

KOLIČINA AFLATOKSINA U HRANI ZA MLIJEČNE KRAVE I POJAVNOST AFM₁ U MLIJEKU

AFLATOXIN CONTAMINATION OF DAIRY COWS FEED COMPONENTS AND CONSEQUENT EMERGENCE OF AFM₁ IN MILK

Brigita Hengl, Andrea Gross Bošković, Marcela Šperanda

Stručni članak – Professional paper
Primljeno - Received 12. ožujak - March 2015

SAŽETAK

Mikotoksini predstavljaju značajan problem kao kontaminanti hrane za životinje i ljude. Stoga je nužno njihovo praćenje u hrani na višegodišnjoj razini, jer na njihovu pojavu prvenstveno utječu vremenske prilike i tehnologija primarne proizvodnje koju treba prilagoditi svakoj pojedinačnoj situaciji. U 2013. godini zabilježena je povećana kontaminacija kukuruza i kompletnih krmnih smjesa za mliječna goveda aflatoksinima, što je rezultiralo posljedično povećanom kontaminacijom mlijeka aflatoksinom M₁. U Republici Hrvatskoj povećana kontaminacija kukuruza aflatoksina bila je posebno izražena na području 3 županije: Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske i Brodsko-posavske, gdje su uzeta ukupno 564 uzorka kukuruza i 261 uzorak smjese za mliječna goveda. Kontaminacija pojedinačnih uzoraka kukuruza kretala se u rasponu od 0,001 do 2,07 mg/kg, a prosječna kontaminacija kukuruza s AFB₁ iznosila je 0,036 mg/kg kukuruza (dozvoljena konc. 0,02 mg/kg). Kontaminacija pojedinačnih uzoraka krmnih smjesa za mliječne krave kretala se od 0,001 do 0,254, dok je prosječna kontaminacija smjese iznosila 0,013 mg/kg (dozvoljena konc. 0,005 mg/kg). U isto vrijeme određena je koncentracija AFM₁ u mlijeku čime je u tim županijama bila obuhvaćena dnevna proizvodnja mlijeka od 76806 L koje su isporučene trima velikim mljekarama u RH. Kontaminacija mlijeka kretala se od 0,001 do 0,897 µg/kg, dok je prosječna kontaminacija mlijeka iznosila 0,06 µg/kg (dozvoljena konc. 0,05 µg/kg).

Ključne riječi: Kukuruz, kompletna krmna smjesa, mliječne krave, mlijeko, aflatoksini

UVOD

Aflatoksini su najpoznatiji i najtoksičniji mikotoksini. Prvi puta su opisani u Engleskoj 1960. godine (Prasanna i sur., 1975.; Hussein i Brasel, 2001.). Aflatoksini su metabolički produkti plijesni *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus*, i još nekih sojeva plijesni roda *Aspergillus*, koje ih sintetiziraju u polju, kao i tijekom žetve, te skladištenja i prerade žitarica, pri temperaturi između 24 i 35 °C i vlažnosti iznad 7%

(10% u ventiliranom prostoru; Williams i sur. 2004.). Prema Battilaniju (2004.) vlaga od 13% (0.78 a_w) u zrnu predisponirajući je uvjet i za rast plijesni i za proizvodnju toksina. Optimalna proizvodnja AFB₁ odvija se pri temperaturi 24-28 °C, međutim ona se odvija i na nižim temperaturama (8-10 °C), ali u znatno manjoj količini i uz potrebno dulje vrijeme (Weidenborner, 2001.). *A. flavus* sintetizira aflatoksine B₁ i B₂ na žitaricama poput kukuruza, dok *A. parasiticus* može sintetizirati aflatoksine B₁, B₂, G₁ i G₂ na

Dr. sc. Brigita Hengl, dr.med.vet., bhengl@hah.hr; Andrea Gross Bošković, dipl. ing. preh. teh. i biotekh., Hrvatska agencija za hranu, I. Gundulića 36b, 31000 Osijek; Prof. dr. sc. Marcela Šperanda, dr.med.vet., Sveučilište J. J. Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Petra Svačića 1D, 31000 Osijek

usklađeni uljaricama (Valpotić i Šerman, 2006.). Aflatoksini su termostabilni i u prirodnom stanju vezani uz proteine koji ih štite od vanjskih utjecaja (Kiermeier i Hemmerich, 1974; Marth i Dole, 1979.).

Fotosenzibilni su u slobodnom stanju i osjetljivi na alkalne i kisele otopine, topivi su u organskim otapalima (alkohol, aceton, kloroform), a gotovo netopivi u vodi (Mann, Coifer i Dollear, 1967.). Dokazana je kontaminacija žitarica, proizvoda na bazi žitarica, ali i prijenos u meso i iznutrice svinja, goveda i peradi, mlijeko i jaja (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.; Richard, 2007.; Aly Salwa i Anwer, 2009.; Husain i sur., 2010.).

