize su vršene pri Službi za hemijsku dijagnostiku Instituta za zdravlje i sigurnost hrane Zenica.

Od screening metoda u određivanju mikotoksina najviše se koristi imunoenzimska metoda (ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay) kao

jednostavna i brza metoda, ekonomski i ekološki prihvatljiva s mogućnošću analize velikog broja uzoraka (9). Nedostatak ove metode je nedovoljna specifičnost i mogućnost cross-reakcija s konjugiranim metabolitima.

Metoda za bazira na kompetitivnoj kolorimetrijskoj imunoenzimskoj metodi. Specifična antitijela su impregnirana u jažice; tokom procesa same analize, ispitivani aflatoksin u uzorku zajedno sa dodanim HRP konjugatom se „takmiči“ za vezivanje na specifično antitijelo u jažicama, sprečavajući vezivanje HRP konjugata. Nakon dodavanja TMB substrata, intenzitet boje ili slobodnog konjugata proporcionalan je koncentraciji ispitivanog aflatoksina. Očitanje se vrši na 450 nm.

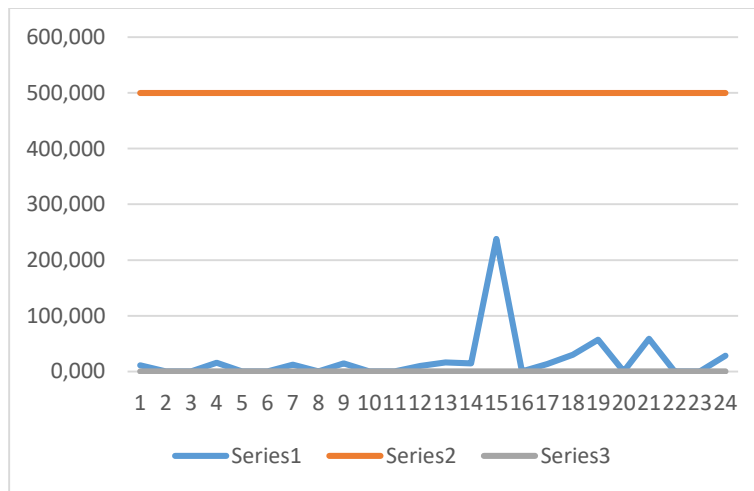


Slika 1. ELISA čitač (Izvor: slikao Amir Ibrahimagić)

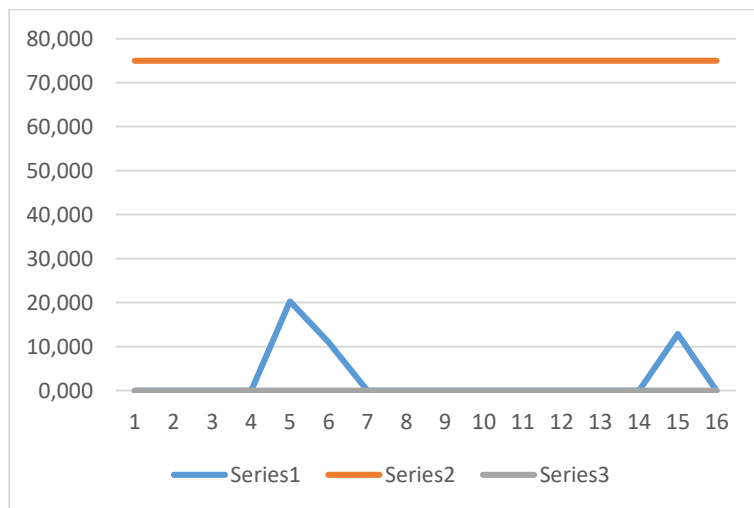


## REZULTATI

Istraživanjem je analizirano ukupno 40 uzoraka i to 24 uzorka hrane za životinje i 16 uzoraka hrane za ljudsku upotrebu.



