

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/14



## ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1.Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1101
<b>Naslov projekta</b>	Raziskava okuženosti/onesnaženosti žit, izdelkov iz žit in silaže s plesnimi in mikotoksini ter ukrepi za njuno zmanjšanje
<b>Vodja projekta</b>	7811 Gabrijela Tavčar Kalcher
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	1.01.01 Vsebnosti mikotoksinov v žitih in izdelkih iz žit ter silaži
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	2227
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	10.2011 - 09.2014
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	197 Mlinotest Živilska industrija d.d. 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta 1027 Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije 3333 NACIONALNI INŠTITUT ZA JAVNO ZDRAVJE
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava 4.03.01 Kmetijske rastline
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	08. Kmetijstvo
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	4 Kmetijske vede 4.05 Druge kmetijske vede

#### 2.Sofinancerji

Sofinancerji					
1.	<table border="1"> <tr> <td>Naziv</td> <td>Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano</td> </tr> <tr> <td>Naslov</td> <td>Dunajska 22, Ljubljana</td> </tr> </table>	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano	Naslov	Dunajska 22, Ljubljana
Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano				
Naslov	Dunajska 22, Ljubljana				

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### 3. Povzetek raziskovalnega projekta<sup>1</sup>

SLO

Mikotoksini so sekundarni presnovki različnih plesni, ki pri ljudeh in živalih po zaužitju povzročijo zastrupitev (mikotoksikoze). Plesni, ki rastejo na žitih, lahko začnejo izločati mikotoksine pred žetvijo, po njej ali pa kasneje med neprimernim skladiščenjem. Najbolj razširjene plesni, ki proizvajajo mikotoksine so *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. in *Penicillium* spp. Pogosto jih najdemo v koruzi in drugih žitih, ki se uporabljajo v prehrani ljudi in živali.

Slovensko kmetijstvo je živinorejsko usmerjeno, zato na njivah pretežno gojimo rastline, ki so namenjene živalski krmi (koruza, žita ...). Ugotovljeno je bilo, da v Sloveniji tako koruzo kot pšenico najbolj pogosto okužujejo skoraj identične plesni iz rodu *Fusarium*, kar omogoča njihovo ohranjanje v ozkem kolobarju koruza-žita in posledično večjo gospodarsko škodo. Prevladujoči glivni vrsti iz rodu *Fusarium* tako pri koruzi kot žitih v Sloveniji sta *F. graminearum* in *F. avenaceum*, ki tvorita pomembne mikotoksine: deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenon (ZEA) in fumonizine (FB). Kot tretja pomembna vrsta se pri koruzi pojavlja *F. subglutinans* (FB) pri pšenici pa *F. culmorum* (DON, ZEA).

Strokovnjaki po vsem svetu razvijajo na plesni odporne vrste rastlin in različne fungicide, vendar do danes še ne poznamo nobene zares učinkovite zaščitne metode. Izvajamo lahko samo preventivne ukrepe, ki vključujejo ustrezno poljedelsko prakso, zadostno sušenje pridelka po žetvi in dobro skladiščno prakso. Zaradi vsega navedenega je kontrola mikotoksinov v prehranski verigi ljudi in živali upravičena in potrebna. V EU so zato bili sprejeti predpisi o najvišjih še sprejemljivih vsebnostih določenih mikotoksinov v hrani za ljudi in v proizvodih, namenjenih za krmo. Varnost izdelkov se tako zagotavlja s sistematičnimi postopki, ki zajamejo vse pridelovalne in predelovalne faze od zaščite rastlin med rastjo do predelave in kontrole končnih izdelkov.

Čeprav je dobro znano, da je vsako leto precejšen del proizvedenih žit kontaminiran z mikotoksini, pa se kontaminaciji silaž s toksičnimi presnovki plesni ne posveča dovolj pozornosti. V prehrani govedi zelo pogosto opazimo krmljenje s pokvarjeno oziroma plesnivo silažo. Zadnja leta opisujejo, da je silaža najbolj pogosto kontaminirana s plesnijo *Penicillium roqueforti* in s toksini, ki jih omenjena plesen proizvaja.

Z namenom celovitega obvladovanja in vzpostavitve ukrepov za omejevanje mikotoksinov v žitih, izdelkih iz žit in silaže smo se za projekt povezale štiri inštitucije, ki se pri svojem delu redno ukvarjamo s problematiko okuženosti žit s plesnimi in/ali mikotoksini v krmi in hrani: Veterinarska fakulteta, Biotehniška fakulteta, Nacionalni inštitut za javno zdravje in Mlinotest, d.o.o. S povezavo dosedanje prakse, teorije, načrtovanih poskusov, razvojem novih laboratorijskih metod in tehnoloških postopkov ter izboljšavo obstoječih bomo lahko predlagali celovite rešitve obvladovanja plesni in mikotoksinov v celotni prehranski verigi.

ANG

Mycotoxins are secondary metabolites of various moulds, which cause poisoning (mycotoxicosis) in humans and animals after ingestion. Moulds growing on grains can start to produce mycotoxins before harvest, after harvest or later during improper storage. The most common moulds that produce mycotoxins are *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. They are often found in maize and cereals used for human or animal consumption.

Slovenian agriculture is livestock-oriented therefore on our fields mostly plants intended for animal feed (maize, wheat, etc.) are grown. It was found out that in Slovenia, both maize and wheat are most frequently infected with almost identical fungus *Fusarium*, which is allowed by a narrow rotation of maize/cereals. The result is considerable economic damage. Predominant fungal species of *Fusarium* in maize and in cereals in Slovenia are *F. graminearum* and *F. avenaceum*, which produce important mycotoxins: deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins. As the third important type, the *F. subglutinans* (FB) appears in maize and *F. culmorum* (deoxynivalenol, zearalenone) in wheat.

Mould-resistant species of plants and various fungicides are being developed around the world, but to date no really effective protective methods are known. Only preventive measures can be provided, including appropriate crop practices, adequate drying of the crop after harvest and good storage practice.

From the information given above, it is clear that the control on mycotoxins in the human and animal food chain is justified and necessary. In the EU, regulations on the highest tolerable concentrations of various mycotoxins in human food and products intended for feed were adopted. For ensuring the products safety, systematic procedures covering all cultivating and processing phases from protection of plants during growth to processing and control of final products must be implemented.

Although it is well known, that a considerable part of produced cereals is contaminated

with mycotoxins, very little attention is paid to the contamination of silage with toxic metabolites of moulds. Cattle are often fed with spoiled or mouldy silage. In recent years, silage is most frequently contaminated with the mould *Penicillium roqueforti* and with toxins produced by this mould.

In order to establish comprehensive management and measures for the reduction of the incidence of mycotoxins in cereals, products derived from cereals and silages, four institutions dealing with a problem of contamination of cereals with fungi and/or with mycotoxins in feed and food were joined together: Veterinary Faculty, Biotechnical Faculty, National Institute for Public Health and Mlinotest, d.o.o. By combining the existing experiences, theory, planned experiments, development of new laboratory methods and technologies as well as with the improvement of the existing ones, comprehensive solutions for managing moulds and mycotoxins in the whole food chain can be proposed.

#### 4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>2</sup>

Program dela:

1. Analiza stanja okuženosti/onesnaženosti žit iz primarne proizvodnje v Sloveniji in izdelkov iz žit s plesnimi in mikotoksini.
2. Razvoj metode za določanje izbranih mikotoksinov in analiza vzorcev silaž, zbranih na slovenskih kmetijah.
3. S poskusi na poljih ugotoviti odpornost različnih hibridov koruze na okužbo s fuzariozami.
4. Oceniti stopnjo kontaminiranosti živil na slovenskem trgu z mikotoksini.
5. Na osnovi empiričnih testov v tehnoloških postopkih v mlinsko predelovalni industriji bodo podani možni načini ukrepanja za doseganje manjše verjetnosti pojavljanja ostankov v izdelkih, namenjenih potrošniku.
6. Izdelava smernic za prihodnost Slovenije.

Raziskovalne hipoteze:

1. Onesnaženost žit in izdelkov iz žit v Sloveniji se ne razlikuje bistveno od onesnaženosti v drugih državah EU.
2. Vzorci koruznih silaž so bolj onesnaženi z mikotoksini kot vzorci travnih silaž.
3. Onesnaženost vzorcev pšenice in koruze je odvisna od lokacije in načina pridelave.
4. Sprememba koncentracije DON med skladiščenjem je odvisna od atmosfere, v kateri skladiščimo. Koncentracija mikotoksinov je različna v različnih frakcijah mletja oziroma plasteh zrnja.

Zbrali smo podatke o vsebnosti ohratoksina A (OTA), FB, DON, ZEA in T-2/HT-2 toksinov v 290 vzorcih žit in izdelkov iz žit, ki so bili analizirani v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008-2012. 40% vzorcev je vsebovalo enega ali več mikotoksinov, pri 2,4% je bila presežena najvišja dovoljena vsebnost. Zaradi relativno visokega deleža pozitivnih vzorcev, neskladnosti, povprečnih koncentracij pozitivnih vzorcev in velike porabe pšenice in pšeničnih izdelkov ter zaradi relativno visokih koncentracij mikotoksinov v pozitivnih vzorcih koruznih izdelkov, ocenjujemo, da pšenični in koruzni izdelki izmed vseh žit in žitnih izdelkov največ prispevajo k izpostavljenosti slovenskega prebivalstva mikotoksinom. Delež pozitivnih in neskladnih rezultatov je bil največji pri DON. Najbolj pogosta kombinacija mikotoksinov v vzorcih je bila DON-ZON v pšenici, DON-T-2/HT-2 v ovsu in FB-DON in FB-DON-ZON v koruzi. Najpogosteje so se mikotoksini pojavljali v žitih integrirane pridelave, redkeje v žitih organske, najredkeje pa v žitih konvencionalne pridelave. Rezultati ne odstopajo od podobnih rezultatov iz drugih članic EU in ne povzročajo večjih skrbi za zdravje potrošnikov zaradi izpostavljenosti mikotoksinom preko žit in žitnih izdelkov. Kljub temu bo kontrola mikotoksinov v žitnih izdelkih na slovenskem trgu potrebna tudi v prihodnosti. Koristno bi bilo pridobiti več podatkov za integrirane in ekološke žitne izdelke, s čimer bi lahko našli vzroke za potencialno višjo vsebnost mikotoksinov v teh izdelkih v primerjavi s konvencionalnimi in jih odpravili.

Uvedli smo analizni postopek za določanje mikotoksinov z uporabo LC-MS/MS. V vzorcih travne in koruzne silaže, odvzetih s slovenskih kmetij v letih 2011-2014 smo določili mikotoksine, ki se razvijajo na poljih in v skladiščih žit (OTA, FB, ZEA, trihoteceni) in tiste, ki se razvijajo med siliranjem (rokefortin C, mikofenolna in penicilinska kislina). Mikotoksine smo iz vzorcev ekstrahirali z mešanico acetonitrila in vode ter jih določili z LC-MS/MS.

Aflatoksinov, patulina in PR-toksina nismo določali. Aflatoksinova nismo vključili, ker smo na osnovi začetnih rezultatov ter rezultatov analiz iz preteklih let ocenili, da onesnaženost z njimi ni kritična. Patulina nam z vsemi tehnikami, ki so na voljo, ni uspelo določiti. Standarda PR-toksina nam ni uspelo dobiti. Namesto omenjenih treh toksinov smo v silažah določili gliotoksin ter tenuazojsko in ciklopiazonsko kislino.

Z opisanim analiznim postopkom smo analizirali 120 vzorcev travnih in koruznih silaž. V

vseh koruznih in v štirih travnih silažah smo ugotovili DON. Koncentracije v koruznih silažah so bile 0,07–5,83 mg/kg, v travnih pa 0,07–0,87 mg/kg. Poleg tega so bili v koruznih silažah pogosteje prisotni še FB, ZEA, 15-acetil DON in 3-acetil DON ter tenuazojnska, penicilna in mikofenolna kislina, medtem ko so se ostali toksini, tudi rokefortin C, pojavljali v posameznih vzorcih. V travni silaži sta se poleg DON pogosteje pojavljali penicilna in mikofenolna kislina.

Analizirali smo tudi silaže, ki smo jih pripravili iz petih različnih sort umetno okužene koruze na dveh lokacijah. Vzorce za analizo smo odvzeli pred siliranjem in čez pol leta. Vsebnosti DON so se v vseh analiziranih vzorcih v pol leta občutno povečale.

Po metodi, ki jo predpisuje ISTA, smo ugotavljali okuženost zrn pšenice in koruze. Leta 2012 in 2013 so bile v povprečju sorte pšenice, ki so rastle v Jablah, mnogo bolj okužene s fuzariozami, medtem ko leta 2014 med lokacijama ni bilo bistvene razlike. Tako je bila okuženost zrn s fuzariozami v Jablah v posameznih letih 2012–14 12,9%, 13,9% in 2,2%, medtem ko je bila okuženost vzorcev pšenice iz Rakičana v istih letih 5,1%, 5,2% in 2,3%. Vrsta sestava fuzarioz in njihov delež med okuženimi zrnji se je spreminjal med lokacijami in med leti. Povprečna okuženost zrn pšenice iz ekološke pridelave je bila v letih 2012–13 izrazito manjša kot okuženost integrirano pridelane. Skupna okuženost s fuzariozami je bila leta 2012 v povprečju 3%, leta 2013 pa 2,2%.

Skupni povprečni delež vrst *F. graminearum* in *F. culmorum*, ki sta potencialni tvorki DON, je bil v sezonah 2012–14 v okuženih zrnih sort pšenice iz Jablah 10%, 4,9% in 1,7%, v Rakičanu pa 2%, 2,4% in 1,1%. Povprečni delež okuženosti zrn iz ekološke pridelave s prej omenjenima glivama je bil 1,9% (2012) in 1,2% (2013).

Povprečna vsebnost DON v zrnju se med leti 2012–13 ni, ali vsaj ne bistveno, spremenila. V Rakičanu je bila v obeh letih 120 µg/kg, v Jablah pa leta 2012 747 µg/kg, leta 2013 pa 785 µg/kg. V zrnju iz ekološke pridelave je bila povprečna vsebnost 299 µg/kg (2012) in 234 µg/kg (2013).

Na obeh lokacijah smo v razvojni fazi BBCH 71-75 (vodena do srednja mlečna zrelost) nabrali trikrat po 30 klasov posamezne sorte pšenice in vizualno ocenili okuženost klasov in izračunali povprečno poljsko okuženost posamezne sorte s fuzariozami. V Jablah je bila okuženost klasov 2,2% (2012) in 1,8% (2013), v Rakičanu pa 1,95% (2012) in 1,4% (2013). Če te rezultate primerjamo z rezultati ugotavljanja okuženosti zrn v laboratoriju, ugotovimo, da poljska ocena okuženosti podceni dejansko končno okuženost zrn.

Podatke, pridobljene v letih 2012–13 na obeh lokacijah (vključenih 19 sort), smo statistično obdelali z ANOVA in ugotovili:

- med sezonama ni statističnih razlik v povprečni vsebnosti DON v zrnju pšenice
- v povprečju obeh let se vsebnosti DON v Jablah in Rakičanu statično razlikujeta (699 in 130 µg/kg)
- vse sorte, vključene v raziskavo, imajo v dvoletnem povprečju višje vsebnosti DON v Jablah kot v Rakičanu. Razlika med lokacijama je statistično značilna le pri sortah Alixan, Ketchum, Lord, Lukullus in SY Moisson
- po deležu okuženih klasov ni statistično značilnih razlik med lokacijami, sezonami in posameznimi sortami
- v Jablah je z glivami iz rodu *Fusarium* v povprečju okuženih 11,9%, v Rakičanu pa 5,0% zrn
- v povprečni okuženosti zrn z vsemi fuzariozami v obeh letih med sortami ni statistično značilnih razlik
- skupna količina padavin med cvetenjem pšenice nima vpliva na okuženost z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, potencialnima tvorkama DON
- v Jablah je bila povprečna okuženost zrnja z omenjenima glivama 5,6%, v Rakičanu pa 2,2%
- povezava med okuženostjo pšenice (izraženo v deležih) z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* ter vsebnostjo DON (kor. koeficient=0,71,  $R^2=50,7\%$ ) je linearna:  $DON=0,0439+7,782 \times DFgFc$  ( $DFgFc$  je v deležih od 0,0 do 1).

Povprečna okuženost zrn koruze s fuzariozami je bila leta 2012 na obeh lokacijah za približno  $\frac{2}{3}$  manjša kot leta 2013. V Jablah je dosegla 7,4%, v Rakičanu pa 9,5%, medtem ko je bila leta 2014 20,9% oziroma 27,4%. V Rakičanu je leta 2013 izstopala okuženost z glivo *F. poae*, s katero je bilo okuženih kar 14,6% zrn. V Rakičanu je bilo v obeh letih tudi več okužb z glivo *F. subglutinans* (6,3 oz. 4,1%) kot v Jablah (0,6 oz. 2%). Nobena od omenjenih gliv ni potencialna tvorka DON. Čeprav je bila povprečna skupna okuženost s fuzariozami obe leti v

Rakičanu večja kot v Jablah, se to ni odrazilo v vsebnosti DON, saj je bila koruza v Rakičanu mnogo manj okužena z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, potencialnima tvorkama DON, kot pa v Jablah. Povprečna okuženost z omenjenima glivama je bila v Jablah 5,1% (2012) in 11,7% (2013), v Rakičanu pa 1,3% (2012) in 2,9% (2013). Vsebnosti DON je bila v Jablah 788 µg/kg (2012) in 987 µg/kg (2013), v Rakičanu pa 130 µg/kg (2012) in 160 µg/kg (2013).