Aflatoksin B₁

Aflatoksin B₁ spada među najtoksičnije mikotoksine iz skupine aflatoksina (AFB₁; Domijan i Peraica 2010.). Ciljni organ toksičnoga djelovanja AFB₁-a 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 AFB₁ može imati smrtni ishod, subletalne doze uzrokuju kronično otrovanje, a kronična izloženost nižim dozama uzrokuje maligne tumore, prvenstveno primarni karcinom jetre. AFB₁ inhibira sintezu DNA, RNA polimerazu ovisnu o DNA, sintezu glasničke RNA i sintezu proteina. Međunarodna agencija za istraživanje raka (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) ocijenila je da ima dovoljno dokaza da su aflatoksini B₁ iz prirodnih izvora karcinogeni i uvrstila ih je u 1. skupinu karcinogena (IARC 2002). Europska komisija od 2002. godine ima propisane vrijednosti za najveće dopuštene razine određenih kontaminanata u hrani za životinje, a time su obuhvaćeni i mikotoksini (aflatoksin B₁), a korištenje hrane i proizvoda za ishranu životinja, koji imaju nepoželjne tvari u količinama većim od najviših dozvoljenih, su zabranjeni. Glavni razlog propisivanja najveće dopuštene granice za AFB₁ je zaštita stanovništva od izloženosti metabolitu ovog mikotoksina koji se nalazi u mlijeku, aflatoksinu M₁. Kontrola kontaminacije AFB₁ u hrani postiže se propisnim rukovanjem i sušenjem hrane za životinje, te procesima dekontaminacije. Za hranu za životinje nije propisana zabrana miješanja kontaminirane hrane s ispravnom ili korištenje kontaminirane hrane kao komponente hrane za životinje (Uredba 2003/100/EZ

od 31. listopada 2003 koja nadopunjuje Annex I Uredbe 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje). Akutnu toksikozu u goveda prate simptomi anoreksije, depresije, zamjetnog pada proizvodnje mlijeka, gubitak tjelesne mase, letargija, ascites, žutica, grčevi, abdominalna bol (životinja pokušava udariti vlastiti trbuh), krvavi proljev, pobačaj, osjetljivost na svjetlo i krvarenje (Colvin i sur., 1984.; Cook i sur., 1986.; Ray i sur., 1986.; Eaton i Groopman, 1994.; Reagor, 1996.; Rasostits i sur., 2000.). Uz akutnu aflatoksikozu povezuje se i sljepilo, hodanje u krug, trzanje uhom, pjena na ustima, keratokonjunktivitis i prolapsus rektuma. U kroničnoj aflatoksikozi može doći do pogoršanja reproduktivne sposobnosti, abnormalnog trajanja estrusa, (prekratak ili predugačak) i pobačaja, imunosupresije i povećanja podložnosti bolestima (Cassel, Barao i Carmal, 1988.). Aflatoxin se u potpunosti izgubi iz jetre goveda 7 dana nakon povlačenja kontaminirane hrane (Helferich i sur., 1986.).

Aflatoksin M₁

Aflatoksin B₁ i B₂ se u mliječnim žlijezdama sisavaca metaboliziraju u aflatoksin M₁ i M₂, koji se mogu naći u mlijeku i mliječnim proizvodima (Knežević, 2007.; Valpotić i Šerman, 2006.). Budući da je stabilan tijekom pasterizacije i sterilizacije mlijeka i mliječnih proizvoda, izloženost relativno malim količinama AFM₁ može značajno narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mliječnih proizvoda (Cavaliere i sur., 2006.). Mikotoksin AFM₁ je IARC klasificirao u grupu 2B kao tvar s mogućim karcinogenim učinkom za ljude (IARC, 1993). Učestala prisutnost AFM₁ u mlijeku i mliječnim proizvodima, značajan unos ove vrste proizvoda, te moguća toksičnost i karcinogenost AFM₁ doveli su do uspostave najviših dozvoljenih koncentracija u mlijeku od Europske Komisije i Codex Alimentarius na razinu od 0,05 µg/kg (Codex Alimentarius Commission, 2001; European Commission Regulation, 2006.) Rezultati o stupnjevima konverzije AFB₁ iz hrane u AFM₁ u mlijeku ponešto se razlikuju, ali je utvrđeno da visoko produktivne mliječne krave puno efikasnije konvertiraju AFB₁ u AFM₁ od slabije produktivnih krava. Zanimljivo je da je na kraju laktacije koncentracija AFM₁ u mlijeku kod obje skupine krava podjednaka. To se objašnjava time što kod visoko produktivnih, unatoč većoj

konverziji, dolazi do većeg razrjeđenja zbog veće količine proizvedenoga mlijeka (Frobish i sur., 1986.; Masoero i sur., 2013.). Osim toga zapaženo je da postoje velike individualne razlike u prijenosu AFB₁ u AFM₁ među jedinkama, te da je na početku laktacije prijenos 3,3-3,5 puta veći nego kod uznapredovale laktacije i da na prijenos utječu i infekcije vimena. Tako krave, koje unesu količinu od AFB₁ nižu od 40 µg/jedinki/dnevno proizvedu mlijeko sa sadržajem AFM₁ nižim od 0,05 µg/kg. Međutim, prema podacima Hoogenboom i sur. (2001.) ukupno se od količine hranom unesenog AFB₁, sintetizira 3% AFM₁, čime je dozvoljena koncentracija od 0,02 mg/kg hrane upitna. Gallo, Moschini i Masoero (2007.) utvrdili su kako je najveća koncentracija AFM₁ u mlijeku 8 sati nakon konzumacije hrane kontaminirane s AFB₁, a ona već kod slijedeće mužnje padne za 80%, a nakon 56 sati (peta mužnja) AFM₁ se u mlijeku više nije niti detektirao.