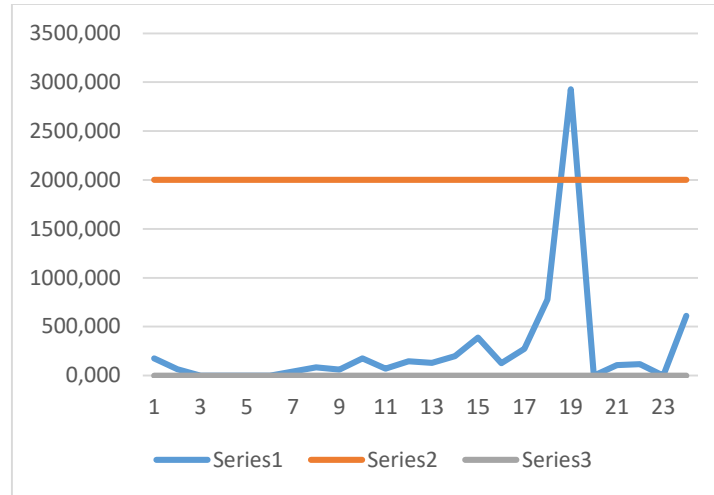
Grafikon 1. Prikaz zastupljenosti ZEA u stočnoj hrani



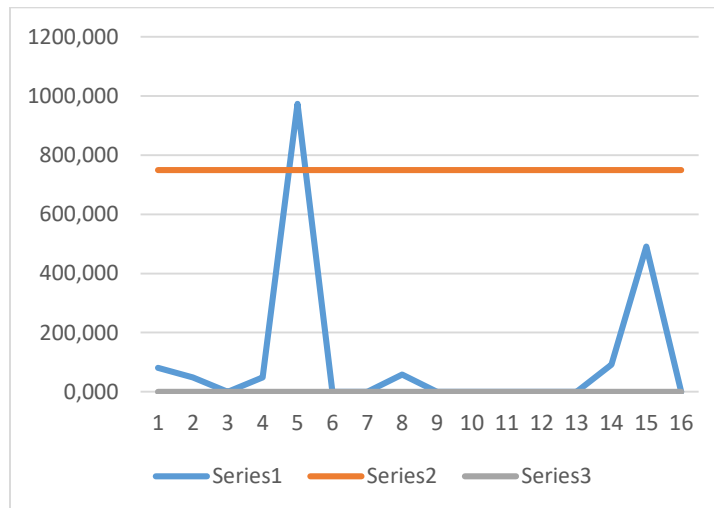
Grafikon 2. Prikaz zastupljenosti ZEA u hrani

Najviše detektovane pojedinačne razine ZEA bile su: 237,84  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u uzorku hrane za životinje i ZEA: 20,28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u uzorku hrane za ljudsku prehranu. ZEA je detektovan u 54,2% (13; od ukupno 24)

uzoraka hrane za životinje u rasponu od < 10 do 237,84  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p < 0,05$ ) i u 18,75% (tri; od ukupno 16) uzoraka hrane u rasponu od < 10 do 20,28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p > 0,05$ ) (Grafikon 1 i 2).



Grafikon 3. Prikaz zastupljenosti DON u stočnoj hrani



Grafikon 4. Prikaz zastupljenosti DON u hrani

Najviše detektovane pojedinačne razine DON bile su: 927,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u uzorku hrane za životinje i DON: 973,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  u uzorku hrane za ljudsku prehranu. DON je detektovan u 75,0% (18; od 24) uzoraka stočne hrane u rasponu od < 40 do 2927,00

$\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p>0,05$ ) i u 43,75% (sedam; od 16) uzoraka hrane za ljudsku prehranu u rasponu od <40 do 973,00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $p>0,05$ ) (Grafikon 3 i 4).



Istodobna pojava mikotoksina također je dokazana: 50,0% analiziranih uzoraka pokazalo je koegzistenciju oba mikotoksina

u uzorcima hrane za životinje i 12,5% u uzorcima hrane za ljudsku prehranu.