V juliju 2012 in 2013 smo na obeh lokacijah umetno okužili stebela in storže petih izbranih hibridov koruze (BC 416, P9494, Flovita, Futurixx in PR37N01) v fenofazi BBCH 61-69 z izolati *Fusarium* spp. Pred spravlom smo ugotavljali odpornost teh hibridov na fuzarioze. Ugotovili smo, da so vsi hibridi zelo dovzetni za okužbo stebela, saj je bila ocena okužbe pri vseh obravnavanjih zelo visoka. Izjema je bil hibrid BC 416 leta 2013 v Rakičanu, kar pa je bila najbrž posledica prisilnega dozorevanja zaradi katastrofalne suše. Manj dovzetni za okužbo so bili storži, vendar so ocene okužbe storžev med hibridi, lokacijami in leti variirale, tako da se ne more izpostaviti hibrida s konstantno nizko okužbo storžev glede na obravnavanja.

Izvedli smo poskus enoletnega skladiščenja koruze, kontaminirane z DON, v atmosferi N<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> v treh desetlitrskih plastičnih vedrih s pokrovom. Pred pričetkom skladiščenja smo z enakomernim prhanjem in homogenizacijo dodali toliko vode, da je končna vlažnost znašala 15%, kar je nekoliko nad optimalno vlažnostjo za dolgotrajno skladiščenje. V prvem poskusu smo iz vedra izpodrinili zrak z uvajanjem N<sub>2</sub>, v drugem pa z uvajanjem CO<sub>2</sub>; tretji poskus je služil kot primerjava. Določili smo količino DON pred in po koncu skladiščenja. Začetna koncentracija je znašala 3,4 mg/kg, končna koncentracija pa 3,7 mg/kg pri poskusu v navadni atmosferi in 3,3 mg/kg pri poskusih v atmosferi N<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>. Ugotovili smo, da sprememba količine DON pri 15% vlažnosti zrnja ni povezana z načinom skladiščenja in ni statistično značilna.

Izvedli smo poskus s frakcioniranjem plasti pšenice – stopenjskim mletjem z izločanjem zunanjih plasti. Znano je, da je koncentracija mikotoksinov v perifernih delih zrnja in kalčku večja. Poskušali ugotoviti, koliko je mogoče zmanjšati koncentracijo mikotoksinov v frakcijah mletja za humano uporabo. S poskusi mletja na industrijskem mlinu Sangati smo ugotovili, da se koncentracija DON v frakciji moke zmanjša za povprečno 17%, če izločimo 25% zunanjih delov zrnja (otrobov) in za 24%, če izločimo 35% zunanjih delov zrnja, to je otrobov in mok višjega tipa meljave. V obeh frakcijah zunanjih delov zrnja se koncentracija DON poveča. Najmanjša koncentracija DON je bila dosežena v frakciji iz sredine zrnja, to je zdrobu tipa 400.

Poskus čiščenja žitne mešanice pred mletjem je bil izveden na elektronskem separatorju, ki se ga pred uporabo kalibrira tako, da se določi tipičen videz neoporečnega in oporečnega zrnja. Ker je z zunanjim videzom težko eksaktno definirati z glivo poškodovana zrnja, naprava ni sposobna povsem ločiti zdravih od nezdravih zrn. V poskusih se je pokazalo, da naprava izloči preveč zrn. S hitrimi testom vsebnosti DON je bilo ugotovljeno, da je vsebnost DON mogoče zmanjšati za 80%.

Raziskali smo možnosti za znižanje vsebnosti DON v polnozrnatih mlevskih izdelkih, pripravljenih iz surovin, ki so vsebovale znatno količino DON. Testni izdelek je bil kruh, uporabili smo različne postopke podaljšane fermentacije testa z uporabo kislih mikrobnih bakterijskih starterjev in posušenih kvasnih celic. Za pripravo kruha smo uporabili pšenico, ki smo ji dodali koruzno moko, kontaminirano z DON. Preizkusili smo 24-urno fermentacijo v hladilniku in na sobni temperaturi. Z enim od kislih nastavkov nam je uspelo v kruhu, pripravljenem iz kontaminirane moke, koncentracijo DON zmanjšati za 20%.

## 5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Aktivnosti smo izvedli v skladu s podrobnim programom dela. Program smo v celoti realizirali, zastavljeni cilji so bili doseženi:

Zbrali smo podatke o vsebnosti mikotoksinov v 290 vzorcih žit in izdelkov iz žit, ki so bili analizirani v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008-2012.

Uvedli smo analizni postopek za določanje mikotoksinov z uporabo LC-MS/MS in analizirali 120 vzorcev travne in koruzne silaže, odvzetih s slovenskih kmetij v letih 2011-2014.

Ocenili smo okuženost pšenice in koruze na poskusnih posestvih Jable in Rakičan s fuzariozami in onesnaženost z DON v letih 2012-2014.

Ocenili smo stopnjo kontaminiranosti živil na slovenskem trgu z mikotoksini.

S poskusom enoletnega skladiščenja koruze, kontaminirane z DON, smo pokazali, da sprememba količine DON (pri 15 % vlažnosti zrnja) ni odvisna od atmosfere skladiščenja. Ugotovili smo, da s čiščenjem žitne mešanice pred mletjem vsebnost DON lahko zmanjšamo za 80%.

## 6.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>4</sup>

NP

## 7.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	3173349	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Mikotoksini v žitih in izdelkih iz žit v Sloveniji – uradni nadzor živil v letih 2008-2012
		ANG	Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia - official control of foods in the years 2008-2012
	Opis	SLO	Zbrani so bili podatki o vsebnosti mikotoksinov v 290 vzorcih žit in izdelkov iz žit, ki so bili analizirani v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012. 40% vzorcev je vsebovalo enega ali več mikotoksinov, pri 2,4% je bila presežena najvišja dovoljena vsebnost. Zaradi relativno visokega deleža pozitivnih vzorcev, neskladnosti, povprečnih koncentracij pozitivnih vzorcev in velike porabe pšenice in pšeničnih izdelkov ter zaradi relativno visokih koncentracij mikotoksinov v pozitivnih vzorcih koruznih izdelkov, ocenjujemo, da pšenični in koruzni izdelki izmed vseh žit in žitnih izdelkov največ prispevajo k izpostavljenosti slovenskega prebivalstva mikotoksinom. Delež pozitivnih in neskladnih rezultatov je bil največji pri DON. Najbolj pogosta kombinacija mikotoksinov v vzorcih je bila DON-ZON v pšenici, DON-T-2/HT-2 v ovsu in FB-DON in FB-DON-ZON v koruzi. Raziskava ne kaže ekstremnih odstopanj od podobnih rezultatov iz drugih članic EU.
		ANG	In the study, 290 different cereals and cereal products, sampled on Slovenian market under official control in the years 2008–2012, were investigated on the presence of mycotoxins. Altogether 40% of cereal samples contained one or more mycotoxins and 2.4% of them exceeded European Union maximum levels with one or more mycotoxins. Among all cereal foods, wheat and maize products could contribute most to the exposure of Slovenian inhabitants to mycotoxins, because of their relative high contamination rate, high share of samples exceeding EU maximum levels and by far the highest consumption, compared to other cereals. The highest incidence of positive and non-compliant results was with DON. The most frequently co-occurred mycotoxin combinations were DON-ZON in wheat, DON-T-2/HT-2 in oat and FB-DON and FB-DON-ZON in maize products. Concerning the incidence of non-compliant results there is no extreme differences from other EU results.
	Objavljeno v	Butterworth Scientific; Food control; 2015; Vol. 50; str. 157-165; Impact Factor: 2.819;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.54; A': 1; WoS: JY; Avtorji / Authors: Kirinčič Stanislava, Škrjanc Barbara, Kos Nataša, Kozolc Brigita, Pirnat Nina, Tavčar-Kalcher Gabrijela	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	3506298	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Metoda z uporabo masne kromatografije z masno spektrometrijo za določanje mikotoksinov iz skupine trihotecenov v žitih
			A method using gas chromatography - mass spectrometry for the detection

		ANG	of mycotoxins from trichothecene groups A and B in grains
	Opis	SLO	Opisana je validacija analiznega postopka za določanje trihotecenov z uporabo plinske kromatografije z masno spektrometrijo. Podani so parametri metode – meja zanave, meja določanja, ponovljivost, obnovljivost, izkoristek ter merilna negotovost rezultata. Prikazani so rezultati analiz vzorcev žit v letih 2007-2009. Od 175 vzorcev jih je 74,3% vsebovalo vsaj enega od trihotecenov. Najpogosteje se je pojavljal DON, ki je bil prisoten v 70% vzorcev.
		ANG	A validation of an analytical procedure for the determination of trichothecenes using gas chromatography-mass spectrometry was presented. Parameters of the procedure – the limit of detection, limit of quantification, repeatability, reproducibility, recovery and the measurement uncertainty were given. The results of the analysis of grain samples in the years 2007-2009 were presented. Of 175 samples, 74.3% contained at least one trichothecene. Most often, DON was present (in 70% of samples).
	Objavljeno v		Intech; Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications; 2012; Str. 225-244; A': 1; Avtorji / Authors: Jakovac-Strajn Breda, Tavčar-Kalcher Gabrijela
	Tipologija		1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji
3.	COBISS ID		3864186 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Analizni postopki za določanje aflatoksina B1 v jajcih kokoši nesnic z uporabo imunoafinitetnih kolon in tekočinske kromatografije s pokolonsko derivatizacijo in fluorescenčno detekcijo
		ANG	Analytical procedures for the determination of aflatoxin B1 in eggs of laying hens using immunoaffinity columns and liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection
	Opis	SLO	Opisana je validacija analiznega postopka za določanje aflatoksina B1 v jajcih kokoši nesnic v dveh laboratorijih. Postopek je sestavljen iz ekstrakcije toksina iz vzorca, čiščenja ekstrakta z uporabo imunoafinitetnih kolon in določanja s tekočinsko kromatografijo s pokolonsko derivatizacijo z bromom in fluorescenčno detekcijo. Parametri, dobljeni v prvem (LOD 2 ng/kg, LOQ 6 ng/kg, RSDR 11%, izkoristek 70%) in v drugem laboratoriju (LOD 2 ng/kg, LOQ 5 ng/kg, RSDr 20%, izkoristek 67%) potrjujejo, da sta obe različici postopka primerni za določanje aflatoksina B1 v jajcih kokoši nesnic.
		ANG	The validation of analytical procedure for the determination of aflatoxin B1 in eggs of laying hens was presented. The procedure consisted of the extraction of the analyte from the sample, immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography with postcolumn bromination and fluorescence detection. The parameters obtained in the first (LOD 2 ng/kg, LOQ 6 ng/kg, RSDR 11%, izkoristek 70%) and in the second laboratory (LOD 2 ng/kg, LOQ 5 ng/kg, RSDr 20%, izkoristek 67%) indicate that both versions of the procedure are suitable for the determination of aflatoxin B1 in eggs of laying hens.
	Objavljeno v		Springer; Food analytical methods; 2014; Vol. 7, issue 9; str. 1917-1924; Impact Factor: 1.802; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.54; A': 1; WoS: JY; Avtorji / Authors: Pavšič Vrtač Katarina, Ojanperä Suvi, Apajalahti Juha, Šrmpf Karin, Tavčar-Kalcher Gabrijela
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID		7542393 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vpliv okoljskih dejavnikov na okužbo žit z glivami Fusarium spp. in tvorbo mikotoksinov – pregledni članek



		ANG	The impact of environmental factors on the infection of cereals with <i>Fusarium</i> species and mycotoxin production
Opis		SLO	Številne fitopatogene glive rodu <i>Fusarium</i> , ki povzročajo plesnivost klasov žit in koruznih storžev, je sposobnih v okuženih zrnih akumulirati številne mikotoksine, med katerimi so nekateri škodljivi za zdravje ljudi in živali. Žita prvenstveno okužujejo vrste <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. avenaceum</i> in <i>Microdochium nivale</i> , medtem ko koruzo <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> in <i>F. subglutinans</i> . V pregledu je poudarek na vplivu vremenskih dejavnikov (temperatura, vlaga in padavine) na rast, razmnoževanje, preživetje, tekmovalno sposobnost, mikotoksičnost in patogenost <i>Fusarium</i> vrst, običajno izoliranih iz pšenice, ječmena in koruze.
		ANG	Several phytopathogenic <i>Fusarium</i> species occurring worldwide on cereals as causal agents of 'head blight' (scab) of small grain cereals and 'ear rot' of maize, are capable of accumulating, in infected kernels, several mycotoxins some of which of notable impact to human and animal health. <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. avenaceum</i> and <i>Microdochium nivale</i> predominantly cause <i>Fusarium</i> diseases of small-grain cereals. Maize is predominantly attacked by <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> and <i>F. subglutinans</i> . The review is focused on the influence of climatic variables, particularly temperature, humidity and rainfall on growth, reproduction, survival, competitive ability, mycotoxicity and pathogenicity of <i>Fusarium</i> fungi commonly isolated from wheat, barley and maize.
Objavljeno v	Biotehniška fakulteta; Acta agriculturae Slovenica; 2013; Letn. 101, št. 1; str. 105-116; Avtorji / Authors: Popovski Sasho, Celar Franci Aco		
Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek		
5.	COBISS ID	6869881	Vir: COBISS.SI
Naslov		SLO	Vpliv fungicidov in drugih pripravkov za razkuževanje semena ter načinov pridelave na okuženost semena ozimne pšenice ( <i>Triticum aestivum</i> L. emend. Fioriet Paol.)
		ANG	Impact of fungicides and other preparations for seed treatment and different cultivation techniques on seed contamination of winter wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L. emend. Fiori et Paol.)
Opis		SLO	Namen raziskave je bilo ugotoviti kako razkuževanje semena pšenice z različnimi pripravki vpliva na okuženost pridelanega zrnja v poljskih poskusih na Biotehniški fakulteti in kontaminacijo vzorcev pšenice pridelane v konvencionalni in ekološki pridelavi. Tretiranje semena z fungicidi ima večji vpliv na zdravstveni status pridelane pšenice kot pripravki, ki so dovoljeni v ekološki pridelavi.
		ANG	The aim of the study was to determine the impact of pre-sowing seed treatment on wheat seed infection and contamination of produced grains from the field trial at the Biotechnical faculty (BF) and contamination of crop samples from Slovene farms with conventional and organic type of production. Seed treatment with fungicides had a greater influence on improving the health status of produced grain, compared to the preparations allowed in organic farming.
Objavljeno v	Biotehniška fakulteta; Acta agriculturae Slovenica; 2011; Letn. 97, št. 3; str. 267-273; Avtorji / Authors: Šantavec Igor, Kocjan Ačko Darja		
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek		

### 8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

--	--



Družbeno-ekonomski dosežek			
1.	COBISS ID	7424889	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Tolerantnost nekaterih novih Lj- križancev koruze na glivo Fusarium subglutinans in njihove kombinacijske sposobnosti
		<i>ANG</i>	Tolerance of some new Lj- maize hybrids to Fusarium subglutinans and their combining ability
	Opis	<i>SLO</i>	Namen raziskave je bil proučiti tolerantnost nekaterih novih Lj- križancev koruze na glivo Fusarium subglutinans (FS), vzgojenih iz linij, hranjenih v genski banki koruze na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani ter kombinacijsko sposobnost za tolerantnost starševskih linij. Poskus je bil postavljen po metodiki slučajnega bloka na poskusnem polju Biotehniške fakultete v Jablah pri Trzinu v letih 2011 in 2012. Z glivo FS smo umetno okužili 5 naključno izbranih storžev na vsaki parcelici. Za umetno okužbo smo uporabili glivo F. subglutinans, ki smo jo izolirali iz storžev naravno okužene koruze iz predhodnega leta. Ob zrelosti smo ocenjevali okuženost po lestvici od 1 (ni okužbe) do 7 (močna okužba). V obeh letih smo ugotovili statistično značilne razlike med novimi križanci v tolerantnosti na FS ter za splošno kombinacijsko sposobnost (SKS) materininih linij. Za SKS testerjev (očetne linije) smo signifikantne razlike dobili samo v letu 2012, za specifično kombinacijsko sposobnost (PKS) pa le v 2011. Med materinimi linijami sta imeli najboljšo SKS liniji P10 in P6, med očetnimi linijami pa P15, ki se v letu 2012 značilno loči od ostalih očetnih linij. V križancih z najboljšo PKS ni nujno, da so linije z najboljšo SKS; medtem ko se v štirih od petih najbolj tolerantnih križancih glede na ocene okuženosti kot starševska linija nahaja P15.
		<i>ANG</i>	The aim of our investigation was to determine tolerance of some new Lj-maize hybrids to Fusarium subglutinans (FS). Fifty new F1 hybrids were developed using the scheme of incomplete diallel, and involved 15 inbreds (P1–P10 as female and P12–P16 as male parents). The material was maintained in the maize gene bank of the Biotechnical Faculty in Ljubljana. The field trial was conducted on the experimental station of the Biotechnical Faculty at Jable near Ljubljana in 2011 and 2012. The inoculation by the fungus took place in the middle 5 randomly chosen ears, on each plot, 7-10 days after pollination. The disease assessment was performed during the harvest time according to the ranking scale from 1 to 7. In both years, significant differences in tolerance to FS were determined for hybrids and for general combining ability (GCA) of female lines. Regarding testers (male parents) significant differences in GCA were determined only in 2012, while significant differences for specific combining ability (SCA) were established only in 2011. P10 and P6 (as female parents) and P15 (as a male parent) had the highest value of GCA. The hybrids with the highest value of SCA did not always include the inbreds with the highest value of GCA. However, four out of five hybrids, with the best score of tolerance to FS, include the inbred P15. In our investigation some inbreds showed different response to the existing growing conditions in association with the scored tolerance to FS.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Slovensko agronomsko društvo; Novi izzivi v agronomiji 2013; 2013; Str. 296-303; Avtorji / Authors: Rozman Ludvik, Celar Franci Aco	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
2.	COBISS ID	3224293	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Škodljivost mikotoksinov v živilih, s poudarkom na žitih in žitnih izdelkih
		<i>ANG</i>	Harmfulness of mycotoxines in foods with an emphasis on cereals and cereal products