Prema Prandiniju i sur. (2009.) na količinu AFM₁ u mlijeku ne utječu procesi prerade poput toplinske obrade kao što su pasterizacija i sterilizacija, kao ni hlađenje i zamrzavanje mlijeka ili dodavanje starter kultura koje potiču fermentaciju (npr. proizvodnja jogurta). Evaporacija, koncentracija i isušivanje mlijeka djeluju na toksin tako da on postaje osjetljiviji na O₂, svjetlost ili druge čimbenike koji ga mogu destabilizirati, te je u nekim studijama zabilježen veliki gubitak AFM₁, dok u nekima ti oblici prerade nisu utjecali na njegovu količinu. S obzirom da je AFM₁ topljiv u vodi, njegova količina u vrhnju se smanjuje, a još više u maslacu (AFM₁ ostaje u sirutki nakon proizvodnje tih proizvoda). Međutim, u mekim i tvrdim sirevima njegova se količina poveća 3-5 puta. To je vjerojatno posljedica njegovog vezanja za kazein, kojeg ostaje više u gršu nego u sirutki (Prandini i sur., 2009.).

MATERIJAL I METODE RADA

Uzorkovanje kukuruza, kompletne smjese za mliječne krave i mlijeka, provodili su veterinarski inspektori na poljoprivrednim obiteljskim gospodarstvima na području Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske i Brodsko-posavske županije, ali je u vrlo kratkom vremenu provedeno i uzorkovanje mlijeka koje su proveli sami proizvođači, takozvana samokontrola. Uzorci kukuruza, smjese i mlijeka, koje su provodile službene osobe, uzorkovani su

i analizirani u skladu s Uredbom komisije (EZ) br. 401/2006 od 23. veljače 2006. o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu razina mikotoksina u hrani. Uzorke mlijeka iz samokontrole uzimali su sami proizvođači, ali su analize rađene u skladu s navedenom Uredbom.

REZULTATI I RASPRAVA

Zbog pogodnih vremenskih uvjeta za razvoj plijesni iz roda *Aspergillus* u 2012. godini, došlo je do povećane prisutnosti mikotoksina iz grupe aflatksina (B₁, B₂, G₁, G₂), a poglavito aflatoksina B₁ (AFB₁) u kukuruзу namijenjenom za hranidbu mliječnih krava. To se odrazilo i na prisutnost AFB₁ u smjesi za mliječne krave, a posljedično i na prisutnost aflatoksina M₁ (AFM₁) u mlijeku. Kako bi se utvrdio obim problema, nadležno ministarstvo (Ministarstvo poljoprivrede) poduzelo je akciju pojačanog uzorkovanja kukuruza, kompletne smjese za mliječne krave, ali i mlijeka. Uzorkovanje je u najvećem dijelu provedeno na području Brodsko-posavske i Vukovarsko-srijemske, te Osječko-baranjske, koja se ubraja u županije s najvećom proizvodnjom mlijeka u R Hrvatskoj.

U Osječko-baranjskoj županiji uzorkovana su 274 uzorka kukuruza i 123 uzorka smjese. Kontaminacija kukuruza s AFB₁ u prosjeku je iznosila 0,099 mg/kg (od 0,001 do 1,93 mg/kg), dok je prosjek smjese iznosio 0,02 mg/kg (od 0,001 do 0,175 mg/kg). U 76 slučajeva u istom je domaćinstvu uzorkovan i kukuruz i smjesa. Za ta domaćinstva prosjek kontaminacije kukuruza bio je nešto niži i iznosio je 0,064 mg/kg (od 0,001 do 0,91 mg/kg), a smjese 0,017 mg/kg (od 0,001 do 0,05 mg/kg). Koncentracija u kukuruзу i u smjesi bila je 4 puta veća od one zakonski propisane. Ako se promatra odnos AFB₁ u kukuruзу i smjesi, on je u smjesi iznosio 4 puta manje nego u kukuruзу. Uzorci kukuruza su u 59% slučajeva bili ispod propisane najviše dozvoljene količine (NDK), dok je smjesa udovoljavala propisima u 46% slučajeva.

U Brodsko-posavskoj županiji uzorkovano je 96 uzoraka kukuruza i 49 uzoraka smjese. Kontaminacija kukuruza s AFB₁ u prosjeku je iznosila 0,026 mg/kg (od 0,001 do 0,327 mg/kg), dok je prosjek smjese iznosio 0,016 mg/kg (od 0,001 do 0,05 mg/kg). U 40 slučajeva u istom su domaćinstvu uzrokovani i kukuruz i smjesa. Za ta domaćinstva

prosjek kontaminacije kukuruza bio je niži i iznosio je 0,015 mg/kg (od 0,001 do 0,05 mg/kg), ali kontaminacija smjese je bila kao i kad su u obzir uzeti svi uzorci i iznosila je 0,016 mg/kg (od 0,001 do 0,05 mg/kg). Ako se promatra odnos AFB₁ u kukuruzu i smjesi, on je u smjesi bio 1,63 puta manji nego u kukuruzu, a i za kukuruz i smjesu 1,3 puta veći od zakonski propisanog. Uzorci kukuruza su u 71% slučajeva bili ispod propisane gornje granice, dok je smjesa u udovoljavala propisima u 43% slučajeva.