## DISKUSIJA

Prema istraživanju Gruber-Dorninger C i suradnika koncentracije aflatoksina B1, zearalenona, fumonizina, ohratoksina A, deoksinivalenola i T-2 toksina analizirane su u 74.821 uzoraka krme i krmnih sirovina (npr. kukuruz, pšenica, soja) prikupljenih iz 100 zemalja od 2008. do 2017. godine. Ukupno, 88% uzoraka je kontaminirano barem jednim mikotoksinom. Pojava mikotoksina pokazala je različite regionalne trendove, a klima je bila ključna odrednica koja je upravljala tim trendovima. U većini regija većina uzoraka udovoljavala je maksimalnim nivoima i vrijednostima smjernica za mikotoksine u stočnoj hrani koji je na snazi u Europskoj uniji. Međutim, 41,1%, 38,5% i 20,9% uzoraka iz Južne Azije, Subsaharske Afrike, odnosno Jugoistočne Azije, premašili su maksimalni nivo aflatoksina B1 (20 µg/kg). U nekoliko regija koncentracije mikotoksina u kukuruzu pokazale su izraženu varijaciju iz godine u godinu koja se može objasniti kišom ili temperaturom tokom osjetljivih perioda razvoja zrna. Veliki dio uzoraka (64%) bio je istovremeno kontaminiran sa  $\geq 2$  mikotoksina. Najčešće uočene smjese mikotoksina bile su kombinacije deoksinivalenola, zearalenona i fumonizina, kao i fumonizini i aflatoksin B1 (16).

Istraživanje koje je objavljeno 2019. godine, Ertelthaler T i sur. su prikazali zastupljenost mikotoksina u Južnoj Europi (uključujući i našu zemlju), gdje je naznačena velika prisutnost DON-a u 65% uzoraka pšenice,

što je u korelaciji i sličnosti sa našim istraživanjem, pri čemu je 58% iznad praga rizika. Prosječni i maksimalni nivo koncentracije bili su 611 ppb, odnosno 1.910 ppb. Područje zabrinutosti je fumonizin u kukuruzu. Prevalencija fumonizina iznosila je 88% pozitivnih uzoraka. Gotovo polovina uzoraka bila je iznad praga rizika. Prosječni i maksimalni nivo bili su 1.272 ppb, odnosno 6.934 ppb. Deoksinivalenol je pronađen u 55% ispitanih uzoraka kukuruza, a ZEN u 48% uzoraka kukuruza, što je viša koncentracija u odnosu na zastupljenosti ZEA u našem istraživanju (17).

## ZAKLJUČAK

Mikotoksini su toksični gljivični sekundarni metaboliti koji se često nalaze kao zagađivači hrane i hrane za životinje. Mikotoksigene gljive napadaju biljke na polju ili poljoprivredne proizvode tokom skladištenja. Najčešći mikotoksini su aflatoksini (npr. Aflatoksin B1; AFB1), fumonizini, zearalenon (ZEN), trihoteceni tipa B (npr. Deoksinivalenol; DON), trihoteceni tipa A (npr. Toksin T-2; T-2) i ohratoksin A (OTA). Poznato je da ovi mikotoksini vrše toksične efekte na domaće životinje, uzrokujući nevolje i smanjujući produktivnost (12). Neki mikotoksini mogu se prenijeti u stočarske proizvode, kao što su meso, jaja i mlijeko (13), čime se ugrožava sigurnost ljudskih potrošača. Da bi se spriječile negativne posljedice na životinje i potrošače, mnoge zemlje reguliraju koncentracije mikotoksina u hrani. Na primjer, u Europskoj uniji (EU) primjenjuju



se maksimalni nivoi za AFB1 (14), a vrijednosti smjernica propisane su za fumonizine, ZEN, DON i OTA (15). Koncentracije mikotoksina u hrani treba kontinuirano pratiti kako bi se podržala procjena rizika. Višestruki faktori određuju kontaminaciju poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima. Pojava mikotoksina varira među kulturama, jer se vrste i sojevi gljivica razlikuju u svojoj sposobnosti da zaraze određenog domaćina, i varira između sorti iste biljne vrste, jer sorte pokazuju različite nivoe osjetljivosti ili otpornosti na zarazu gljivicama. Uvjeti okoline, poput temperature i vlage, ugrožavaju zarazu biljaka usjevima mikotoksigenim gljivama i stvaranjem mikotoksina tim gljivama, pa su, prema tome, klima i vrijeme bitni faktori koji utiču na pojavu mikotoksina (16). Poljoprivredni procesi, vrijeme berbe i rukovanje usjevima nakon berbe utiču na stvaranje mikotoksina (17).

U odnosu na rezultate zastupljenosti mikotoksina, potrebno je uvesti redovni monitoring mikotoksina na nivou kantona/županija, entiteta i distrikta.