Opis	SLO	Prisotnost mikotoksinov v živilih lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi. Predstavljene so nekatere značilnosti mikotoksinov, ki se pogosto pojavljajo v živilih, s poudarkom na njihovih škodljivih vplivih na zdravje ljudi. Obravnavani mikotoksini so: aflatoksini, ohratoksin A, fumonizina B1 in B2, deoksinivalenol, zearalenon in toksina T-2/HT-2. Žita predstavljajo najpomembnejši vir hrane v mnogih deželah, zato ima lahko prisotnost mikotoksinov v tovrstnih izdelkih velik vpliv na izpostavljenost potrošnikov mikotoksinom. V Evropski uniji je z namenom varovanja zdravja ljudi uzakonjen uradni nadzor mikotoksinov v živilih. Odgovornost za zagotavljanje skladnosti živil na tržišču z živilsko zakonodajo, vključno z mikotoksini, imajo nosilci živilske dejavnosti. Glede na rezultate uradnega nadzora, pšenica in pšenični izdelki lahko prispevajo med vsemi žitnimi izdelki največ k izpostavljenosti slovenskih prebivalcev mikotoksinom.	
	ANG	The presence of mycotoxins in foods can pose a risk to human health. Some characteristics of mycotoxins, which are common in foods, are presented with emphasis on their harmful influence on human health. These mycotoxins are: aflatoxins (AF), ochratoxin A (OTA), fumonisins B1 and B2 (FB), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON) and T-2/HT-2 toxins. Cereals represent the most important source of food in many countries therefore the presence of mycotoxins in those products could contribute most to the exposure of consumers to mycotoxins. In order to protect human safety, official controls of mycotoxins in foodstuffs are set down in European Union legislation. The responsibility for insuring that the food products placed on the market are in compliance with food safety legislation, including mycotoxins, is of food businesses. According to results of official control, among all cereal foods, wheat products could contribute most to the exposure of Slovenian inhabitants to mycotoxins.	
Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)		
Objavljeno v	Biotehniški izobraževalni center = Biotechnical Educational Center; Trendi in izzivi v živilstvu, prehrani, gostinstvu in turizmu; 2014; Str. 26-33; Avtorji / Authors: Kirinčič Stanislava, Švab Ajda		
Tipologija	1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci		
3.	COBISS ID	3562618	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Aflatoksini v vzorcih slovenskega mleka in krme	
	ANG	Aflatoxins in Slovene milk and feed samples	
Opis	SLO	Predstavili smo rezultate analize vzorcev slovenske krme in mleka, v katerih je bila koncentracija aflatoksinov prvič nad mejami, navedenimi v zakonodaji. Za določanje aflatoksina B1 in M1 smo uporabili analizna postopka, ki obsegata čiščenje vzorcev na imunoafinitetnih kolonah in določanje s tekočinsko kromatografijo s fluorescenčno detekcijo. Preiskali smo 243 vzorcev mleka in 53 vzorcev krme. Najvišja dovoljena koncentracija aflatoksina M1 v mleku je bila presežena v 23 vzorcih, najvišja dovoljena koncentracija aflatoksina B1 v krmi pa v 20 vzorcih.	
	ANG	The results of analyses, where for the first time the Slovene feed and milk samples contained aflatoxins in the concentrations above limits given in the legislation were presented. For the determination of aflatoxin B1 and M1, the procedures consisting of sample immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography were used. 243 milk samples and 53 feed samples were investigated. The maximum level for aflatoxin M1 in consumable milk given in the legislation was exceeded in 23 samples. Among 53 different feed samples analysed, 20 samples contained aflatoxin B1 in concentrations higher than maximum permitted levels.	
Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci		

	Objavljeno v	Veterinary Faculty; 15th Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology [also] 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology, 3rd-7th July, 2012, Ljubljana, Slovenia; 2012; Str. 174; Avtorji / Authors: Jakovac-Strajn Breda, Tavčar-Kalcher Gabrijela, Ujčič Vrhovnik Igor, Pavšič Vrtač Katarina, Fon Tacer Klementina, Vengušt Anton	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
4.	COBISS ID	3687802	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Določanje mikotoksinov v travni in koruzni silaži
		ANG	Određivanje mikotoksina u travnoj i kukuruznoj silaži
	Opis	SLO	V Slovenji manjka podatkov o onesnaženosti silaž z mikotoksini, zato smo v raziskavi preiskali vzorce travne in koruzne silaže. Izvedli smo organoleptično preiskavo in z masno kromatografijo določili vsebnost nižjih maščobnih kislin. 48% travne in 76% koruzne silaže smo ocenili kot zelo dobre. V vzorcih so prevladovale plesni <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> in <i>Fusarium</i> . V vzorcih smo določili tudi aflatoksin B1, deoksinivalenol (DON), zearalenon, penicilinsko kislino, mikofenolno kislino, ciklopiazonsko kislino, fumonizina B1 in B2, ohratoksin A, tenuazojsko kislino, rokefortin C, toksina HT-2 in T-2, gliotoksin in neosolaniol. V 52% vzorcev silaž smo odkrili mikotoksin DON, sledili so mu zearalenon in penicilinska kislina (39 %). Mikofenolno kislino smo zaznali v 36% silaž. Aflatoksin B1 je bil prisoten v štirih travnih silažah. Gliotoksina, T-2 toksina, neosolaniola in ciklopiazonske kisline nismo našli v nobenem vzorcu.
		ANG	In Slovenia, there is deficiency of data on the presence of mycotoxins in silage; therefore the samples of grass and maize silage were examined. The organoleptic assessment was performed and the content of lower fatty acid in silages samples was established with the method of gas chromatography. As very good, 48% of grass and 76% of maize silage were evaluated. In the samples the growth of <i>Penicillium</i> mould has been dominating, followed by the genera <i>Aspergillus</i> and <i>Fusarium</i> . The samples were examined also on the presence of aflatoxin B1, deoxynivalenol (DON), zearalenone, penicillic acid, mycophenolic acid, cyclopiazonic acid, fumonisin B1 and B2, ochratoxin A, tenuazoic acid, roquefortine C, HT-2 and T-2 toxin, gliotoxin, and neosolaniol. In 52% of all silage samples, the mycotoxin DON was detected, followed with zearalenone and penicillic acid (39 %). Mycophenolic acid was determined in 36% of all silages. Aflatoxin B1 was present in four grass silages. Gliotoxin, T-2 toxin, neosolaniol and cyclopiazonic acid were not found in any of the samples.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Krmiva; Krmiva 2013; 2013; Str. 31; Avtorji / Authors: Jakovac-Strajn Breda, Šrimpf Karin, Ujčič Vrhovnik Igor, Tavčar-Kalcher Gabrijela	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
5.	COBISS ID		Vir: vpis v poročilo
	Naslov	SLO	Javna predstavitev rezultatov CRP V4-1101
		ANG	Public presentation of the results of the CRP V4-1101
	Opis	SLO	Predstavili smo rezultate in ugotovitve raziskav v okviru CRP v4-1101. Predstavili smo podatke o vsebnosti mikotoksinov v 290 vzorcih žit in izdelkov iz žit, ki so bili analizirani v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008-2012, analizni postopek za določanje mikotoksinov z uporabo LC-MS/MS in rezultate analiz 120 vzorcev travne in koruzne silaže, odvzetih s slovenskih kmetij v letih 2011-2014, oceno okuženosti pšenice in koruze na poskusnih posestvih Jable in Rakičan s fuzariozami in onesnaženost z DON v letih 2012-2014 ter rezultate poskusov in ukrepe v mlinsko

		predelovalni industriji za zmanjšanje vsebnosti DON.
	ANG	The results and findings of the research in CRP v4-1101 were presented. Data on the levels of mycotoxins in 290 samples of cereals and cereal products analysed in the framework of the Slovenian official controls in 2008-2012 were presented, the analytical procedure for the determination of mycotoxins using LC -MS / MS, the results of analyses of 120 samples of grass and corn silage taken from Slovenian farms in the years 2011-2014 and the estimation of fusariosis infection rate of wheat and maize from experimental farms Jable and Rakičan and DON contamination in 2012-2014 as well as the results of tests and measures the mill processing industry to reduce the levels of DON were shown.
Šifra	F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
Objavljeno v		Raziskava okuženosti/onesnaženosti žit, izdelkov iz žit in silaže s plesnimi in mikotoksini ter ukrepi za njuno zmanjšanje : vsebinsko poročilo o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na projektu CRP V4-1101, 2014. Str. 105; Avtorji Tavčar-Kalcher Gabrijela, Jakovac-Strajn Breda, Kirinčič Stanislava, Celar Franci Aco, Kos Katarina, Šantavec Igor, Ačko Darja Kocjan, Kovač Boris, Rijavec-Bregar Andreja
Tipologija	2.12	Končno poročilo o rezultatih raziskav

### 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>2</sup>

KIRINČIČ S, ŠKRJANC B. Chemical food safety in Slovenia: foods of plant origin predominantly 2007-2009. V: PLAZAR N, BABNIK K, MEULENBERG CJW (ur.). Javno zdravje v 21. stoletju : program : mednarodni posvet, 15.-16.9.2011, Izola, Visoka šola za zdravstvo, str 47

KIRINČIČ S, LAPAJNE V. Poročilo o izvajanju posameznih nalog, povezanih z uradnim nadzorom, ki ga izvaja inšpektorat za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano za leto 2011. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2012. 8 str

KOVAČ B. Izzivi in uspehi na področju biotehnologije v pekarstvu. V: Konferenca ob 20-letnici Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil: Biotehnologija in mikrobiologija za znanje in napredek. P. Raspor, M. Paš (ur.). Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 27.-28.9.2012, str 295

JAKOVAC-STRAJN B, ŠRIMPF K, ROJKO A, TAVČAR-KALCHER G. Dokazovanje mikotoksinov v silažah = Detection of mycotoxins in silage. V: ČEH T (ur.). Zbornik predavanj : Zdravec-Erjavec Days 2012, Radenci, Nov 8-9, 2012, Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod, str 55

ŠANTAVEC I. Določitev optimalnega roka setve ozimnega ječmena = Determination of optimum sowing date for winter barley. V: ČEH B (ur.), DOLNIČAR P (ur.), MIHELICH R (ur.). Novi izzivi v agronomiji 2013 : zbornik simpozijev Zreče, 24.-25.1.2013, Slovensko agronomsko društvo, str 148

ROZMAN L, KOS K. Kombinacijske sposobnosti Lj-linij koruze in tolerantnost njihovih križancev na glivo Fusarium subglutinans = Combining ability and tolerance of Lj-maize genotypes to Fusarium subglutinans. V: TRDAN S (ur.). Izvlečki referatov. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2013, str 61

KOČILA P, JAKOVAC-STRAJN B. Mikotoksini u proizvodnji stočne hrane. V: Zbornik sažetaka 58. seminara biljne zaštite, Opatija, 11.-14.2.2014, ISSN 1332-9545. Zagreb: Hrvatsko društvo biljne zaštite, 2014, br. 1/2, str 36

### 10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>3</sup>

**10.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>**

SLO

Mikotoksini so eno od najpogostejših onesnaževal živil in krme, zato se jim pri zagotavljanju varne hrane posveča velika pozornost. Ker se plesni, ki jih proizvajajo, pojavljajo povsod, jih je nemogoče popolnoma odstraniti iz prehranske verige. Zato je potreben stalen nadzor in aktivnosti, s katerimi mikotoksine v surovinah, krmi in živilih zmanjšamo na najmanjšo možno mero. Čeprav raziskave ter izboljšave in ukrepi na področju mikotoksinov potekajo že desetletja, je problematika še vedno aktualna. Pomembna je tako zaradi pojavljanja oz. odkrivanja vedno novih mikotoksinov, kot tudi zaradi klimatskih sprememb, ki so povzročile, da se tudi v našem podnebnem pasu, kjer v preteklosti mikotoksini niso predstavljali posebnega problema, v zadnjih letih pojavljajo čedalje pogosteje in v čedalje višjih koncentracijah. Z izvedenimi raziskavami smo dobili vpogled v stanje glede plesni in mikotoksinov po celotni prehranski verigi v Sloveniji, kar predstavlja doprinos k poznavanju problema in razširjenosti plesni in mikotoksinov po svetu in omogoča natančnejše ocene tveganja.

ANG

Mycotoxins are one of the most common contaminants of food and feed, therefore within food safety great attention is paid to them. Since moulds are present everywhere, mycotoxins cannot be removed from the food chain completely. Therefore, constant monitoring and activities to reduce mycotoxins in raw materials, food and feed to a minimum are necessary. While research, improvements and measures in the field of mycotoxins have been carried out for decades already, the issue is still relevant. It is important due to emerging or newly detected mycotoxins as well as due to climatic changes which caused that even in our climate zone, where mycotoxins did not represent a particular problem in the past, they appear more and more frequently and in higher and higher concentrations. With these studies, we got an insight into the situation regarding moulds and mycotoxins throughout the food chain in Slovenia, which represents a contribution to the knowledge of the problem and the prevalence of moulds and mycotoxins in the world and enables a more accurate risk assessment.

**10.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>**

SLO

Z izvedenimi raziskavami smo dobili vpogled v stanje mikotoksinov po celotni prehranski verigi v Sloveniji. Na osnovi zbranih rezultatov analiz živil smo ocenili stopnjo onesnaženosti živil na slovenskem tržišču z mikotoksini v primerjavi z drugimi državami. S poskusi na poljih smo proučili odpornost različnih hibridov koruze na okužbo s plesnimi iz rodu *Fusarium*, prisotnost mikotoksinov pred in po siliranju koruze, umetno okužene z izolati *Fusarium* spp, prisotnost mikotoksinov v ekološko pridelani pšenici in vpliv kolobarja, načina obdelave in drugih agrotehničnih ukrepov na pojavnost fuzarioz. Razvoj in uporaba metode za sočasno določanje mikotoksinov nam omogoča vpogled v prisotnost in približno koncentracijo velikega števila toksinov v vzorcih. Omogoča nam tudi določanje toksinov, ki jih do sedaj nismo spremljali in vpogled v stanje onesnaženosti silaž z mikotoksini. Razvoj metode je pomeni velik doprinos za Slovenijo, zato bi jo bilo smiselno uporabljati v različne namene. Na področju varnosti krme in s tem živil živalskega izvora bi jo lahko uporabljali vsi, ki upravljajo s krmo ali surovinami zanjo. S poskusi v mlinsko predelovalni industriji smo ugotovili, kakšni so vplivi mletja in skladiščenja žita na vsebnost toksinov, kakšna je razporeditev toksinov v različnih frakcijah mletja in vpliv postopkov priprave polnozrnatega testa na vsebnost toksinov v končnem proizvodu. S povezavo dosedanje prakse, teorije in izsledkov poskusov, izvedenih v okviru raziskave, smo predlagali celovite rešitve obvladovanja plesni in mikotoksinov v celotni prehranski verigi.

ANG

With the study, we got an insight into the state of mycotoxins throughout the food chain in Slovenia. Based on the collected results of analyses of food, the degree of contamination of foodstuffs on the Slovenian market with the mycotoxins in comparison with other countries was assessed. In the field experiments, the resistance of different maize hybrids to infection with fungi of the genus *Fusarium*, the presence of mycotoxins before and after ensiling of maize artificially infected with *Fusarium* spp, the presence of mycotoxins in organically produced wheat, the impact of crop rotation, the method of processing and other agro-technical measures on the incidence of fusariosis were studied. Development and application of an analytical method for the simultaneous determination of mycotoxins enables an insight into the

presence and approximate concentration of a large number of toxins in samples. It enabled the determination of mycotoxins that were not monitored so far and insight into the state of pollution of silages with mycotoxins. The introduction of the method represents an important contribution, so it would be reasonable to use it for different purposes. In the area of feed and subsequently food of animal origin safety it could be used by everyone who deals with feed or raw materials for it. Experiments in the mill processing industry revealed the effects of milling and storage of grain on the levels of mycotoxins, the distribution of toxins in different milling fractions and the impact of a method whole wheat dough preparation on the toxin content in the final product. By connecting the current practice, theory and results of experiments carried out in the study, a comprehensive solution for the control of moulds and mycotoxins in the food chain were suggested.

## 11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

### 11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

**Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?**<sup>11</sup>

Pridelovalci in uporabniki krme

### 11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

**Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>12</sup>

Bilateralni projekt BI-RS/12-13-041 Ugotavljanje nekaterih onesnaževalcev okolja, ki imajo v prehranski verigi pomembno vlogo pri zagotavljanju varne in kvalitetne hrane. Nosilec: dr. Breda Jakovac-Strajn in Dragan Miličević

**Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:**<sup>13</sup>

JAKOVAC-STRAJN, Breda, MILIČEVIĆ, Dragan, JURŠIČ-CIZERL, Rahela, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela, PAVŠIČ VRTAČ, Katarina, ZORMAN-ROJS, Olga, POGAČNIK, Milan, ŠVARA, Tanja. Evaluation of feed and histopathological lesions of some organs of laying hens-possible implication on meat quality. V: International 57th Meat Industry Conference, Belgrade, 10th-12th June, 2013. LILIĆ, Slobodan (ur.), ĐORĐEVIĆ, Vesna (ur.). Meat and meat products - perspectives of sustainable production : Proceedings. Belgrade: Institute of Meat Hygiene and Technology, 2013, str. 184-188. [COBISS.SI-ID 3702906].

## 12. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>14</sup>

### 12.1. Izjemni znanstveni dosežek

NP

### 12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

NP

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza v Ljubljani, Veterinarska  
fakulteta

Gabrijela Tavčar Kalcher

### ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana

13.3.2015

### Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/14

<sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

<sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)



<sup>10</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu.

Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2015 v1.00

2F-C2-42-E1-B1-6D-6D-96-8B-87-EB-F2-91-A8-3E-65-AC-90-42-DF

**RAZISKAVA OKUŽENOSTI/ONESNAŽENOSTI ŽIT, IZDELKOV IZ ŽIT IN  
SILAŽE S PLESNIMI IN MIKOTOKSINI TER UKREPI ZA NJUNO  
ZMANJŠANJE**

**INVESTIGATION ON THE INFECTION/CONTAMINATION OF CEREALS,  
PRODUCTS DERIVED FROM CEREALS AND SILAGE WITH MOULDS AND  
MYCOTOXINS AND MEASURES FOR THEIR REDUCTION**

Poročilo pripravili: Gabrijela Tavčar Kalcher, Breda Jakovac Strajn, Stanislava Kirinčič,  
Franci Aco Celar, Katarina Kos, Igor Šantavec, Darja Kocjan Ačko, Boris Kovač,  
Andreja Rijavec Bregar

**POVZETEK**

Mikotoksini so sekundarni presnovki različnih plesni, ki pri ljudeh in živalih po zaužitju povzročijo zastrupitev (mikotoksikoze). Plesni, ki rastejo na žitaricah, lahko začnejo izločati mikotoksine pred žetvijo, po njej ali pa kasneje med neprimernim skladiščenjem. Najbolj razširjene plesni, ki proizvajajo mikotoksine so *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* in *Penicillium spp.* Pogosto jih ugotovimo v koruzi in drugih žitih, ki se uporabljajo v človeški ali živalski prehrani. Ker so toksigene plesni zelo razširjene, najdemo mikotoksine pravzaprav v vseh delih sveta.

Slovensko kmetijstvo je živinorejsko usmerjeno, zato na njivah pretežno gojimo rastline, ki so namenjene živalski krmu (koruza, žita ...). Ugotovljeno je bilo, da v Sloveniji tako koruzo kot pšenico najbolj pogosto okužujejo skoraj identične plesni iz rodu *Fusarium*, kar omogoča njihovo ohranjanje v ozkem kolobarju koruza-žita in posledično večjo gospodarsko škodo. Prevladujoči glivni vrsti iz rodu *Fusarium* tako pri koruzi kot žitih v Sloveniji sta *F. graminearum* in *F. avenaceum*, ki tvorita pomembne mikotoksine: deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenon (ZEA) in fumonizine (FB). Kot tretja pomembna vrsta se pri koruzi pojavlja *F. subglutinans* (FB) pri pšenici pa *F. culmorum* (DON, ZEA).

Strokovnjaki po vsem svetu razvijajo na plesni odporne vrste rastlin in različne fungicide, vendar do danes še ne poznamo nobene zares učinkovite zaščitne metode.

Izvajamo lahko samo preventivne ukrepe, ki vključujejo ustrezno poljedelsko prakso, zadostno sušenje pridelka po žetvi in dobro skladiščno prakso. Posebej težko je realno oceniti dejansko škodo, ki jo povzročajo mikotoksini v živalski proizvodnji, prevladuje pa mnenje, da je zelo velika. Zaradi vsega navedenega je kontrola mikotoksinov v prehranski verigi ljudi in živali upravičena in potrebna. V EU so zato bili sprejeti predpisi o najvišjih še sprejemljivih vsebnostih določenih mikotoksinov v hrani za ljudi in v proizvodih, namenjenih za krmo. Varnost izdelkov se tako zagotavlja s sistematičnimi postopki, ki zajamejo vse pridelovalne in predelovalne faze od zaščite rastlin med rastjo do predelave in kontrole končnih izdelkov.

Čeprav je dobro znano, da je vsako leto precejšen del proizvedenih žit kontaminiran z mikotoksini, pa se kontaminaciji silaž s toksičnimi presnovki plesni ne posveča dovolj pozornosti. V prehrani govedi zelo pogosto opazimo krmljenje s pokvarjeno oziroma plesnivo silažo. Zadnja leta opisujejo, da je silaža najbolj pogosto kontaminirana s plesnijo *Penicillium roqueforti* in s toksini, ki jih omenjena plesen proizvaja. Čeprav zaenkrat še zelo malo vemo o škodljivih učinkih mikotoksinov iz silaže in izločanju teh presnovkov v mleko, nas rezultati različnih tujih raziskav opozarjajo, da je potrebno raziskati stanje tudi v Sloveniji in se pridružiti iskanju rešitev na širšem področju EU.

Z namenom celovitega obvladovanja in vzpostavitve ukrepov omejevanja mikotoksinov v žitih, izdelkih iz žit in silaže smo se za projekt povezale štiri inštitucije, ki se pri svojem delu redno ukvarjamo s problematiko okuženosti žit s plesnimi in/ali mikotoksini v krmi in hrani: Veterinarska fakulteta, Biotehniška fakulteta, Nacionalni inštitut za javno zdravje in Mlinotest, d.o.o. S povezavo dosedanje prakse, teorije, načrtovanih poskusov, razvojem novih laboratorijskih metod in tehnoloških postopkov ter izboljšavo obstoječih bomo lahko predlagali celovite rešitve obvladovanja plesni in mikotoksinov v celotni prehranski verigi.

**Ključne besede:** *Fusarium*, mikotoksini, uradni nadzor, žita, koruza, izdelki iz žit, silaža, poskusi na polju, mlinsko predelovalna industrija, prehranska veriga.

## ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of various moulds, which cause poisoning (mycotoxicosis) in humans and animals after ingestion. Molds, growing on grains, can start to produce mycotoxins before harvest, after harvest or later, during improper storage. The most common moulds that produce mycotoxins are *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* They are often found in maize and cereals used for human or animal consumption. Since toxigenic moulds are widespread, in fact, mycotoxins can be found in all parts of the world.

Slovenian agriculture is livestock-oriented, therefore on our fields mostly plants intended for animal feed (maize, wheat, etc.) are grown. It was found out that in Slovenia, both maize and wheat are most frequently infected with almost identical fungus *Fusarium*, which is allowed by a narrow rotation of maize/cereals. The result is considerable economic damage. Predominant fungal species of *Fusarium* in maize and in cereals in Slovenia are *F. graminearum* and *F. avenaceum*, which produce important mycotoxins: deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenone (ZEA) and fumonisins (FB). As the third important type, the *F. subglutinans* (FB) appears in maize and *F. culmorum* (DON, ZEA) in wheat.

Mould-resistant species of plants and various fungicides are being developed around the world, but to date no really effective protective methods are known. Only preventive measures can be provided, including appropriate crop practices, adequate drying of the crop after harvest and good storage practice. It is particularly difficult to assess realistically the actual damage caused by mycotoxins in animal production, but it must be very large.

From the information given above, it is clear that the control on mycotoxins in the human and animal food chain is justified and necessary. In the EU, regulations on the highest tolerable concentrations of various mycotoxins in human food and products intended for feed were adopted. For ensuring the products safety, systematic procedures covering all cultivating and processing phases from protection of plants during growth to processing and control of final products must be implemented.

Although it is well known, that a considerable part of the produced cereals is contaminated with mycotokxns, very little attention is paid to the contamination of silage with toxic metabolites of moulds. Cattle are often fed with spoiled or moldy silage. In

recent years, silage is most frequently contaminated with the mould *Penicillium roqueforti* and with toxins produced by this mould. Although there is very little known about harmful effects of mycotoxins in silage and about the transfer of the metabolites into milk, the results of various foreign research indicate that a situation in Slovenia shall be investigated and the search for solutions within EU shall be joined.

In order to establish comprehensive management and measures for the reduction of the incidence of mycotoxins in cereals, products derived from cereals and silages, four institutions dealing with a problem of contamination of cereals with fungi and/or with mycotoxins in feed and food were joined: Veterinary Faculty, Biotechnical Faculty, National Institute for Public Health and Mlinotest, d.o.o. By combining the existing experiences, theory, planned experiments, development of new laboratory methods and technologies as well as with the improvement of the existing ones, comprehensive solutions for managing moulds and mycotoxins in the whole food chain can be proposed.

**Key words:** *Fusarium*, mycotoxins, official control, cereals, maize, cereal products, silage, field experiments, grain processing industry, food chain.

## **OPIS PROBLEMA IN CILJEV**

Mikotoksini so produkti sekundarnega metabolizma plesni iz različnih rodov, ki so največkrat za ljudi, živali in rastline toksični že v zelo majhnih količinah (Hussein in Brasel, 2001, Binder in sod., 2007, Marin in sod., 2013). Rezultati raziskav kažejo, da je okoli 30 do 40 % plesni pod določenimi pogoji sposobno proizvajati mikotoksine. Različni avtorji ocenjujejo, da je vsako leto vsaj četrtnina pridelkov kontaminirana z mikotoksini. Običajno so to precej stabilne substance, ki v krmi in živilih ostanejo nespremenjene tudi potem, ko njihove proizvajalke – plesni odmrejo. Do sedaj je opisanih več kot 350 vrst plesni, ki izločajo mikotoksine in več kot 300 različnih mikotoksinov, ki povzročajo različna obolenja pri živih organizmih.

Optimalna temperatura za rast in razmnoževanje večine saprofitskih plesni je med 25 in 30 °C, poleg tega pa potrebujejo za svoj razvoj še kisik in rahlo kislo podlago. V ustreznih skladiščnih pogojih večina teh plesni odmre, vendar pa njihove spore in sekundarni toksični presnovki, ki jih imenujemo mikotoksini, v substratu ostanejo.

Nekatere plesni lahko daljše obdobje mirujejo in se ob povečani vlagi pričnejo ponovno razmnoževati. Skladiščne plesni so v krmi praviloma v večjem ali manjšem številu, ker se krma z njimi kontaminira med spravilom in skladiščenjem. Razmnožujejo se v razmerah, ko poljske plesni že odmirajo. V to skupino spadajo plesni iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Acremonium*, *Verticillium*. Na krmi, ki je skladiščena v neprimernem okolju, povzročijo raznobarvne plesnive prevleke. Tudi v na videz popolnoma zdravem zrnju so lahko spore, iz katerih se v ugodnih razmerah razvijejo plesni, ki povzročijo kvarjenje krme. Relativna zračna vlaga pod 60% preprečuje rast skoraj vseh vrst plesni.

Prisotnost mikotoksinov v živilih in krmi nedvomno predstavlja resen problem, saj lahko vpliva na zdravje ljudi in živali. Mikotoksini imajo lahko kancerogene, mutagene, imunosupresivne in estrogene učinke, povzročajo lahko gastrointestinalne motnje ter motnje v delovanju ledvic. Aflatoksini in ohratoksini se v organizmu tudi kopičijo (Hussein in Brasel, 2001, Driuehuis in sod., 2008).

Leta 2003 so mikotoksine označili kot najpomembnejše kronične prehranske dejavnike tveganja za ljudi in živali, bolj nevarne od sintetičnih kontaminantov, rastlinskih toksinov, dodatkov hrani ali ostankov pesticidov (Bannett in Klich, 2003).

Med mikotoksini so najbolj poznani aflatoksini, ker predstavljajo ene najnevarnejših kancerogenih substanc. Trihoteceni predstavljajo drugo pomembno skupino mikotoksinov, ki jih večinoma izločajo plesni *Fusarium spp.* Najbolj poznani mikotoksini v tej skupini so deoksinivalenol (DON, vomitoksin), nivalenol (NIV), 3- in 15-acetil deoksinivalenol (AcDON), fuzarenon-X, toksina T-2 in HT-2 ter diacetoksiscirpenol. Pomembno dejstvo je, da se mikotoksini iz te skupine pojavljajo skupaj in imajo lahko sinergistične učinke. Med omenjenimi mikotoksini je DON eden od po vsem svetu najbolj razširjenih mikotoksinov. Čeprav je med trihoteceni med manj "toksičnimi", predstavlja zaradi svoje razširjenosti velik problem pri zagotavljanju varne hrane. Nedavno so naredili raziskavo, v kateri so preiskali 11.022 vzorcev žit iz 11 različnih evropskih držav in ugotovili, da je bilo 57 % preiskanih vzorcev pozitivnih na DON. Podobne rezultate so objavili tudi Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001). Poleg tega, da je DON zelo razširjen, je tudi odporen na mletje, predelavo in toploto, zato se zlahka pojavi v človeški ali živalski prehranski verigi (Binder in sod., 2007, Farahany in Jinap, 2011).

Na območjih zmernega podnebja koruzo okužuje več vrst gliv iz rodu *Fusarium*. Povzročajo trohnobo korenin, stebel in plesnivost storžev. Zmanjšanje pridelka zaradi

okužb v povprečju znaša med 10 in 30 %. Poleg tega so nekatere *Fusarium* vrste sposobne tvoriti mikotoksine, tako na polju kot po pravilu pridelka. Največ mikotoksikoloških raziskav je bilo narejenih v zvezi z mikotoksini v zrnju, čeprav so v nekaterih raziskavah ugotovili mikotoksine tudi v trohnečih steblih, okuženih listih in celi rastlini. Slednje lahko predstavlja resno tveganje pri koruzi, ki jo uporabljamo za svežo krmo in silažo.

Prisotnost mikotoksinov v koruznem zrnju povzroča povsod po svetu veliko zaskrbljenost, ker je njihova prisotnost v krmi in hrani pogosto povezana z kroničnimi ali akutnimi mikotoksikozami živine in v manjšem obsegu ljudi. Ocenjeno je bilo, da je 25 % svetovnega pridelka hrane kontaminiranega z mikotoksini, koruza pa je z nekaterimi fuzarijskimi toksini, kot so DON in FB1, onesnažena še v večjem obsegu.

Po podatkih doslej izvedenih raziskav v Sloveniji koruzo najpogosteje okužujejo glive iz vrst *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* in *F. avenaceum*, medtem ko v manjšem obsegu oz. sporadično *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* ter še nekatere druge. Pri nas dominantne vrste naj bi po literaturnih podatkih tvorile pomembne mikotoksine, kot so DON, NIV, ZEN in MON (Milevoj, 2002; Logrieco in sod., 2002)

Podobno kot koruzo tudi žita okužujejo številne plesni iz rodu *Fusarium*. Do sedaj je evidentiranih 12 vrst. Okužujejo predvsem korenine, stebela in zrna ter na ta način povzročijo v povprečju 10 do 40 % izgube pridelka. Poleg tega tudi te plesni pred in po žetvi tvorijo mikotoksine. Z njimi so predvsem močno onesnaženi pridelki pšenice in ječmena, ki kot kulturi predstavljata kar 80 % pridelave žit v Evropi. Ostale vrste žit (rž, tritikala, oves) so manj občutljive na okužbo klasov s plesnimi *Fusarium spp.* in so zaradi tega njihova zrna tudi manj kontaminirana z mikotoksini.

Najpogosteje zastopane *Fusarium* vrste izolirane iz okuženih klasov pšenice v Evropi in pri nas so *F. graminearum*, *F. avenaceum*, in *F. culmorum*, nekoliko manj *F. poae*, *F. equiseti*, v manjši meri oz. sporadično pa se pojavljajo vrste *F. tricinctum*, *F. cerealis*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum* in *F. solani* (Bottalico in Perrone, 2002; Zemljič in sod., 2008). Ugotovili smo, obstaja močna povezava med okuženostjo pšenice in koruze z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* ter vsebnostjo DON.

Glive iz rodu *Fusarium* ne živijo samo na rastoči koruzi oz. žitih, temveč se lahko zelo dobro razvijajo kot saprofiti na uskladiščenih pridelkih, silažni koruzi in celo na izdelkih živilske industrije. Pojavnost gliv *Fusarium spp.* v pridelkih, krmi in izdelkih



živilsko predelovalne industrije je odvisno od številnih dejavnikov okolja kot tudi načina pridelave in skladiščenja (izbor sort, gnojenje, obdelava tal, kolobar, kemično varstvo, tehnologija skladiščenja in obdelave zrnja ipd.).

Nekatere raziskave kažejo, da so zaradi ekstenzivnosti v ekološki pridelavi okužbe pšenice s plesnimi iz rodu *Fusarium* manj pogoste kot v konvencionalni pridelavi, vendar pa so v nasprotju s tem ugotovili, da ni razlik v vsebnosti DON in ZEA v zrnju. Glede na majhnost slovenskega kmetijskega prostora se vse bolj kažejo tendence k povečevanju obsega ekološke pridelave. Žita in izdelki iz žit so tako danes v Sloveniji že osnovni tržni artikli ekološko usmerjenih kmetij. Če bi ugotovili, da pri nas ekološko pridelano žito vsebuje manj mikotoksinov, bi bila to vsekakor tržna priložnost in prednost tako na domačem kot tujem tržišču.

Pri živalih je najpogostejši ukrep za zmanjšanje izpostavljenosti mikotoksinom uporaba različnih vezalcev ali adsorbensov v krmi. Žal pa večina komercialno dostopnih vezalcev mikotoksinov ni uspešna pri vezavi mikotoksinov, ki jih izločajo plesni rodu *Fusarium*.

Kemijske onesnaževalce, ki izvirajo iz slabe kmetijske prakse, z nadaljnjimi postopki v predelavi živil zelo težko odstranimo in predstavljajo resno tveganje. Žitno predelovalna industrija ukrepa z ažurnim spremljanjem prisotnosti onesnaževalcev ter različnimi postopki čiščenja, sortiranja in luščenja. V delu projekta, ki smo ga namenili tehnološkemu postopkom v predelavi žit, smo na osnovi empiričnih testov podali možne načine ukrepanja za zmanjšanje pojavljanja DON-a v izdelkih, namenjenih potrošniku. Na DON smo se osredotočili, ker je v žitih zelo razširjen in predstavlja pomemben prehranski dejavnik tveganja tako za živali kot tudi za ljudi. Ker je DON zelo stabilen ter odporen na mletje in procese predelave, kontaminacije izdelkov iz žit z DON pogosto ne moremo preprečiti. Še vedno se razvijajo novi načini čiščenja žitnih mešanic pred mletjem in preizkušajo dodatki različnih adsorbensov, ki bi lahko zmanjšali onesnaženost končnih izdelkov z mikotoksini.