U Vukovarsko-srijemskoj županiji uzorkovana su 194 uzorka kukuruza i 97 uzoraka smjese. Kontaminacija kukuruza s AFB₁ u prosjeku je iznosila 0,087 mg/kg (od 0 do 2,07 mg/kg), dok je prosjek smjese iznosio 0,029 mg/kg (od 0,001 do 0,254 mg/kg). U 71 slučaju u istom je domaćinstvu uzorkovan i kukuruz i smjesa. Za ta domaćinstva prosjek kontaminacije kukuruza bio je niži od ukupnog prosjeka i iznosio je 0,064 mg/kg (od 0,001 do 0,854 mg/kg), dok je kontaminacija smjese bila ista kao i kad su u obzir uzeti svi uzorci i iznosila je 0,029 mg/kg (od 0,001 do 0,254 mg/kg). Koncentracija AFB₁ u kukuruzu bila je 4,4 puta, a u smjesi 5,8 puta veća od one zakonski propisane. Ako se promatra odnos AFB₁ u kukuruzu i smjesi, on je u smjesi bio 3 puta manji od AFB₁ u kukuruzu.

U mišljenju koje je EFSA izdala 2004. godine (EFSA, 2004.), prikazani su rezultati monitoringa aflatoksina u hrani za životinje u pojedinim zemljama EU. Tako se navodi kako je u Njemačkoj od 90 pojedinačnih uzoraka sastojaka hrane za životinje i 53 kompletne smjese za mliječne krave aflatoksin B₁ utvrđen u količini <0,3-3,4 μg/kg za

komponente i 0,1-1,4 μg/kg za smjesu (Blüthgen i Ubben, 2000.). U Portugalu je u 36 (od 80) uzorka utvrđena količina 0,1-16 μg/kg (Martins i Martins, 1999.). U Poljskoj je od 1975. do 1979. u 4% uzoraka kukuruza utvrđena kontaminacija AFB₁ (Juszkiewicz i Piskorska-Pliszczynska, 1992.). EFSA je zaključila kako bez obzira što se ne radi o novijim podacima o kontaminaciji, ne postoje indikacije koje bi ukazale da se situacija promijenila u novije vrijeme. Tome u prilog idu i podaci o kontaminaciji mlijeka s AFM₁ (EFSA, 2004). Pietri i Diaz (2003., u EFSA 2004.) opisali su pojavu aflatoksina B₁ u kukuruzu koji je imao porijeklo iz doline rijeke Po u Italiji. Zaključili su kako je povećanoj kontaminaciji AFB₁ doprinijela visoka temperatura, suša i velika oštećenja koja su nanijeli kukci. Posljedica se očitovala i u kontaminaciji mlijeka s AFM₁ koja je bila veća od 0,05 μg/kg (u EFSA 2004). Rezultati analiza (Tablica 1) napravljenih u RH ukazuju na mnogostruko veću kontaminaciju u odnosu na Njemačku i Portugal, kako kukuruza tako i kompletne krmne smjese za mliječne krave, i sličniji su situaciji opisanoj u dolini rijeke Po.

U Osječko-baranjskoj županiji (Tablica 2) službeno su uzorkovana 366 uzoraka mlijeka, čime je bilo obuhvaćeno 32721 L mlijeka (dnevne proizvodnje mlijeka u RH). Prosječna kontaminacija mlijeka s AFM₁ iznosila je 0,058 μg/kg. Samokontrolom je uzorkovano 408 uzoraka te se dobila prosječna vrijednost od 0,092 μg/kg. U 46% službenih i 44% uzoraka samokontrole količina AFM₁ je bila ispod onih propisanih zakonom.

Tablica 1. Prikaz koncentracija AFB₁ u kukuruzu i kompletnoj krmnoj smjesi za mliječne krave u tri Županije u RH

Kukuruz - količina AFB ₁ mg/kg					
Županija	\bar{x}	sd	x_{\min}	x_{\max}	NDK
Osječko-baranjska	0,099	0,245	0,001	1,93	0,02
Brodsko-posavska	0,026	0,054	0,001	0,327	0,02
Vukovarsko-srijemska	0,087	0,24	0	2,07	0,02
Kompletna krmna smjesa za mliječne krave – količina AFB ₁ mg/kg					
Osječko-baranjska	0,02	0,025	0,001	0,175	0,005
Brodsko-posavska	0,016	0,017	0,001	0,05	0,005
Vukovarsko-srijemska	0,026	0,042	0,001	0,254	0,005

\bar{x} =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; x_{\min} =najniža vrijednost; x_{\max} =najviša vrijednost; NDK=najviša dozvoljena koncentracija prema važećoj legislativi

Tablica 2. Prikaz koncentracija AFM₁ u mlijeku krava uzorkovanog službenim kontrolama i samokontrolama u tri županije u RH

Županija	Službena kontrola - koncentracija AFM ₁ u mlijeku $\mu\text{g}/\text{kg}$					Samokontrola - koncentracija AFM ₁ u mlijeku $\mu\text{g}/\text{kg}$					$\mu\text{g}/\text{kg}$
	L	\bar{x}	sd	x_{\min}	x_{\max}	L	\bar{x}	sd	x_{\min}	x_{\max}	NDK
Osječko-baranjska	32721	0,058	0,034	0,001	0,115	59570	0,092	0,084	0,004	0,50	0,05
Brodsko-posavska	11728	0,066	0,030	0,005	0,108	16173	0,074	0,104	0,005	0,78	0,05
Vukovarsko-srijemska	32375	0,070	0,062	0,004	0,897	42916	0,089	0,075	0,002	0,33	0,05