## LITERATURA

1. Furlan I. Određivanje mikotoksina u stočnoj hrani – kukuruz u hrani. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, 2016.
2. Marriott NG, Gravani RB. Principles of Food Sanitation, Springer, USA, 2006.
3. Katalenić, M.: Toksini Fusarium plijesni i drugi toksini (I dio), MESO: The first Croatian meat journal, 2004 Vol. VI, 31-35.
4. Sokolović M. Značaj trikotecenskih mikotokisna u hrani za perad, VI. simpozij Peradarski dani, Poreč, 2005.
5. Pepeljnjak S, Cvetnić Z, Šegvić-Klarić M. Okratoksin A i Zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlja životinja i ljudi, Krmiva, 2008 Vol. 50, 147-159.
6. Ožegović L, Pepeljnjak S. Mikotoksikoze. Školska knjiga, 1995.
7. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol. 2001.
8. Withlow LW, Diaz DE, Hopkins BA, Hagler WM. Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk. 2006.
9. Šegović Klarić M, Pepeljnjak S, Cventić Ž, Kosalec I. Comparison between ELISA TLC/HPLC methods for determination of zearalenon and ochratoxin A in food and feed. 2008, 235-244.
10. Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. Toxins 2019, 11: 375.
11. Ertelthaler T, Muller A. Mycotoxin Survey 2019: European Harvest Results at a Glance, 2019 <https://www.biomin.net/science-hub/mycotoxin-survey-2019-european-harvest-results-at-a-glance/>
12. Bryden, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. Anim. Feed Sci. Technol. 2012, 173, 134–158.





13. Becker-Algeri, T.A.; Castagnaro, D.; de Bortoli, K.; de Souza, C.; Drunkler, D.A.; Badiale-Furlong, E. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. *J. Food Sci.* 2016, 81, 544–552.
14. European Commission. Commission regulation (EU) No 574/2011 of 16 June 2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, *Ambrosia* spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto. *O. J. Eur. Union* 2011, L 159, 7–24.
15. European Commission. Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *O. J. Eur. Union* 2013, L 91, 12–15.
16. Paterson, R.R.M.; Lima, N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 2010, 43, 1902–1914.
17. Jouany, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007, 137, 342–362.



## DETECTION OF DEOXYNIVALENOL AND ZEARELENONE IN FEED AND FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

Ibrahimagić A, Hasanbašić Dž, Kovač Ć.

Department for Chemical Diagnostics, Institute for Health and Food Safety Zenica

### ABSTRACT

**Background** Mycotoxins, toxic compounds produced by fungi on raw materials, such as cereals, represent a serious health hazard. Animals and humans are exposed to them mainly through the ingestion of contaminated feed. The aim of this study was to determine the prevalence of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) in products.

**Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect deoxynivalenol and zearalenone.

**Results:** Among 40 samples (24 feed and 16 food samples) were studied for the presence of mycotoxins. The maximum individual levels found were: ZEA: 237.84 µg/kg in a sample of feed and ZEA: 20.28 µg/kg in a sample of food for human consumption, DON: 2927.00 µg/kg in a sample of feed for animals, and DON: 973.00 µg/kg in a sample of food for human consumption. ZEA was present in 54.2% (13; out of 24) of feed samples in the range of < 10 to 237.84 µg/kg ( $p < 0,05$ ) and in 18.75% (three; out of 16) of food samples in the range of < 10 to 20.28 µg/kg ( $p > 0,05$ ). DON was present in 75.0% (18; out of 24) of feed samples in the range of < 40 to 2927.00 µg/kg ( $p > 0,05$ ) and in 43.75% (seven; out of 16) of food samples in the range of < 40 to 973.00 µg/kg ( $p > 0,05$ ), respectively. The co-occurrence of mycotoxins has also been demonstrated: 50.0% of the analyzed samples presented detectable levels of both mycotoxins in feed samples and 12.5% in food samples for human consumption.

**Conclusions** Due to the fact that the distribution of mycotoxins in raw materials can change greatly from year to year with climate conditions or market globalization, regular mycotoxin monitorization in feed is needed to prevent the integration of contaminated materials in the food chain.

**Keywords:** food contamination, hygiene, microorganisms, mycotoxins

### **CORRESPONDING AUTHOR:**

*Amir Ibrahimagić, PhD Prof.*

*Institute for Health and Food Safety Zenica, BiH*

*Department for chemical diagnostics*

*Tel: +38761/614-147*

*E-mail: ibrahimagic.amir@gmail.com*