Mikotoksinom se torej zaradi načina pridelovanja žit in klimatskih sprememb ne da izogniti, zato je njihova vsebnost v živilih in krmi omejena s predpisi (Evropska Komisija, 2006a, 2006b, 2007, 2010, 2011, 2013) in se jih v posameznih državah zasleduje v okviru uradnega nadzora. Tudi v Sloveniji obstajajo že več let kontinuirano letni programi uradnega nadzora/monitoringa živilskih proizvodov na vsebnost mikotoksinov, vendar do

sedaj še ni narejene večletne analize rezultatov o vsebnosti mikotoksinov v živilskih proizvodih na osnovi omenjenih letnih programov.

V krmi je največja dovoljena koncentracija določena za AFB1, za toksine, ki jih izločajo plesni *Fusarium*, pa so podana le priporočila (Evropska Komisija, 2006a, 2011). Poleg žit sestavlja pomemben del obroka pri prežvekovalcih tudi silaža. Zaradi okužbe žit s plesnimi *Fusarium* se lahko njihovi toksini najdejo tudi v silaži (Driehuis in sod., 2008). Po drugi strani pa zaradi napak pri siliranju v silaži pogosto najdemo tudi toksine, ki jih izločajo plesni vrste *Penicillium* (PR toksin, patulin, rokefortini, penicilinska kislina, mikofenolna kislina) in *Aspergillus* (aflatoksini, kojinska kislina). Raziskave v Nemčiji so pokazale pogosto kontaminacijo z rokefortinom C, v ZDA pa je silaža najbolj kontaminirana s PR toksinom. Na Irskem predstavlja balirana travna silaža 30 % vse silaže, ki se jo letno pokrmi govedu. Z nedavno opravljeno raziskavo so tudi pri njih ugotovili, da več kot 90 % balirane travne silaže kaže vidne znake plesnivosti. Z laboratorijskimi testi so potrdili visoke vsebnosti toksičnih presnovkov plesni iz rodu *Penicillium* (Miller, 2008, O'Brien in sod., 2006). V Sloveniji teh podatkov nimamo, zato smo vpeljali analizni postopek (Driehuis in sod., 2008, Rasmussen in sod., 2010, Lattanzio in sod., 2011) in ga uporabili za določitev omenjenih mikotoksinov v silaž zbranih na kmetijah v Sloveniji.

Glede na EU zakonodajo Slovenija kontrolira tudi vse relevantne mikotoksine v živilih rastlinskega izvora. Z akreditiranimi analiznimi postopki jih določajo v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano. Kljub rednim pregledom pa v Sloveniji ne obstajajo večletni in splošno dosegljivi rezultati vsebnosti mikotoksinov v živilskih proizvodih. V sklopu projekta smo na osnovi dobljenih podatkov naredili takšno raziskavo.

Velikokrat z mikotoksini povezujemo le žita in pri tem pozabljamo, da je velik del obroka pri prežvekovalcih sestavljen tudi iz voluminozne krme (seno, slama in silaža), za katero vemo, da je pogosto kontaminirana z različnimi vrstami plesni, ki se začnejo razvijati že na polju ali pa kasneje med skladiščenjem. Tej problematiki se posveča premalo pozornosti. Eden od vzrokov so verjetno težave, na katere naletimo pri vzorčenju silaž. Tega, da mora biti vsak odvzeti vzorec, ki ga pošljemo v preiskavo, reprezentativen (imeti mora lastnosti cele serije), pri vzorčenju silaž ne moremo zagotoviti, saj najpogosteje vzorec lahko odvezamo le na mestu, kjer imamo dostop. Po podatkih iz literature je znano, da so plesni iz rodu *Aspergillus*, *Penicillium* in *Monascus* pogosti

kontaminanti silaž (O'Brien in sod., 2006). V zadnjih letih opisujejo, da je silaža najbolj pogosto kontaminirana s plesnijo *Penicillium roqueforti* in s toksini, ki jih omenjena plesen proizvaja. Kot najbolj verjetna vzroka za takšno stanje izpostavljajo spremembe v tehnologiji pridelave krme in povečanje obsega farm. *P. roqueforti* se lahko razvija pri nizkih pH vrednostih in zelo majhni prisotnosti kisika v substratu (Nielsen in sod., 2006; Miller, 2008).

Vrste plesni iz rodu *Penicillium* proizvajajo različne sekundarne presnovke, vključno z rokefortini, PR toksinom, penitremom A in mikofenolno kislino (Miller, 2008). Škodljivi učinki omenjenih substanc na domače živali še niso v celoti raziskani. V plesnivih silažah sta najpogosteje ugotovljena rokefortin C in mikofenolna kislina, PR toksin in patulin pa sta zaradi svoje nestabilne strukture ugotovljena le občasno (O'Brien in sod., 2006). Za vse naštetih presnovke je poznano, da sami po sebi niso dovolj toksični, da bi povzročali znake zastrupitve, vendar je njihova toksikologija še nepopolna, predvsem pa še niso pojasnjeni mehanizmi njihovega medsebojnega delovanja (O'Brien in sod., 2006; Miller, 2008). Kljub temu, da so v večini raziskav iz plesnive silaže najpogosteje izolirali plesni vrste *Penicillium*, pa v nekaterih raziskavah (Amigot in sod., 2006; Richard in sod., 2009) ugotavljajo, da so v plesnivih silažah prisotne plesni iz rodu *Aspergillus*. Od njihovih toksičnih presnovkov izpostavljajo AFB1 in gliotoksin, ki deluje imunosupresivno. Na osnovi dobljenih rezultatov menijo, da ne smemo podcenjevati vsebnosti AFB1 v silažah, še posebno v starih koruznih silažah (Richard in sod., 2009).

Pri delu na terenu opazamo, da so glavne nepravilnosti pri travnih silažah prepozna košnja, trava, onesnažena z zemljo, preveč uvela trava, premalo stisnjene, ovite in poškodovane bale, slabo potlačeni silosi, premajhen in nepravilen odvzem itd. Pri koruznih silažah pogosto opazimo gretje in plesnenje, ki sta največkrat posledica spravila preveč zrele koruze, slabo potlačenih silosov in premajhnega odvzema. Razlog za gretje in plesnenje koruzne silaže je tudi naknadna fermentacija sladkorjev, ki jih je veliko predvsem v silažah iz dolgozelenih hibridov. Žal pa so velikokrat vzroki za težave tudi objektivni in sicer različne nepredvidene situacije npr. trenutne letne vremenske razmere in s tem povezana hranilna vrednost ter bolezni in okužbe rastlin. Na dolgi rok pa moramo upoštevati tudi klimatske spremembe (dolgotrajne suše, razne ujme), ki prav tako zmanjšujejo neoporečnost krme.

V okviru uradnega nadzora se analizira razmeroma malo vzorcev, zato v Sloveniji nimamo sistematično zbranih podatkov o onesnaženosti silaž z mikotoksini.

Iz vsega navedenega je razvidno, da popolna odstranitev mikotoksinov iz prehranske verige ni mogoča, zato je njihovo prisotnost v surovinah, krmi in hrani potrebno kontrolirati. Zagotavljanje varne hrane vključuje aktivnosti in kontrole, ki so potrebne za obvladovanje proizvodnega procesa od razvoja, nabave surovin, izdelave izdelka do njegove prodaje (Siegel in Babuscio, 2011). Vemo, da so v vsakem segmentu proizvodnega procesa še potrebne izboljšave, kar nam dokazujejo tudi raziskave, ki se na to temo trenutno opravljajo v okviru evropskih projektov. Problematika je aktualna in pomembna.

Cilji projekta so bili:

1. Analiza obstoječega stanja o okuženosti/onesnaženosti žit iz primarne proizvodnje v Sloveniji in izdelkov iz žit s plesnimi in mikotoksini.
2. Razvoj metode (LC-MS/MS) za določanje izbranih mikotoksinov hkrati v silažah.
3. S poskusi na poljih ugotoviti odpornost različnih hibridov koruze na okužbo s fuzariozami.
4. Oceniti stopnjo kontaminiranosti živil na slovenskem trgu z mikotoksini.
5. Na osnovi empiričnih testov v tehnoloških postopkih v mlinsko predelovalni industriji bodo podani možni načini ukrepanja za doseganje manjše verjetnosti pojavljanja ostankov v izdelkih, namenjenih potrošniku.
6. Izdelava smernic (priporočil) za prihodnost Slovenije.

## **Literatura**

- Amigot SL, Fulgueira CL, Bottai H, Basilico JC, 2006. New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biol Technol* 41, 215–224.
- Bannett JW, Klich M, 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16 (3), 497–516.
- Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J, 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol* 137, 265–282.
- Binder EM, 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim Feed Sci Technol* 133, 149–166.

- Bottalico A, Perrone G, 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. V: Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 611–624.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, Te Geffel MC, 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit Contam Part B* 1, 41–50.
- Evropska Komisija, 2006a. Priporočilo 2006/576/ES o prisotnosti deoksinivalenola, zearalenona, ohratoksina A, toksinov T-2 in HT-2 ter fumonizinov v proizvodih, namenjenih za krmo. *UL EU L* 229, 7–9.
- Evropska Komisija, 2006b. Uredba (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. *UL EU L* 364, 5–24.
- Evropska Komisija, 2007. Uredba (ES) št. 1126/2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih glede toksinov iz rodu *Fusarium* v koruzi in koruznih proizvodih. *UL EU L* 255, 14–17.
- Evropska Komisija, 2010. Uredba (EU) št. 165/2010 o spremembah Uredbe Komisije (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih glede aflatoksinov. *UL EU L* 364, 5–24.
- Evropska Komisija, 2011. Uredba (ES) št. 574/2011 o spremembi Priloge 1 k Direktivi 2002/32/ES Evropskega Parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti za nitrit, melamin, *Ambrosio* spp. ter prenosa nekaterih kokcidiostatikov ali sredstev proti histomonijazi in o konsolidaciji priloge I in II k Direktivi, *UL EU L* 159, 7–24.
- Evropska Komisija, 2013. Priporočilo št. 2013/165/EU o prisotnosti toksinov T-2 in HT-2 v žitih in žitnih proizvodih. *UL EU L* 91, 12–15.
- Farahany EM, Jinap S, 2011. Influence of noodle processing (industrial protocol) on deoxynivalenol. *Food Control* 22 (11), 1765–1769.
- Hussein HS, Brasel JM, 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167 (2), 101–134.
- JECFA, 2001. Evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Technical Report Series 906. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 56th Report. Geneva. Switzerland.
- Lattanzio VMT, Della Gatta S, Suman M, Visconti A, 2011. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25, 1869–1880.

- Logrieco A, Mule G, Morreti G, Botallico A, 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. V: Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 597–609.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V, 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicology* 60, 218–237.
- Miller DJ, 2008. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Addit Contam* 25 (2), 219–230.
- Milevoj L, 2002. Tri desetletja spremljanja fuzarioz (*Fusarium* spp.) pri koruzi = Three decades of maize fusarium diseases (*Fusarium* spp.) estimation. V: Tajnšek, Anton (ur.), Šantavec, Igor (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2002: zbornik simpozija, Zreče, 5. in 6. december 2002. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, str. 78–82.
- Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller DJ, 2006. Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *J Agricult Food Chem* 54, 3756–3763.
- O'Brien M, Nielsen KF, Kiely PO et al., 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agricult Food Chem* 54, 9268–9276.
- Rasmussen RR, Storm IMLD, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF, 2010. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 397, 765–776.
- Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D, 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Tech* 148, 309–320.
- Siegel D, Babuscio T, 2011. Mycotoxin management in the European cereal trading sector. *Food Control* 22 (8), 1145–1153.
- Zemljič A, Rutar R, Žerjav M, Verbič J, 2008. Vpliv sorte, gnojenja z dušikom in razkuževanja semena na okuženost zrnja pšenice s *Fusarium* sp. in onesnaženost z mikotoksini. V: Tajnšek, Anton (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2008 : zbornik simpozija, Rogaška Slatina, [4. in 5. december] 2008. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, str. 257–262.

## **Cilja 1 in 4: Analiza obstoječega stanja o okuženosti/onesnaženosti žit iz primarne proizvodnje v Sloveniji in izdelkov iz žit s plesnimi in mikotoksini in ocena stopnje kontaminiranosti živil na slovenskem trgu z mikotoksini**

### **Povzeto po članku, sprejetem v tiskanje:**

KIRINČIČ, Stanislava, ŠKRJANC, Barbara, KOS, Nataša, KOZOLC, Brigita, PIRNAT, Nina, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia - official control of foods in the years 2008-2012. *Food control*, ISSN 0956-7135. [Print ed.], April 2015, vol. 50, str. 157-165, doi: [10.1016/j.foodcont.2014.08.034](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.034). [COBISS.SI-ID [3173349](https://www.cobiss.si/id/3173349)].

## **Mikotoksini v žitih in žitnih izdelkih v Sloveniji - Uradni nadzor živil v letih 2008–2012**

### **Abstrakt**

V tej raziskavi smo proučili prisotnost mikotoksinov: aflatoksin (AF), ohratoksin A (OTA), fumonizin B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub> (FB), deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZON) in T-2/HT-2 toksina v 290-ih različnih žitih in žitnih izdelkih, vzorčenih na slovenskem trgu v okviru uradnega nadzora v letih 2008–2012. Uporabljene metode za določanje mikotoksinov so bile: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) in plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS). Vse metode so bile akreditirane in potrjene v skladu z zahtevami Evropske unije. Skupaj je 40% vzorcev žit vsebovalo enega ali več mikotoksinov, 2,4% je z enim ali več mikotoksini preseglo EU najvišje dovoljene vsebnosti. Primerjava rezultatov glede deleža neskladnih vzorcev ne kaže ekstremno pozitivnih ali negativnih odstopanj od drugih rezultatov EU. Med vsemi žitnimi izdelki lahko pšenični izdelki največ prispevajo k izpostavljenosti slovenskih prebivalcev mikotoksinom, zaradi visokega deleža kontaminiranih vzorcev (71%), visokega deleža vzorcev, ki so presegli najvišje dovoljene vsebnosti EU (6%), predvsem z DON-om in zaradi njihove daleč največje porabe v primerjavi z ostalimi žiti. Koruzni izdelki so žita z drugo najpogostejšo porabo in tudi lahko prispevajo k visoki izpostavljenosti mikotoksinom zaradi njihove relativno visoke povprečne koncentracije mikotoksinov. Najbolj pogoste kombinacije sopojavljanja mikotoksinov so bile: DON-ZON v pšenici, DON-T-2/HT-2 v ovsu in FB-DON in FB-DON-ZON v koruznih izdelkih. Z vidika načina pridelave/predelave, kjer je bilo na razpolago majhno število podatkov, so vsebovali vzorci žit, pridelani s konvencionalnim načinom kmetovanja, najnižjo povprečno vsebnost mikotoksinov in so bili tudi najmanj kontaminirani/neskladni (32%/1%), v primerjavi z vzorci iz ekološkega (46%/2.2%) in integriranega načina kmetovanja (87%/10%); integriran način kmetovanja temelji na nacionalni zakonodaji. Raziskava kaže na potrebo po nadaljevanju uradnega nadzora mikotoksinov v žitih in žitnih izdelkih in bi lahko bila osnova za izboljšanje načrtovanja nadzora in analitike v prihodnosti.

**Ključne besede:** Mikotoksini, žitni izdelki, neskladnost, sopojavljanje, metoda kmetovanja, Slovenija.



## 1. Uvod

Žita predstavljajo najpomembnejši vir hrane v mnogih državah (Pimentel in sod., 2009). Žita so lahko kontaminirana z mikotoksini, to je toksičnimi sekundarnimi metaboliti, ki so lahko prisotni v žitih zaradi okužb zrn s plesnimi, tako na polju, kot med skladiščenjem (Pitt, Taniwaki in Cole, 2013). Nastanek okužbe je odvisen od okoljskih dejavnikov kot so: temperatura, vlažnost, škoda nastala zaradi žuželk, suša in neustrezni pogoji skladiščenja (Hussein in Brasel, 2001; Marin, Ramos, Cano-Sancho in Sanchis, 2013; Rodríguez-Carrasco, Ruiz, Font in Berrada, 2013; Zain, 2011). Nekatere raziskave kažejo na možnost, da na nastanek okužb lahko vpliva tudi način kmetovanja (Rubert, Soriano, Mañes in Soler, 2013; Serrano, Font, Mañes in Ferrer, 2013). Prisotnost mikotoksinov v končnem izdelku je lahko odvisna tudi od predelave hrane, ki v nekaterih primerih zmanjša njihovo vsebnost (Vaclavikova, Malachova, Veprikova, Dzuman, Zachariasova in Hajslova, 2013). Prisotnost mikotoksinov v žitih in žitnih izdelkih lahko predstavlja tveganje za zdravje ljudi in živali (Rocha, Freire, Maia, Guedes, & Rondina, 2014).