L=litre ukupno; \bar{x} =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; x_{\min} =najniža vrijednost; x_{\max} =najviša vrijednost; NDK=najviša dozvoljena koncentracija prema važećoj legislativi

U Brodsko-posavskoj županiji (Tablica 2) službeno je uzorkovano 94 uzorka mlijeka, čime je bilo pokriveno 11728 L mlijeka (dnevne proizvodnje mlijeka). Prosječna kontaminacija mlijeka s AFM₁ iznosila je 0,066 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Samokontrola je napravljena na 109 uzoraka te se dobila prosječna vrijednost od 0,074 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U 33% službenih i 53% uzoraka samokontrole količina AFM₁ je bila ispod onih propisanih zakonom.

U Vukovarsko-srijemskoj županiji (Tablica 2) službeno je uzorkovano 255 uzoraka mlijeka, čime je bilo pokriveno 32375 L mlijeka. Prosječna kontaminacija mlijeka s AFM₁ iznosila je 0,071 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Samokontrola je napravljena na 294 uzorka te se dobila prosječna vrijednost od 0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U 35% službenih i 43% uzoraka samokontrole količina AFM₁ je bila ispod onih propisanih zakonom.

Galvano i sur. (1998.) proveli su 1995. godine istraživanje u Italiji i utvrdili da je od 159 u 136 uzoraka mlijeka utvrđena kontaminacija s AFM₁, koja se kretala od 0,001 $\mu\text{g}/\text{L}$ do 0,109 $\mu\text{g}/\text{L}$, dok je srednja vrijednost iznosila 0,01 $\mu\text{g}/\text{L}$. Zaključili su kako unatoč rasprostranjenosti pojavi AFM₁ u mlijeku nije bilo ozbiljne opasnosti za ljudsko zdravlje. Martins i Martins (1999.) su u 101 uzorku mlijeka različitih sadržaja masti, utvrdili kako je AFM₁ prisutan čak u 83,2%, ali je svega u 2 uzorka bio u granicama iznad 0,05 $\mu\text{g}/\text{L}$, te su zaključili kako ne postoji rizik za ljudsko zdravlje. U istraživanju Çelika, Sarımehtetoğlu i Küplülü (2005.), koje je provedeno u Turskoj, od 85 uzoraka pasteriziranog mlijeka 75 uzoraka (88,23%) je bilo kontaminirano s AFM₁. Od toga 27 uzoraka (36%) ispod propisane granice od 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dok je čak 48 uzoraka (64%) prešlo tu granicu. Neke pak studije upućuju kako je kontaminacija mlijeka s AFM₁ ipak viša, i da se kreće od 0,028 do

1,012 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u nekim europskim zemljama (Galvano i sur., 1998; Martins i Martins, 2000.). Prema EFSA-inom mišljenju (2004) kojom je bilo obuhvaćano 12 zemalja članica, AFM₁ u mlijeku bio je prisutan od 3 do 56% uzoraka, ali je u svega 2% njegova koncentracija bila iznad dozvoljene. Mora se napomenuti da je u Njemačkoj, Austriji, Finskoj, Francuskoj i Švedskoj utvrđeno nepostojanje AFM₁ u 100% uzoraka. EFSA je obradila ukupno 11831 uzorak koji su uzorkovani iz tankova s mlijekom, te utvrdila da je pojava uzoraka koji prekoračuju najveću dopuštenu količinu od 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ svega 0,06%. Ipak, individualni uzorci koji dolaze s farmi mliječnih krava (ukupno 280) pokazuju puno veću pojavu AFM₁ iznad dozvoljene granice, čak u 1,8% slučajeva. Ova činjenica ide u prilog i našim rezultatima prema kojima pojedinačni uzorci u nekim slučajevima, čak u 67% slučajeva prelaze dozvoljenu granicu, dok su prosječne vrijednosti kontaminacije mlijeka od 14 do 29% veće od dozvoljenih za službeno uzorkovanje i 33-44% veće kod samokontrola.

Prema grupiranju proizvođača s obzirom na dnevnu proizvodnju mlijeka, u Osječko-baranjskoj (Slika 1) i Vukovarsko-srijemskoj (Slika 3) županiji bilo je najviše mlijeka koje prelazi dozvoljenu granicu AFM₁ među najmanjim proizvođačima (do 50 L dnevno), a kako se povećava proizvodnja tako se smanjuje količina litara mlijeka koja prelaze dozvoljenu granicu. U Brodsko-posavskoj županiji bilo je najviše mlijeka koje prelazi dozvoljenu granicu AFM₁ među najmanjim proizvođačima (do 50 L dnevno), ali je u ostalim kategorijama bio podjednak omjer mlijeka koje ne prelazi i prelazi granicu (prosječno 2,66 puta manje je mlijeka ispod NDK; Slika 2). Osim toga, manji broj proizvođača proizvodio je veću količinu mlijeka, što bi moglo biti smjernica pripadnicima poljoprivrednih savjetodavnih službi,

da u godinama kada vremenske prilike ukazuju na mogućnost pojave aflatoksina u kukuruзу, prvenstveno savjetodavno djeluju prema većim proizvođačima, kako bi smanjili količinu kontaminiranoga mlijeka.