V zadnjih letih je bilo objavljenih mnogo raziskav o pojavljanju mikotoksinov v žitih (Cano-Sancho, Ramos, Marín in Sanchis, 2012; Duarte, Pena in Lino, 2010; Juan, Ritieni in Mañes, 2013; Rodríguez-Carrasco in sod., 2013; Serrano, Font, Ruiz in Ferrer, 2012). Te raziskave na splošno niso del uradnega nadzora posameznih držav, ker se načrtujejo v raziskovalne namene, kot npr. za proučevanje vpliva glivičnih okužb žit med žetvijo na pojavnost mikotoksinov (Bělakova, Benešová, Čáslavský, Svoboda in Mikulíková, 2014; Pleadin, Vahčić, Perši, Ševelj, Markov in Frece, 2013) ali pa se raziskave osredotočajo na pojavnost mikotoksinov v zelo specifičnih vrstah žit (Cano-Sancho, Valle-Algarra, Jiménez, Burdaspal, Legarda in Ramos, 2011; Montes, Segarra in Castillo, 2012). Podatki o prisotnosti aflatoksinov, ohratoksin A, fumonizinov, deoksinivalenola, zearalenona in toksinov T-2/HT-2 v žitih in žitnih izdelkih so dostopni iz programa nadzora Velike Britanije, Food Standards Agency (UK FSA, 2009). Podatki o pojavnosti določenih mikotoksinov/skupin mikotoksinov v različnih evropskih državah, v različnih živilih in različnih letih, so zbrani v dokumentih Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) (EFSA, 2011a, 2011b, 2013a, 2013b) in v starejših dokumentih Generalnega direktorata Evropske Komisije za zdravje in varstvo potrošnikov (EC, 2002, 2003).

Z namenom zaščititi človekovo zdravje je uradni nadzor mikotoksinov v žitih in žitnih izdelkih in drugih živilih del zakonodaje Evropske unije, zlasti v Uredbi komisije št. 1881/2006 (EC, 2006b). Odgovornost za zagotavljanje varnosti živilskih izdelkov na trgu, vključno z vsebnostjo mikotoksinov, je na nosilcih živilske dejavnosti, kar je določeno v Uredbi (EC) št. 178/2002 (The European Parliament and the Council, 2002).

Slovenija kot članica EU izvaja bolj intenziven uradni nadzor mikotoksinov v različnih živilih, kot so žita in oreščki, od leta 2008 naprej. Odgovornost za izvajanje monitoringov/uradnega nadzora varnosti živil je pripadala do leta 2010 Zdravstvenemu inšpektoratu Republike Slovenije. Leta 2010 je

pristojnost nadzora varnosti večine živil prešla na Inšpektorat Republike Slovenije za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano. Slednji se je leta 2012 vključil v novo organizirano Upravo Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. V uradni nadzor hrane v Sloveniji so vključeni vzorci, ki so del letnega programa monitoringa, vzorci kontrole na meji s tretjimi državami, vzorci kot posledica pritožb potrošnikov in zastrupitev s hrano ter kontrolni vzorci. Vrsta in število vzorcev ter kombinacije analiziranih mikotoksinov/skupin mikotoksinov so načrtovani letno, ob upoštevanju različnih okoliščin, kot so dostopnost hrane na trgu, ankete o potrošnji gospodinjstev, podatki sistema hitrega obveščanja za živila in krmo (RASFF, 2014) in finančnih virov. Kombinacije analiziranih mikotoksinov in matriksov so izbrane pretežno glede na Uredbo komisije (ES) št. 1881/2006 (EC, 2006b) in glede na Priporočilo Komisije št. 2013/165/EU (EC, 2013).

Cilj raziskave je ugotoviti, do kakšnih zaključkov lahko pridemo z analizo "rutinskih" rezultatov kontrole mikotoksinov v žitnih izdelkih, ki prvotno niso bili namenjeni za raziskave in kjer je izvedba statistične analize zaradi pomanjkanja podatkov pogosto omejena. V raziskavi je bila pozornost usmerjena na pogostost kontaminacije z mikotoksini, neskladnost vzorcev, povprečne koncentracije pozitivnih vzorcev, primerjavo rezultatov z drugimi državami, sopojavljanje mikotoksinov in na vpliv načina kmetovanja na kontaminacijo z mikotoksini.

## **2. Rezultati in diskusija**

V letih 2008–2012 je bilo v okviru uradnega nadzora mikotoksinov v Sloveniji vzorčenih skupno 290 žit in žitnih izdelkov. Podrobni rezultati so zbrani v neobjavljenih letnih poročilih/elektronskih dokumentih pristojnih organov (Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije za leti 2008 in 2009, Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin za leta 2010, 2011 in 2012, pod pristojnostjo Ministrstva za zdravje oziroma Ministrstva za kmetijstvo in okolje). Živila za posebne prehranske namene med te vzorce niso vključena, saj so bila del ločenega nadzora. Primerjava med posameznimi leti ni bila mogoča, saj se je skupno število vzorcev na leto, ter skupine žit in žitnih izdelkov, spreminjalo iz leta v leto; od samo 6 vzorcev v letu 2008, do 167 vzorcev v letu 2012. V letih 2009, 2010 in 2011, je bilo odvzetih 48, 31 oziroma 38 vzorcev. V tem obdobju je zaznati trend neenakomernega naraščanja skupnega števila vzorcev, analiziranih na vsebnost mikotoksinov, tudi znotraj različnih skupin žitnih izdelkov, zaradi česar smo v statistično analizo vključili vse vzorce v tem 5-letnem obdobju.

Izvor žit in žitnih izdelkov, ki so bili vzorčeni na vse vrste onesnaževal, vključno z mikotoksini, v letih 2008–2012 je bil sledeč: 42% vzorcev iz Slovenije, 41% vzorcev iz drugih držav EU, 16% vzorcev iz tretjih držav ter 1% vzorcev neznanega izvora.

Za namen statistične obdelave smo različne vrste vzorcev razvrstili v posamezne skupine žit in žitnih izdelkov, kot je prikazano v Tabeli 1.

Tabela 1: Skupine žit in žitnih izdelkov, vzorčenih v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Skupina žit in žitnih izdelkov	Vzorec živila
<b>Pšenica in pšenični izdelki</b>	<i>pšenična in pirina zrna, pšenična moka, pirina moka, pšenični zdrob, pšenična kaša;</i>
<b>Koruzna in koruzni izdelki</b>	<i>koruzna zrna, koruzna zrna namenjena uživanju, koruzni zdrob (polenta);</i>
<b>Oves in ovseni izdelki</b>	<i>ovsena zrna, ovseni kosmiči;</i>
<b>Ječmen in ječmeni izdelki</b>	<i>ječmenova zrna;</i>
<b>Rž in rženi izdelki</b>	<i>ržena zrna, ržena moka</i>
<b>Ajda in ajdovi izdelki<sup>a</sup></b>	<i>ajdova kaša, ajdova moka, ajdove testenine in drugi izdelki, ki vsebujejo ajdo</i>
<b>Proso in proseni izdelki</b>	<i>prosena zrna namenjena uživanju, prosena kaša</i>
<b>Tritikala</b>	<i>zrna tritikale</i>
<b>Riž in riževi izdelki</b>	<i>različna predelana riževa zrna namenjena uživanju, riževa moka, riževe testenine, riževi vafli</i>
<b>Druga žita</b>	<i>niso določena</i>
<b>Drugi izdelki na osnovi žit</b>	<i>različne vrste kruha in drugih pekovskih izdelkov, piškoti, drugi kosmiči za zajtrk, prigrizki, musli, tablice z žiti in sadjem</i>

<sup>a</sup> Ajda in ajdovi izdelki so vključeni v skupino žit in žitnih izdelkov zaradi njihove uporabe, ki je podobna žitom, čeprav botanično ajda ne spada med žita.

Vrednosti vsebnosti posameznih mikotoksinov in/ali vsote posameznih mikotoksinov znotraj iste skupine mikotoksinov v izdelku (vzorcu), so prikazane v  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za koncentracije enake ali večje od LOQ (meja določljivosti) in kot  $<\text{LOQ}$ , za koncentracije nižje od LOQ. Vrednost LOQ vpliva na število pozitivnih ( $\geq\text{LOQ}$ ) vzorcev, kar posledično vpliva na interpretacijo rezultatov v tem poročilu.

V Tabeli 2 so zbrane vrednosti LOQ za posamezne mikotoksine in za vsote posameznih skupin mikotoksinov, pridobljene v uradnem nadzoru med leti 2008–2012. Za primerjavo smo zbrali tudi LOQ-je drugih razpoložljivih raziskav.

Tabela 2: LOQ za mikotoksine v žitih in žitnih izdelkih za to in druge raziskave.

LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	SLOVENIJA 2008–2012	UK (UK FSA, 2009)	EU	(EU Referenca)
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	0,2	0.1	0,01–1,1	(EFSA, 2013a)
AFB1+AFB2+AFG1+AFG2	0,8	/	$\leq 3$	
OTA	1	0.1	0,01–0,5 <sup>a</sup>	(EC, 2002)
FB1, FB2	100	10	10–100	(EC, 2003)
FB1+FB2	200	/	/	
DON	50	10	50–250	(EFSA, 2013b)
ZON	5	3	5–10	(EFSA, 2011 <sup>a</sup> )
T-2, HT-2	25	10	/	(EFSA, 2011 <sup>b</sup> )
T-2+HT-2	50	/	$\leq 20$	

<sup>a</sup>LOD  
/ ni podatkov

Iz Tabele 2 je razvidna variabilnost v poročanih LOQ-jih za posamezne mikotoksine/skupine mikotoksinov med različnimi raziskavami in tudi znotraj posamezne raziskave. Velike razlike v LOQ-jih med posameznimi mikotoksini/skupini mikotoksinov v EU raziskavah (EFSA, 2011a, 2011b, 2013a, 2013b; ES, 2002, 2003) so pričakovane, saj so bili rezultati zbrani v različnih državah, ki so uporabljale različne analitske tehnike in analizirale različne matrikse živil. Slovenski LOQ-ji za določanje mikotoksinov niso dobro primerljivi s poročanimi iz UK (UK FSA, 2009) in EU. Večinoma so višji (AF, OTA, FB, DON (UK FSA), ZON (UK FSA) in T2/HT2), vendar v nekaterih primerih tudi nižji (AF, DON in ZON (EU)), kar bi lahko privedlo do podcenjevanja ali precenjevanja deleža kontaminacije z mikotoksini v Sloveniji v primerjavi z drugimi raziskavami. Vsi poročani LOQ-ji iz tabele 2 so pod najvišjo dovoljeno vsebnostjo posameznih mikotoksinov, ki je podana v Uredbi komisije (EC) Št. 1881/2006 (EC, 2006b), kar pomeni, da so rezultati o neskladnih vzorcih primerljivi med omenjenimi raziskavami.

Število vzorcev analiziranih v letih 2008–2012, število vzorcev z vsebnostjo mikotoksinov  $\geq$ LOQ in vsebnostjo višjo od najvišje dovoljene vsebnosti EU (neskladni vzorci) ter pripadajoče deleže (%) smo predstavili v Tabelah 3a, 3b in 3c. V primerih mikotoksinov OTA, DON in ZON smo upoštevali rezultate za posamezne mikotoksine, medtem ko smo v primerih mikotoksinov AF, FB in T-2/HT-2 upoštevali, odvisno od razpoložljivih podatkov, rezultate tako za posamezne toksine, kot tudi za njihove vsote v posameznem vzorcu. To pomeni, da je bila prisotnost mikotoksinov v vzorcu oziroma neskladnost šteta v primeru, če je eden ali več posameznih mikotoksinov ali njihova vsota bila  $\geq$ LOQ oziroma presežala EU predpisano vrednost.

Tabela 3a: Števila in deleži pozitivnih ter neskladnih vzorcev žitnih izdelkov glede vsebnosti skupnih mikotoksinov slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Žita in žitni izdelki	Število vzorcev	$\geq$ LOQ	> EU
VSA ŽITA IN ŽITNI IZDELKI	290	116 40,0%	7 2,4%
PŠENICA IN PŠENIČNI IZDELKI, VKLJUČNO S PIRO	80	57 71,3%	5 6,3%
KORUZA IN KORUZNI IZDELKI	69	14 20,3%	1 1,4%
OVES IN OVSENI IZDELKI	24	11 45,8%	0 0%
AJDA IN AJDOVI IZDELKI	24	5 20,8%	0 0%
RIŽ IN RIŽEVI IZDELKI	17	0 0%	0 0%
RŽ IN RŽENI IZDELKI	17	11 64,7%	0 0%
JEČMEN IN JEČMENI IZDELKI	11	9 81,8%	1 9,1%
PROSO IN PROSENI IZDELKI	6	4 66,7%	0 0%
TRITIKALA	2	0 0%	0 0%
DRUGA ŽITA	2	1 50,0%	0 0%
DRUGI IZDELKI NA OSNOVI ŽIT	38	4 10,5%	0 0%

Tabela 3b: Števila in deleži pozitivnih ter neskladnih vzorcev žitnih izdelkov glede vsebnosti AF, OTA in FB slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Žita in žitni izdelki	AF			OTA			FB		
	Število vzorcev	≥ LOQ	> EU	Število vzorcev	≥ LOQ	> EU	Število vzorcev	≥ LOQ	> EU
VSA ŽITA IN ŽITNI IZDELKI	270	0	0	235	4	1	84	8	1
		0%	0%		1,7%	0,4%		9,5%	1,2%
PŠENICA IN PŠENIČNI IZDELKI, VKLJUČNO S PIRO	80	0	0	80	2	1	21	0	0
		0%	0%		2,5	1,3%		0%	0%
KORUZA IN KORUZNI IZDELKI	69	0	0	34	0	0	34	8	1
		0%	0%		0%	0%		23,5%	2,9%
OVES IN OVSENI IZDELKI	24	0	0	24	0	0	10	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
AJDA IN AJDOVI IZDELKI	24	0	0	24	1	0	0	0	0
		0%	0%		4,2%	0%		0%	0%
RIŽ IN RIŽEVI IZDELKI	17	0	0	17	0	0	0	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
RŽ IN RŽENI IZDELKI	17	0	0	17	0	0	7	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
JEČMEN IN JEČMENI IZDELKI	11	0	0	11	0	0	8	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
PROSO IN PROSENI IZDELKI	6	0	0	6	0	0	0	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
TRITIKALA	2	0	0	2	0	0	0	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
DRUGA ŽITA	2	0	0	2	0	0	1	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%	0%
DRUGI IZDELKI NA OSNOVI ŽIT	18	0	0	18	1	0	3	0	0
		0%	0%		5,6%	0%		0%	0%

Tabela 3c: Števila in deleži pozitivnih ter neskladnih vzorcev žit glede vsebnosti DON, ZON in T-2/HT-2 slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Žita in žitni izdelki	DON			ZON			T-2/HT-2	
	Število vzorcev	≥ LOQ	> EU	Število vzorcev	≥ LOQ	> EU	Število vzorcev	≥ LOQ
VSA ŽITA IN ŽITNI IZDELKI	246	109	5	227	36	2	145	6
		44,3%	2,0%		15,9%	0,9%		4,1%
PŠENICA IN PŠENIČNI IZDELKI, VKLJUČNO S PIRO	80	55	4	80	19	0	70	0
		68,8%	5,0%		23,8%	0%		0%
KORUZA IN KORUZNI IZDELKI	34	12	1	34	6	1	22	0
		35,3%	2,9%		17,6%	2,9%		0%
OVES IN OVSENI IZDELKI	24	11	0	24	3	0	14	6
		45,8%	0%		12,5%	0%		42,9%
AJDA IN AJDOVI IZDELKI	17	4	0	17	2	0	7	0
		23,5%	0%		11,8%	0%		0%
RIŽ IN RIŽEVI IZDELKI	17	0	0	17	0	0	0	0
		0%	0%		0%	0%		0%
RŽ IN RŽENI IZDELKI	17	11	0	16	1	0	16	0
		64,7%	0%		6,3%	0%		0%
JEČMEN IN JEČMENI IZDELKI	11	8	0	11	5	1	11	0
		72,7%	0%		45,5%	9,1%		0%
PROSO IN PROSENI IZDELKI	6	4	0	6	0	0	1	0
		66,7%	0%		0%	0%		0%
TRITIKALA	2	0	0	2	0	0	2	0
		0%	0%		0%	0%		0%
DRUGA ŽITA	2	1	0	2	0	0	2	0
		50,0%	0%		0%	0%		0%
DRUGI IZDELKI NA OSNOVI ŽIT	36	3	0	18	0	0	0	0
		8,3%	0%		0%	0%		0%

Opombe pod Tabelami 3a, 3b in 3c:

En vzorec je bil analiziran na enega ali več posameznih mikotoksinov/skupin mikotoksinov.

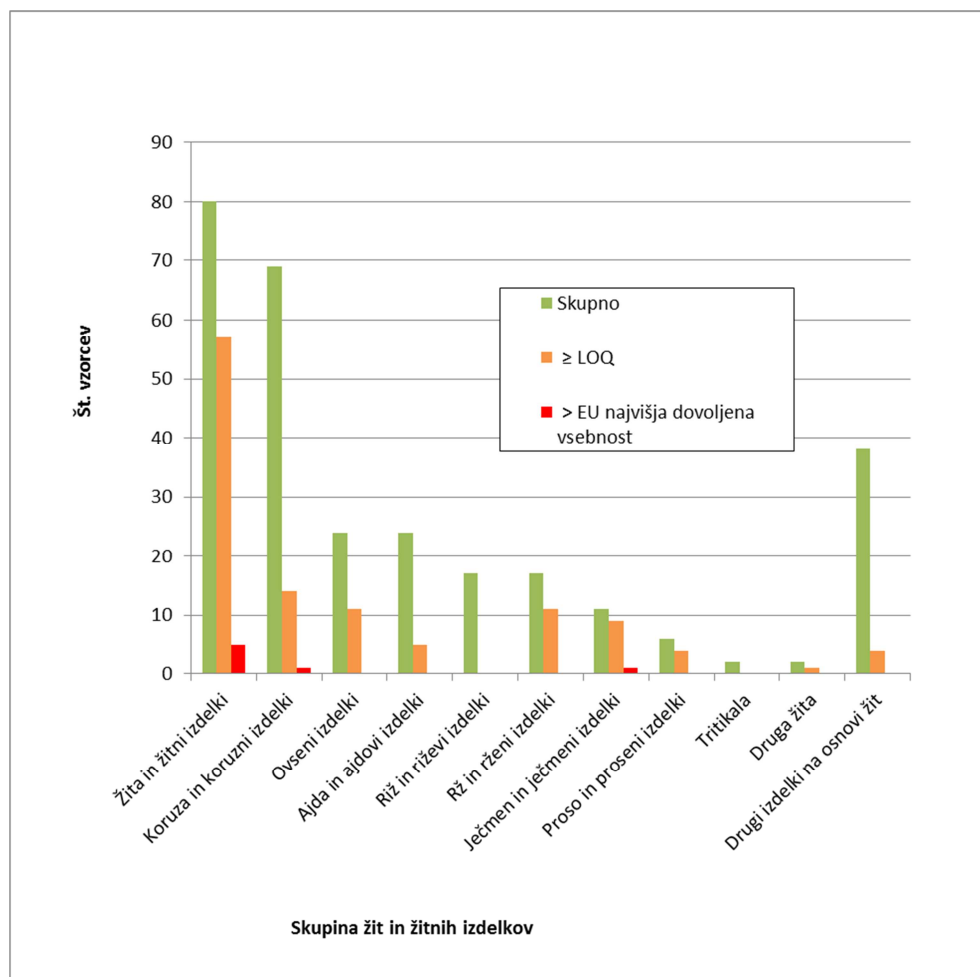
Ajda je vključena vs skupino žit in žitnih izdelkov zaradi njene uporabe, ki je podobna žitom, čeprav botanično ajda ne spada med žita.