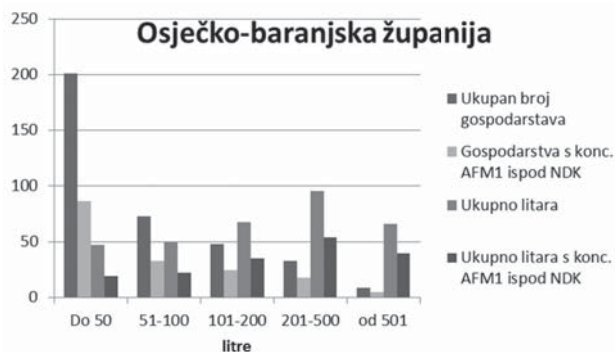
ZAKLJUČCI

Specifični vremenski uvjeti (dugotrajna suša i visoke temperature) obilježili su žetvu kukuruza na kojem su napravljene analize na aflatoksin, a pojava plijesni, odnosno mikotoksina, uvelike, ako ne i najviše, ovisi o vremenskim uvjetima. Stoga je nužno pratiti pojavu aflatoksina kroz dulje vremensko razdoblje (minimalno 3 godine prema preporuci EFSA-e), jer praćenjem samo jedne godine mogu se dobiti lažno niski ili lažno visoki (u našem slučaju) rezultati kontaminacije. Ipak prosječne vrijednosti analiziranog mlijeka iznosile su u Osječko-baranjskoj županiji 0,058 $\mu\text{g}/\text{kg}$, u Brodsko-posavskoj 0,066 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a u Vukovarsko-srijemskoj 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, te iako povećane, ne predstavljaju veliko odstupanje od 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, najveće zakonski propisane granice.

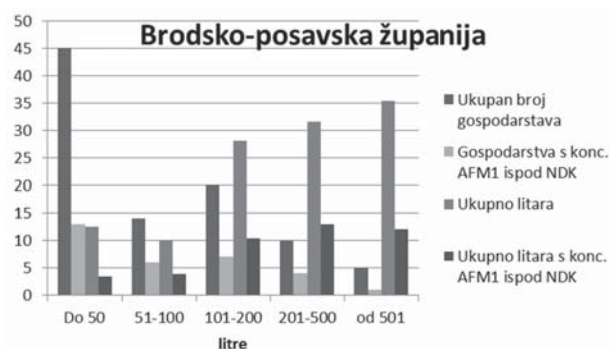
U sve tri županije bilo je najviše proizvođača mlijeka s proizvodnjom do 50 L dnevno (kojih ima najviše) s povećanom kontaminacijom AFM₁. Proizvođači koji imaju veću dnevnu proizvodnju imaju i veći interes za pripremu hrane za mliječne krave u skladu s dobrom poljoprivrednom praksom.

S obzirom na rezultate kontaminacije koje smo dobili u kukuruзу, smjesi i mlijeku, kao posljedica vremenskih uvjeta u sezoni uzgoja kukuruza, ostaje otvoreno pitanje može li se kontaminacija kukuruza smanjiti/spriječiti agrotehničkim mjerama, već od trenutka sijanja kukuruza. Naime u istom zemljopisnom području, uz iste vremenske uvjeta, dio proizvođača uspio je ostvariti prihvatljive kontaminacije aflatoksina, kako kukuruza i hrane za mliječne krave, tako i mlijeka, dok dio proizvođača to nije uspio. Kako se ovaj rad nije bavio dobrom poljoprivrednom praksom na gospodarstvima, možemo samo pretpostaviti, da je moguće da su napravljeni određeni propusti samih proizvođača bilo u sjetvi, proizvodnji i/ili skladištenju kukuruza, koji su doprinijeli tako lošim rezultatima tj. visokoj kontaminaciji kukuruza s AFB₁. Stoga nije loše ponoviti neke od mjera kojima se može utjecati na količinu mikotoksina u hrani za životinje (Prandini i sur., 2009.):

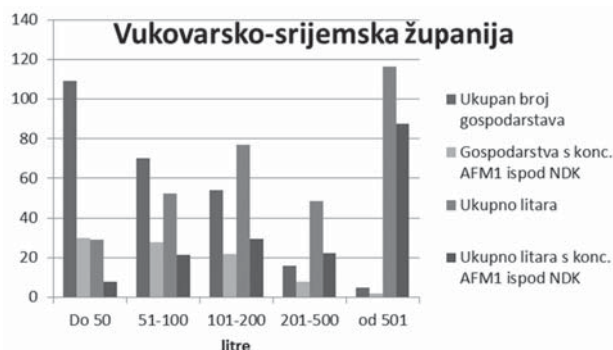
- Za proizvodnju kukuruzne silaže preporuča se izbjegavati žetvu u razdoblju visokih temperatura, što se postiže pravilnim izborom hibrida kukuruza koji kasnije dozrijevaju;



Slika 1. Prikaz količina kontaminiranog mlijeka prema veličini dnevne proizvodnje mlijeka u Osječko-baranjskoj županiji



Slika 2. Prikaz količina kontaminiranog mlijeka prema veličini dnevne proizvodnje mlijeka u Brodsko-posavskoj županiji



Slika 3. Prikaz količina kontaminiranog mlijeka prema veličini dnevne proizvodnje mlijeka u Vukovarsko-srijemskoj županiji

- Gnojivo koje se koristi u polju mora imati dobro izbalansiran N (280–320 kg/ha), P₂O₅ i K₂O. Dodavanje visoke stope dušika kod neizbalansirane gnojidbe dovodi do jakog vegetativnog razvoja i „omekšavanja“ biljke. U tim je slučajevima usjev osjetljiviji na insekte i navale plijesni koje posljedično proizvode aflatoksine;
- Tretirati usjeve u polju s insekticidima koji djeluju na kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis*). Moljci su prijenosnici spora gljivica, a zrna koja ošteti moljac podložnija su rastu plijesni i proizvodnji mikotoksina;
- Kod pripreme silaže osigurati relativno visok sadržaj vlage i smanjiti veličinu sječke (rezati je na komadiće do 1,5 cm);
- Za smanjivanje kontaminacije zrna kukuruza najbolje je osigurati dobru pripremu tla za sjetvu i pridržavati se odgovarajućeg plodoreda;
- Rizik oštećenja zrna, a time i posljedično proizvodnju aflatoksina, moguće je smanjiti berbom kukuruza kod vlage od 24%, dok bi se praksa ostavljanja usjeva do kasnih zimskih ili proljetnih mjeseci trebala u potpunosti izbjegavati;
- Prije procesa sušenja, treba provesti čišćenje zrna (pomoću sita i ventilacije; korištenjem jednostavnih i cjenovno prihvatljivih mehaničkih načina čišćenja može se postići smanjenje toksina do 200%);
- U vremenu do 3 mjeseca pohrane, vlaga u zrnu može biti do 14%, ali za dulje vrijeme skladištenja ne smije prijeći 12%;
- Nakon pražnjenja silosa obratiti posebnu pozornost temeljitom čišćenju silosa te provesti djelotvornu fumigaciju, dezinfekciju i deratizaciju;
- U slučaju manjeg povećanja količine AFM₁ u mlijeku od 0,05 µg/kg, mogu se u hranu za mliječna goveda dodavati adsorbensi;
- Hrana kontaminirana aflatoksinima može se pomiješati sa sijenom, sjenažom ili čitavim žitaricama (koje ne sadrže mikotoksine);
- Treba izbjegavati sekundarnu tvorbu plijesni i održavati boksove s hranom;
- Stalno paziti na higijenu pohrane hrane za životinje, kako se razina aflatoksina ne bi povećavala.

LITERATURA

1. Aly Salwa, A. i Anwer, W. (2009): Effect of Naturally Contaminated Feed with Aflatoxins on Performance of Laying Hens and the Carryover of Aflatoxin B1 Residues in Table Eggs Pakistan Journal of Nutrition. 8: 181-186.
2. Battilani, P. (2004): Ferite alle cariossidi e umidita` favoriscono i funghi aflatosigeni L'Informatore Agrario. 14, 47.
3. Blüthgen, A. i Ubben, E.H. (2000): Survey of the contamination of feeds and tank bulk milk with aflatoxins B1 and M1 Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 52, 335-354.
4. Cassel, E.K., Barao, S.M. i Carmal, D.K. (1988): "Aflatoxicosis and ruminants." Texas Vet. Med. Diagnostic lab, Texas collage. The national dairy database (1992) NDB, Health, Test, Hf100200. TxT.
5. Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A. (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk- Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources Journal of Chromatography A. 1101: 69 – 78.
6. Çelik, T.H., Sarımehtemoglu, B., Küplülü, Ö. (2005): Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. Veterinarski arhiv. 75 (1), 57-65.
7. Codex Alimentarius Commission. Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk. (2001) Codex committee on food additives and contaminants 33rd session. The Netherlands: Hague.
8. Colvin, B.M., Harrison, L.R., Grosser, H.S. i Hall, R.F. (1984): Aflatoxicosis in feeder cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 184: 956.
9. Cook, W.O., Richard, J.L., Osweiler, G.D. i Trampel, D.W. (1986): Clinical and pathological changes in acute bovine aflatoxicosis: Rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. Am. J. Vet. Res. 47: 1817-1825.
10. Domijan A.M., Peraica M. (2010): Carcinogenic mycotoxins U: Charlene A. McQueen, Carcinogens, Vol 14. Elsevier, Oxford Academic Press, 125-137.
11. Eaton, D.L. i Groopman, J.D. (1994): The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary and agricultural significance Pp. 6-8 Academic press, San Diego, Ca.