>EU: >EU največjo dovoljeno vsebnostjo iz Uredbe (EC) št. 1881/2006 (EC, 2006b).

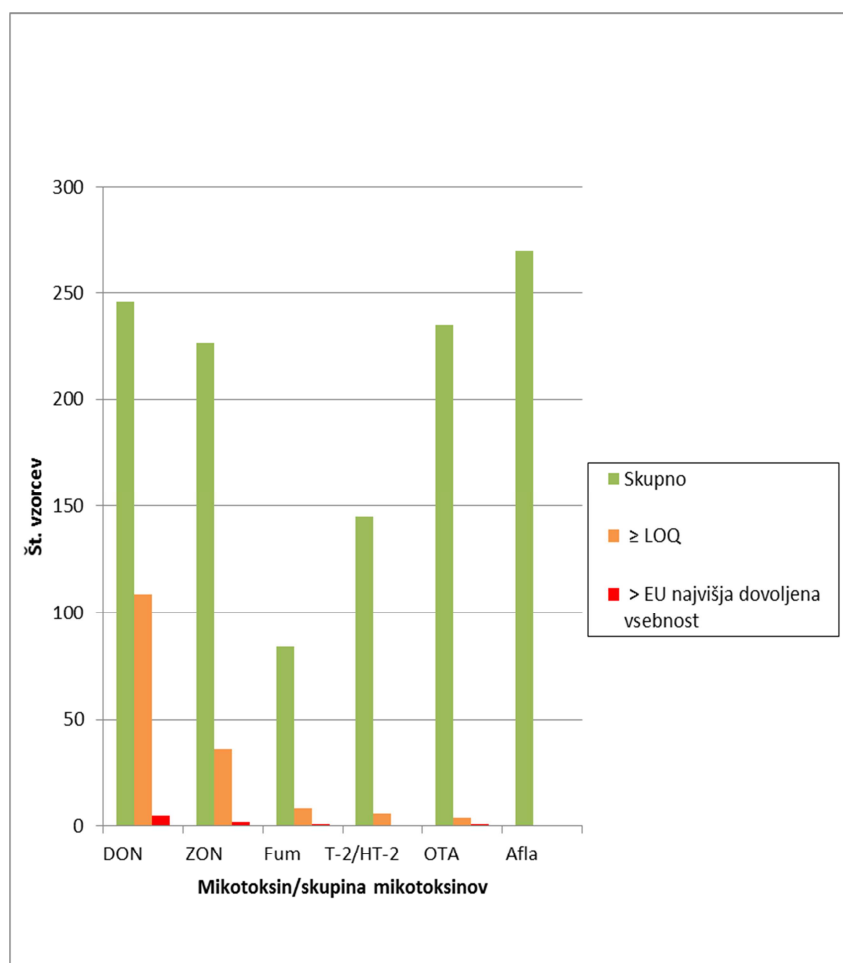
Za T-2/HT-2 največje vrtdnosti niso določene.

## 2.1. Delež kontaminacije in neskladnosti

Na Slikah 1 in 2 smo predstavili podatke iz Tabel 3a, 3b in 3c o pozitivnih vzorcih in vzorcih neskladnih z Uredbo EU (EC, 2006b), glede na skupino žit in žitnih izdelkov, ter glede na posamezen mikotoksin/skupino mikotoksinov. Največje število vzorcev je bilo v skupini pšenice in pšeničnih izdelkov (80), sledila je koruza in koruzni izdelki (69) ter drugi izdelki na osnovi žit (38). V letih 2008–2012 je pšenica predstavljala daleč najvišji delež porabe žit v Sloveniji, sledila je koruza, ki je predstavljala 15% porabe pšenice, medtem ko so vsa preostala žita skupaj predstavljala 8% porabe pšenice (Statistični Urad Republike Slovenije, 2014). Skupno število vzorcev v ostalih skupinah žit je bilo pod 25, kar zmanjša statistično značilnost, ki smo jo izpeljali iz teh števil.



Slika 1: Število vzorcev, ki so bili pozitivni ali neskladni na prisotnost mikotoksinov, glede na skupino žit in žitnih izdelkov v letih 2008–2012.



Slika 2: Število vzorcev, ki so bili pozitivni ali neskladni na prisotnost mikotoksinov, glede na mikotoksin/skupino mikotoksinov iz slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

### 2.1.1. Skupaj vsa žita in žitni izdelki

Iz Tabele 3a je razvidno, da je skupaj 40% od 290-ih vzorcev vsebovalo enega ali več mikotoksinov in da je vsebnost mikotoksinov v 2,4% vzorcev presegalo najvišjo dovoljeno vsebnost določeno v EU z enim ali več mikotoksini, zaradi česar vzorci niso bili skladni z Uredbo EU (EC, 2006b).

### 2.1.2. Po posameznih skupinah žit in žitnih izdelkov

Pšenica in pšenični izdelki, ki predstavljajo največjo porabo med vsemi žiti v Sloveniji, so bili kontaminirani z mikotoksini v 71% deležu in so imeli relativno visok delež vzorcev (6%), katerih vsebnost mikotoksinov je presegala najvišje dovoljene vsebnosti določene v EU. Koruza in koruzni izdelki, ki je skupina žit z drugo največjo porabo v Sloveniji, so bili kontaminirani z mikotoksini v 20% deležu in so imeli relativno nizek delež (1,4%) neskladnih vzorcev. Najbolj kontaminirani vzorci so bili ječmen in ječmenovi izdelki (82%), z najvišjim deležem neskladnosti (9%), vendar z majhnim številom vzorcev (11). Pojavnost kontaminacije v prosu, rži in ovsu ter njihovih izdelkih je bila relativno visoka (67%, 65%, in 46%), vendar neskladnih vzorcev ni bilo. Vzorci ajdovih izdelkov so imeli 21% delež kontaminacije, med njimi ni bilo neskladnih vzorcev. Med rižem in riževimi izdelki ni bilo pozitivnih vzorcev. Podatke zgoraj omenjenih skupin žit, razen pri pšenici in koruzi, moramo

jemati s previdnostjo, saj je bilo njihovo število vzorcev relativno majhno. Drugi izdelki na osnovi žit so imeli relativno nizek delež kontaminacije z mikotoksini (11%), brez neskladnih vzorcev. Slednji izdelki sodijo med procesirana živila, ki glede mikotoksinov niso tako problematični, kar so ugotovili tudi nekateri drugi avtorji (Vaclavikova in sod., 2013).

### *2.1.3. Po posameznih skupinah mikotoksinov/skupin mikotoksinov*

Kot prikazano v Tabelah 3a, 3b in 3c ter na Sliki 2 je bila najbolj pogosto analizirana skupina mikotoksinov AF, sledili so DON, OTA, ZON in T-2/HT-2. Najmanj pogosto analizirana skupina mikotoksinov je bila FB.

Mikotoksin DON je imel daleč najvišji delež pozitivnih vzorcev znotraj vseh vzorcev v skupini žit (44%) in tudi najvišji delež neskladnih vzorcev (2%). DON je bil najbolj pogosto prisoten mikotoksin tudi v drugih raziskavah (Ibáñez-Vea, Lizarraga, González-Peñas in Lopez de Cerain, 2012; Rodríguez-Carrasco in sod., 2013; Roscoe in sod., 2008). ZON je imel drugi največji delež kontaminacije (16%), z relativno nizkim deležem neskladnosti (0,9%), sledila sta mu FB in OTA z 10% oziroma 1,7% deležem kontaminacije ter 1,2% oziroma 0,4% deležem neskladnosti. T-2/HT-2 toksina sta imela, poleg AF brez pozitivnih rezultatov, najnižji delež kontaminacije (4,1%). Za T-2/HT-2 najvišje dovoljene vsebnosti EU niso določene.

Pšenični izdelki so bili najpogosteje kontaminirani z DON (69%, 5% neskladnih) in ZON (24%). Koruzni izdelki so bili najbolj pogosto kontaminirani s FB (24%, 3% neskladnih), ovseni izdelki s T-2/HT-2 (43%) in DON (46%), ajdovi izdelki z DON (24%) in ZON (12%), rženi izdelki z DON (65%), ječmeni izdelki z DON (73%) in ZON (46%, 9% neskladnih) in ostali proizvodi na osnovi žit z DON (8%).

## **2.2. Povprečna koncentracija mikotoksinov med pozitivnimi vzorci**

V tabelah 4a in 4b smo zbrali povprečne koncentracije pozitivnih vzorcev skupaj s standardnimi deviacijami (SD), najvišjo vsebnostjo (Max.) in številom pozitivnih vzorcev, glede na skupino žit. Kjer so vzorci obstajali, smo skupine žit naprej razdelili na zrna, ki predstavljajo nepredelana živila in na izdelke, ki so predelani, kot so npr. moka (glej tudi Tabelo 1).

Glede na obstoječe podatke iz Tabel 4a in 4b je možna primerjava povprečnih koncentracij mikotoksinov med različnimi žitnimi izdelki le za DON in ZON. Visoke vrednosti SD, ki so bile običajno višje od povprečnih koncentracij, so posledica velike variabilnosti podatkov za izračun povprečja in kot razloženo v prejšnjih poglavjih, relativno majhnega števila vzorcev, kar je zmanjšalo statistično vrednost. Koruza in koruzni izdelki so imeli skoraj trikrat višje povprečne koncentracije DON-a in skoraj 23-krat višjo koncentracijo ZON-a kot pšenica in pšenični izdelki. Vsi drugi žitni izdelki, podani v tabelah 4a in 4b, so imeli 2 ali večkrat nižjo povprečno koncentracijo DON-a in podobno koncentracijo ZON-a (razen ječmena in ječmenih izdelkov), kot pšenica in pšenični izdelki. Povprečne koncentracije mikotoksinov nepredelanih žit v različnih žitnih izdelkih, so bile v povprečju dva do 14 krat višje za DON in ZON, kot v predelanih žitnih proizvodih, kar je primerljivo z rezultati



drugih raziskav (EC, 2003; EFSA, 2011a; EFSA, 2013b; Vaclavikova in sod., 2013). Največje razlike med povprečnimi koncentracijami mikotoksinov v nepredelanih in predelanih izdelkih, so bile pri koruzi in koruznih izdelkih za FB, DON in ZON, ter v pšeničnih izdelkih za ZON. Koruzna zrna so izstopala med vsemi žiti glede visokih povprečnih koncentracij FB z 6404 µg/kg, DON-a z 1872 µg/kg in ZON-a z 1225µg/kg, kar vse presega najvišje dovoljene vsebnosti, ki jih določa EU (4000 µg/kg, 1750 µg/kg oziroma 350 µg/kg) (EC, 2006b).

Čeprav je bil med vzorci koruze in koruznih izdelkov mnogo nižji delež pozitivnih vzorcev, nižji delež neskladnosti in koruza in koruzni izdelki predstavljajo manjšo porabo kot pšenica in pšenični izdelki (Glej poglavje 2.1), bi lahko koruza in koruzni izdelki veliko prispevali k izpostavljenosti slovenskega prebivalstva mikotoksinom, zaradi relativno visoke povprečne koncentracije mikotoksinov v koruznih zrnih.

Tabela 4a: Koncentracije mikotoksinov OTA, FB in T-2+HT-2 v pozitivnih vzorcih žit in žitnih izdelkov iz slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Mikotoksin (µg/kg)	OTA				FB (FB1+FB2)				T-2+HT-2			
	Št.	Povpre čje	±SD	Max	Št.	Povpre čje	±SD	Max	Št.	Povpre čje	±SD	Max
<b>Skupno</b>	4	2,7	2,1	5,8	8	4092	9538	27483	6	66	54	147
Skupna zrna	2	3,9	2,8	5,8	5	6404	11890	27483	6	66	54	147
Skupni izdelki	2	1,6	0,8	2,1	3	238	102	304				
<b>Pšenica in pšenični izdelki, vključno s piro</b>	2	3,9	2,8	5,8								
Pšenična zrna	2	3,9	2,8	5,8								
<b>Koruzna in koruzni izdelki</b>					8	4092	9538	27483				
Koruzna zrna					5	6404	11890	27483				
Koruzni izdelki					3	238	102	304				
<b>Oves in ovseni izdelki</b>									6	66	54	147
Ovsena zrna									6	66	54	147
<b>Ajdovi izdelki</b>	1	2,1		2,1								
<b>Drugi izdelki na osnovi žit</b>	1	1,0		1,0								

Tabela 4b: Koncentracije mikotoksinov DON in ZON v pozitivnih vzorcih žit in žitnih izdelkov iz slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Mikotoksin (µg/kg)	DON				ZON			
	Št.	Povpre čje	±SD	Max	Št.	Povpre čje	±SD	Max
<b>Pozitivna žita in žitni izdelki</b>								
<b>Skupno</b>	109	470	1201	11800	36	172	757	4578
Skupna zrna	89	519	1308	11800	31	197	815	4578
Skupni izdelki	20	251	464	2142	5	14	10	31
<b>Pšenica in pšenični izdelki, vključno s piro</b>	55	477	636	3070	19	36	33	113
Pšenična zrna	49	473	622	3070	17	39	33	113
Pšenični izdelki	6	513	808	2142	2	7	0	7
<b>Koruzna in koruzni izdelki</b>	12	1328	3313	11800	6	823	1841	4578
Koruzna zrna	8	1872	4026	11800	4	1225	2237	4578
Koruzni izdelki	4	240	222	546	2	18	18	31
<b>Oves in ovseni izdelki</b>	11	225	200	730	3	38	7	44
Ovsena zrna	10	242	202	730	3	38	7	44
Ovseni izdelki	1	57		57				
<b>Ajdovi izdelki</b>	4	98	40	141	2	13	7	18
<b>Rž in rženi izdelki</b>	11	277	243	650	1	41		41
Ržena zrna	10	295	248	650	1	41		41
Rženi izdelki	1	95		95				
<b>Ječmenova zrna</b>	8	289	212	640	5	79	80	203
<b>Proso in proseni izdelki</b>	4	83	25	117				
Proseni izdelki	3	92	22	117				
Proso	1	56						
<b>Zrna tritikale</b>	1	50		50				
<b>Drugi izdelki na osnovi žit</b>	3	124	57	176				

## 2.3. Primerjava rezultatov z drugimi državami

### 2.3.1 Primerjava deleža neskladnih vzorcev

Rezultate o kontaminaciji z mikotoksini žit in žitnih izdelkov smo primerjali z razpoložljivimi podatki iz raziskave UK iz leta 2009 (UK FSA, 2009) in raziskavami EU iz let 2002–2013 (EC, 2002, 2003; EFSA, 2011a, 2011b, 2013a, 2013b). Zaradi relativno velikih razlik med LOQ-ji različnih raziskav, kot je bilo že razloženo v poglavju 2 (Tabela 2), primerjava kontaminacije med različnimi raziskavami ni bila možna. Izvedli smo le primerjavo neskladnih vzorcev, katere podatki so prikazani v Tabeli 5. Skupino T-2/HT-2 smo izključili iz primerjave, saj najvišje dovoljene vsebnosti EU še ni določila. Pri interpretaciji primerjave deleža neskladnih vzorcev je potrebno imeti v obziru razlike med raziskavami, tako v kvaliteti analitike, kot tudi v številu vzorcev, v vrstah vzorcev vključenih v raziskavo ter tudi razlike v načinu razvrstitve žitnih izdelkov.

Skupno število vzorcev in število vzorcev med skupinami žit v tej raziskavi je primerljivo z raziskavo UK, medtem ko ima raziskava EU na AF (EFSA, 2013a) veliko večje število vzorcev (2183 žit in žitnih izdelkov). Slednja raziskava je vzela vzorce 16-ih evropskih držav, zbranih v letih 2007–2012.

Tabela 5: Primerjava neskladnosti mikotoksinov med državami.