12. EFSA European Food Safety Authority: 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 (2004) EFSA Journal 39:1-27.
13. European Commission Regulation. (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. (2006) Official Journal of the European Union. OJ L 364, p. 5.
14. Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. i Hairston, H. (1986): Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grains J. Food. Prot., 49: 731.
15. Gallo, A., Moschini, M. i Masoero, F. (2008): Aflatoxins absorption in the gastro-intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows Ital.J.Anim.Sci. 7, 53-63.
16. Galvano, F., Galofaro, V., De Angelis, A., Galvano, M., Bognanno, M., Galvano, G. (1998): Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy J. Food Protect. 61, 738-741.
17. Helferich, W.G., Garret, W.N., Hsieh, D.P. i Baldwin, R.L. (1986): Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins J. Anim. Sci. 62: 691.
18. Hoogenboom L.A., Tulliez J., Gautier J.P., Coker R.D., Melcion J.P., Nagler M.J., Polman T.H., Delort-Laval J. (2001): Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. Food Additives & Contaminants. 18 (1):47-58.
19. Husain, Z., Khan, M. Z., Khan, I., Javed, M., Saleemi, K., Mahmood, S., Asi M. R. (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels Food and Chemical Toxicology 48: 3304-3307.
20. Hussein, S. H. i Brasel, J. M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals Toxicology 167: 101-134.
21. Hutjens, M. (1983): Aflatoxin contaminated feed and dairy U: J. Jacobsen, Aflatoxin 83. Texas Vet. Med. Diagnostic lab., Texas collage. The National Dairy Database (1992) NDB/ Feeding/ Text/ FA10004000-TXT.
22. IARC, International Agency for Research on Cancer: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins (1993) IARC Monographs on the Evaluation of Cracinogenic Risks to Humans, Vol. 56., Lyon.
23. IARC, International Agency for Research on Cancer: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene (2002) IARC Monographs on the Evaluation of Cracinogenic Risks to Humans, Vol 82., Lyon.
24. Juszkievicz, T. i Piskorska-Pliszczynska, J. (1992): Occurrence of mycotoxins in animal feeds Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 11, 211-215.
25. Kiermeier, F. i Hemmerich, K. (1974): Influence of light on watery aflatoxin B1 solutions Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 155: 81-84.
26. Knežević, Z. (2007): Kontaminacija hrane organskim štetnim tvarima Hrvatski časopis za javno zdravstvo, 9 (3).
27. Mann, G., Coifer, L. i Dollear, F. (1967): Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals J. Agric. Food. Chem. 15: 1090-1092.
28. Marth, E. i Dole, M. (1979): Update on molds: degradation of aflatoxin Food tehnol. 33: 81-87.
29. Martins, L.M. i Martins, H.M. (1999): Natural and in vivo co-production of cyclopiazonic acid and aflatoxins J. Food Protection. 62, 292-294.
30. Martins, M. L. i Martins, H. M. (2000): Aflatoxin M1 in raw and ultra high temperature treated milk commercialised in Portugal Food Addit. Contam. 17, 871-874.
31. Masoero, F., Gallo, A., Moschini, M., Piva, G., and Diaz, D. (2007): Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts (2013) Animal, 1:9, 1344–1350.
32. Ožegović, L. i Pepeljnjak, S. (1995): Mikotoksikoze Školska knjiga, Zagreb.
33. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products Food and Chemical Toxicology. 47; 984–991.
34. Prasanna, H., Gupta, S., Viswanathan, L., Venkita-subramanian, T. (1975): Fluorescence changes of aflatoxin B1 and G1 Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 159: 319-322.
35. Rasostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C. i Hinchcliff, K.W. (2000): Veterinary medicine. Pp. 1684-1688. W.B. Saunders Co. Ltd., London.
36. Ray, A.C., Abbitt, B., Cotter, S.R., Murphy, M.J., Reagor, J.C., Robinson, R.M., West, J.E. i Whitford, H.W. (1986): Bovine abortion and death associated with consumption of aflatoxin contaminated peanuts. J. Am. Vet. Med. Assoc., 184: 956.
37. Reagor, J.C. (1996): Implications of mycotoxins in horses WEVR, 96, Cybersteed, Ine.
38. Richard, J. L. (2007): Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview International Journal of Food Microbiology 119: 3 – 10.
39. Valpotić, H. i Šerman, V. (2006): Utjecaj mikotoksina na zdravlje i proizvodnost svinja Krmiva 48: 33-42.

40. Weidenborner, M. (2001): Encyclopedia of food mycotoxins Springer Publisher Berlin, New York, London.
41. 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.*

ABSTRACT

Mycotoxins are one of the important contaminants of animal feed and food. Therefore, it is necessary to monitor their concentration in feed on several years basis, because their incidence is primarily affected by weather conditions and technology of primary production which must be adapted to any particular situation. Increased aflatoxin (AF) contamination of corn and feed mixture for dairy cows was recorded in 2013, which resulted in subsequent increased contamination of milk with aflatoxin M₁. In Croatia, special attention is devoted to monitoring aflatoxin in three counties (Osijek-Baranja, Vukovar-Srijem and Brod-Posavina County) where a total of 564 corn samples and 261 sample mixtures for dairy cows were taken. Contamination of the individual samples of corn ranged from 0.001 to 2.07 mg/kg, and the average contamination value of maize with AFB₁ was 0.036 mg/kg (allowed conc. 0.02 mg / kg). Contamination of the feed mixture for dairy cows samples ranged from 0.001 to 0.254 mg/kg, while the average contamination value of mixture was 0.013 mg/kg (allowed conc. 0.005 mg/kg). At the same time the analysis of aflatoxin M₁ in milk was made which covered the daily milk production in these counties of 76806 litres of milk in three largest dairies in Croatia. Contamination of milk ranged from 0.001 to 0.897 µg/kg, while the average contamination value of milk was 0.06 µg/kg (allowed conc. 0.05 µg/kg).

Key words: Corn, feed mixture, dairy cattle, milk, aflatoxins