Žita in žitni izdelki	Skupni mikotoksini		AF		OTA		FB		DON		ZON	
	SLO <sup>a</sup>	VB <sup>b</sup>	SLO <sup>a</sup>	VB <sup>b</sup> , EU <sup>c</sup>	SLO <sup>a</sup>	VB <sup>b</sup>	SLO <sup>a</sup>	VB <sup>b</sup>	SLO <sup>a</sup>	VB <sup>b</sup>	SLO <sup>a</sup>	VB <sup>b</sup>
Skupno	2,4 %	3,2%	0%	0,4% <sup>c</sup>	0,4%	0,9%			2,0%	0%	0,9%	1,4%
Pšenica in pšenični izdelki					1,3%	1,3%			5,0%	0%	0%	4,0%
Koruzna in koruzni izdelki			0%	2,7% <sup>b</sup>	0%	0%	2,9%	1,3%	2,9%	0%	2,9%	0%
Oves in ovseni izdelki					0%	0%			0%	0%	0%	0%
Rž in ječmen, ter njuni proizvodi					0%	2,9%			0%	0%	4,0%	0%

<sup>a</sup>Ta študija

<sup>b</sup>(UK FSA, 2009)

<sup>c</sup>(EFSA, 2013a)

Tabela 5 prikazuje naslednje razlike v neskladnostih glede vsebnosti mikotoksinov med slovensko in drugimi raziskavami:

- V celotni skupini žit in žitnih izdelkov je bil nekoliko nižji delež neskladnosti kot v UK.
- Neskladnosti glede vsebnosti AF v Sloveniji ni bilo, v EU pa 0,4%;
- Nekoliko nižji delež neskladnosti za OTA in ZON in višji delež neskladnosti za DON, kot v UK.
  - ⊖ Glede na posamezno skupino žitnih izdelkov ni bilo neskladnosti glede AF v koruzi in koruznih izdelkih v primerjavi z EU, kjer je bila 2,7%;
  - ⊖ Nižji deleži neskladnosti za OTA v rži in ječmenovih izdelkih, ZON v pšeničnih izdelkih, ter višji deleži za FB v koruznih izdelkih, DON v pšeničnih in koruznih izdelkih in ZON v koruznih, rženih in ječmenovih izdelkih, v primerjavi z UK.

### 2.3.2. Primerjava povprečnih koncentracij pozitivnih vzorcev

Rezultati različnih raziskav o povprečnih koncentracijah mikotoksinov v pozitivnih vzorcih v različnih žitnih izdelkih na splošno niso dobro primerljivi, saj se raziskave med seboj razlikujejo v vrstah analiziranih vzorcev, uporabljenih analitskih metodah in v številu vzorcev. Pleadin in sodelavci (2013) so objavili povprečne koncentracije mikotoksinov za pozitivne vzorce žitnih zrn s hrvaških polj. Za detekcijo mikotoksinov so uporabili metodo ELISA in analizirali večje število vzorcev. V primerjavi s slovenskimi podatki iz tabele 4a in 4b, so imeli hrvaški vzorci na splošno višji delež kontaminiranosti in nižje povprečne koncentracije FB (1756 µg/kg), DON (1565 µg/kg) in ZON (187 µg/kg) v koruznih zrnih, nižje povprečne koncentracije DON (223 µg/kg) v pšeničnih zrnih, višje povprečne koncentracije DON (342 µg/kg) in nižje koncentracije ZON (32 µg/kg) v ječmenih zrnih ter podobne koncentracije ZON (56µg/kg, 44 µg/kg) v pšeničnih oziroma ovsenih zrnih. Cano-Sancho in sodelavci (2011) so poročali o povprečnih koncentracijah DON-a v 223 različnih pozitivnih vzorcih žit iz katalonskega trga, ki so jih analizirali z GC-ECD in LC-DAD tehnikami in ki so bile v območju od 12 µg/kg do 246 µg/kg. Slednji rezultati so primerljivi z vrednostmi naše raziskave iz skupine drugih izdelkov na osnovi žit iz Tabele 4b.

## 2.4. Sopotavljanje mikotoksinov znotraj pozitivnih vzorcev

Ocena tveganja hkratnega pojavljanja različnih mikotoksinov predstavlja izziv, saj raziskave kažejo, da imajo lahko mikotoksini sinergistične učinke (Speijers in Speijers, 2004). Podatke o sopojavljanju mikotoksinov v pozitivnih vzorcih te raziskave smo zbrali v Tabeli 6. Med vsemi pozitivnimi vzorci (116) je 35% vzorcev vsebovalo hkrati 2 ali 3 različne mikotoksine. Najbolj pogosta kombinacija je bila DON-ZON (65%), sledila je DON-T-2/HT-2 (10%), FB-DON in FB-DON-ZON (obe 7,5%) in DON-ZON-T-2/HT-2 (5%). Najmanj pogoste kombinacije so bile DON-OTA (2,5 %) in DON-ZON-OTA (2,5 %).

Tabela 6: Sopotavljanje mikotoksinov med pozitivnimi vzorci žit iz slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

Št. in deleži (%) sopojavljanja mikotoksinov			Skupno		Pšenica in pšenični izdelki		Koruzna in koruzni izdelki		Oves in ovseni izdelki		Ajda in ajdovi izdelki		Rž in rženi izdelki	
DON	ZON		26	65%	16	89%	2	25%	1	14%	2	100%	1	100%
DON	T-2/HT-2		4	10%					4	57%				
DON	FB		3	7,5%			3	38%						
DON	FB	ZON	3	7,5%			3	38%						
DON	ZON	T-2/HT-2	2	5,0%					2	29%				
DON	OTA		1	2,5%	1	5,6%								
DON	OTA	ZON	1	2,5%	1	5,6%								
Vsota			40		18		8		7		2		1	
Št. pozitivnih vzorcev na mikotoksine in odstotki sopojavljanja (%)			116	34%	57	32%	14	57%	11	64%	5	40%	11	9%

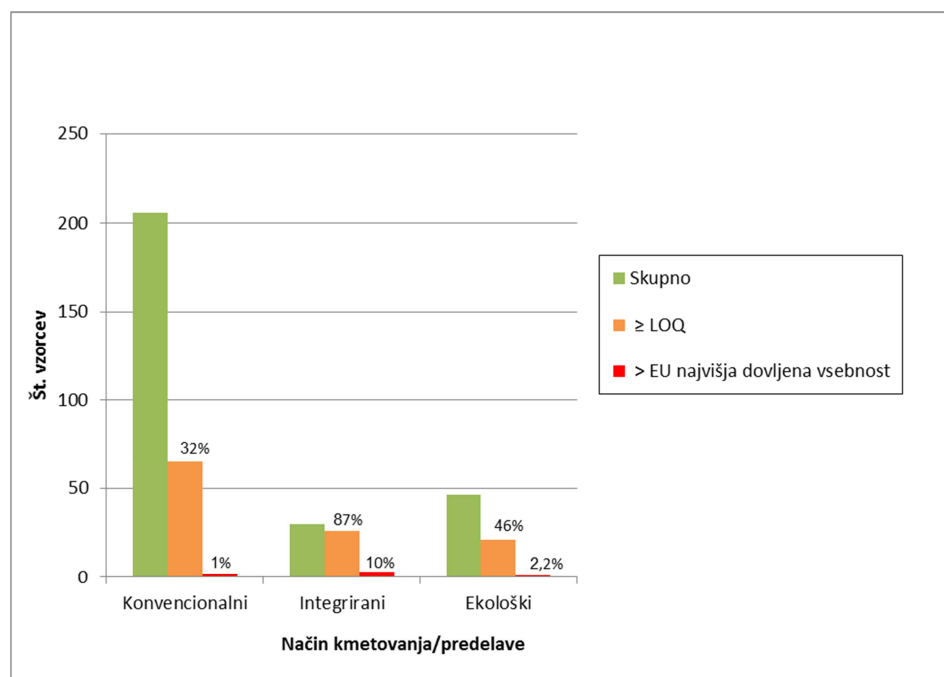
Upoštevaje posamezne skupine žitnih izdelkov in vključujoč samo pozitivne vzorce je bilo sopojavljanje najbolj pogosto pri ovsu in ovsenih izdelkih (64%), pri katerih je bila najbolj pogosta kombinacija DON-T-2/HT-2 (57%), sledili sta DON-ZON-T-2/HT-2 (29%) in DON-ZON (14%). V primeru koruze in koruznih izdelkov je bilo sopojavljanje prisotno pri 57% vseh pozitivnih vzorcev koruze, z najpogostejšimi kombinacijami FB-DON (38%), FB-DON-ZON (38%) in DON-ZON (25%). Pri pšenici in pšeničnih izdelkih je bilo sopojavljanje mikotoksinov med pozitivnimi vzorci 32%, daleč najpogostejša kombinacija je bila DON-ZON (89%), sledili sta DON-OTA (6%) in DON-OTA-ZON (6%). Pri ajdi in ajdovih izdelkih sta bila dva primera sopojavljanja DON-ZON v petih pozitivnih vzorcih. Pri rži in rženih izdelkih je bil samo en primer sopojavljanja DON-ZON med 11 pozitivnimi vzorci.

Druge raziskave so pokazale podobne rezultate sopojavljanja mikotoksinov v vzorcih žit, med katerimi je bila kombinacija DON-ZON najbolj pogosta (Ibáñez-Vea in sod., 2012; Jakovac-Strajn, Pavšič-Vrtač, Ujčič-Vrhovnik, Vengušt, in Tavčar-Kalcher, 2010; Marques, Martins, Costa, in Bernardo, 2008).

## 2.5. Vpliv načina kmetovanja/predelave

Vzporedno z analiziranjem vzorcev žit se je v okviru uradnega nadzora v Sloveniji v letih 2008–2012 za vsak vzorec sledilo tudi načinu kmetovanja/predelave. V Sloveniji obstajajo tri metode kmetovanja: konvencionalno, integrirano in ekološko. Pri konvencionalnem načinu kmetovanja je dovoljena uporaba vseh dovoljenih kemikalij in tehnik kmetovanja. Pri integriranem načinu kmetovanja se agrotehnični ukrepi izvajajo v ravnovesju z ekološkimi faktorji, kjer imajo naravne metode zaščite rastlin prednost pred drugimi konvencionalnimi ukrepi in je regulirano z nacionalno zakonodajo (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije, 2004). Ekološki (bio) način kmetovanja ureja Uredba Sveta (ES) Št. 834/2007 o ekološki pridelavi in označevanju ekoloških proizvodov (Uredba Sveta, 2007). Izvor obravnavanih integriranih izdelkov je bil tako le slovenski, medtem ko so običajni in ekološki izdelki izvirali tudi iz drugih držav, kot smo opisali že v poglavju 2.

Na Sliki 3 smo zbrali podatke o deležu kontaminacije in neskladnosti vzorcev, ki so bili pridobljeni s konvencionalnim, ekološkim in integriranim načinom kmetovanja. Pričakovano je bila večina vzorcev konvencionalnega izvora (71% 206 vzorcev), 16% ekološkega in 10% integriranega. Število vzorcev, pridelanih z ekološkim in integriranim načinom kmetovanja, je bilo majhno (46 oziroma 30), kar omejuje statistično značilnost rezultatov, ki izhajajo iz teh števil.



Slika 3: Deleži kontaminacije z mikotoksini in neskladnosti glede na način kmetovanja/predelave žit in žitnih izdelkov, vzorčenih v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012.

S Slike 3 je razvidno, da je največji delež kontaminiranih vzorcev izviral iz integriranega načina kmetovanja (87%, 26/30 vzorcev); slednji vzorci so imeli tudi največji delež neskladnosti (10%, 3/30). Po deležu kontaminiranih vzorcev je sledil ekološki način kmetovanja (46%, 21/46 vzorcev), z 2,2%

(1/46) neskladnimi vzorci. Najmanj kontaminirani (32%, 65/206) in vzorci z najmanjšim deležem neskladnosti (1%, 2/206) so bili pridobljeni s konvencionalnim načinom kmetovanja/predelave.

Pomanjkanje vzorcev ekološkega in integriranega izvora (7 ali manj) ni omogočalo zanesljivih zaključkov po posameznih skupinah žit in žitnih izdelkov. Le pri skupini pšenice in pšeničnih izdelkov, katere poraba med žiti in žitnimi izdelki v Sloveniji je največja, je bilo malo več vzorcev za izračun statistike (12 integriranih, 21 ekoloških in 44 konvencionalnih). Pri pšenici in pšeničnih izdelkih so bili glede deleža vzorcev, kontaminiranih z mikotoksini najugodnejši ekološki izdelki z 62% (13/21) deležem kontaminacije, sledili so jim konvencionalni (73%, 32/44) in integrirani izdelki (83 %, 10/12). Glede deleža neskladnih vzorcev, so bili najugodnejši konvencionalni pšenični izdelki, z deležem neskladnosti 2,3% (1/44), sledili so jim ekološki (4.8%, 1/21) in najmanj ugodni integrirani izdelki z najvišjim deležem neskladnosti (17%, 2/12). Iz rezultatov ne moremo zaključiti, da so ekološki pšenični izdelki glede mikotoksinov ugodnejši kot konvencionalni. Delež kontaminiranih vzorcev je bil pri ekoloških sicer nekoliko nižji kot pri konvencionalnih, delež neskladnih vzorcev pa je bil višji kot pri konvencionalnih pšeničnih izdelkih. Koncentracije ZON v ekoloških izdelkih so bile nižje, koncentracije DON pa višje kot v konvencionalnih izdelkih. Poleg tega je bilo število analiziranih vzorcev razmeroma majhno, tako da je pomen statističnih podatkov, dobljenih iz rezultatov analiz, omejen.

Tabela 7: Povprečne koncentracije mikotoksinov za pozitivne vzorce za vsa žita in žitne izdelke, ter pšenico in pšenične izdelke, glede na način kmetovanja/predelave.

Mikotoksin (µg/kg)	Način kmetovanja	Št. vzorcev	Povprečje	±SD	Max
<b>VSA ŽITA IN ŽITNI IZDELKI</b>					
<b>OTA</b>	Konvencionalni	3	1,7	0,6	2,1
	Neznani	1	5,8	5,8	
<b>FB</b>	Konvencionalni	5	978	1625	3881
	Integrirani	3	9280	27483	15765
<b>DON</b>	Konvencionalni	60	276	287	1600
	Integrirani	26	1026	2319	11800
	Ekološki	19	386	558	2142
	Neznani	4	164	56	222
<b>ZON</b>	Konvencionalni	17	46	63	213
	Integrirani	11	480	1360	4578
	Ekološki	8	17	12	35
<b>T-2+HT-2</b>	Konvencionalni	3	61	51	120
	Integrirani	3	70	67	147
<b>PŠENICA IN PŠENIČNI IZDELKI</b>					
<b>OTA</b>	Konvencionalni	1	1,9		
	Neznani	1	5,8	5,8	
<b>DON</b>	Konvencionalni	32	331	341	1600
	Integrirani	10	866	1123	3070
	Ekološki	11	599	664	2142
	Neznani	2	211	16	222
<b>ZON</b>	Konvencionalni	9	23	14	1600
	Integrirani	4	90	27	113
	Ekološki	6	19	14	35

V tabeli 7 smo zbrali povprečne koncentracije mikotoksinov pozitivnih vzorcev žit in žitnih izdelkov ter pšenice in pšeničnih izdelkov, glede na način kmetovanja/predelave. Za druge skupine žit

povprečne koncentracije zaradi nizkega števila ( $\leq 7$ ) ekoloških in integriranih vzorcev niso podane. Iz Tabele 7 je razvidno, da so vsebovali integrirani vzorci daleč najvišje povprečne koncentracije mikotoksinov (predvsem DON in ZON), tako v celotni skupini žit in žitnih izdelkov kot tudi v skupini pšeničnih izdelkov; v slednji skupini so bile koncentracije od 3 do 10-krat višje kot pri konvencionalnih izdelkih. Ekološki vzorci so imeli rahlo višjo koncentracijo DON in rahlo nižje povprečne koncentracije ZON v primerjavi z vzorci, pridelanimi s konvencionalnim načinom kmetovanja, znotraj celotne skupine žiti in žitnih izdelkov kot tudi med pšeničnimi izdelki. SD-ji so na splošno presežali povprečne koncentracije, kar je posledica velikega sipanja podatkov. Z vidika povprečnih koncentracij mikotoksinov lahko zaključimo, da so bili najmanj ugodni integrirani izdelki, sledili so jim ekološki za DON in konvencionalni za ZON.

Razlogi za zgornje rezultate bi lahko bili v manjši uporabi pesticidov v integriranem in ekološkem načinu kmetovanja, v primerjavi s konvencionalnim. Predvsem bi k temu lahko prispevala manjša uporaba fungicidov, ki zniža kontaminacijo s plesnimi v času gojenja na polju in skladiščenja. Integrirano kmetovanje, ki je posebnost Slovenije in ekološko kmetovanje, sta pod strožjim nadzorom kot konvencionalno kmetovanje, zlasti glede uporabe pesticidov (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije, 2004; Uredba Sveta, 2007). Obstajajo številna poročila o višji kontaminaciji z mikotoksini pri ekološkem kmetovanju, kot pri konvencionalnem (Ok, Choi, Chang, Chung in Chun, 2011; Lo Magro, Campaniello, Nardiello in Muscarella, 2011; Serrano in sod., 2013), vendar tudi poročila z nasprotnimi rezultati (EFSA, 2011a; EFSA, 2011b, Ibáñez-Vea in sod., 2012). Zaradi pomanjkanja podatkov, kar je značilno tudi za našo raziskavo, so rezultati o vplivu načina kmetovanja/predelave v mnogih primerih statistično neznačilni, zaradi česar tudi končnih in zanesljivih zaključkov ni mogoče podati (EFSA, 2011b).

Glede na rezultate naše raziskave bi bilo v prihodnosti koristno pridobiti več statistično značilnih rezultatov o mikotoksinih v slovenski ekološki in integrirani proizvodnji žit, ter preučiti vzroke za potencialno višjo vsebnosti mikotoksinov v teh dveh načinih proizvodnje. Tovrstni ukrepi bi lahko zmanjšali vsebnost mikotoksinov v žitnih izdelkih v prihodnosti, kar je pomembno za zaščito vseh potrošnikov, tudi tistih, ki verjamejo, da kupovanje dragih organskih in integriranih žitnih proizvodov pomeni uživanje bolj zdrave hrane.

### **3. Zaključki**

V tej raziskavi smo zbrali rezultate o mikotoksinih v 290-ih žitih in žitnih izdelkih, ki so bili analizirani v okviru slovenskega uradnega nadzora v letih 2008–2012. Skupno je 40% vzorcev vsebovalo enega ali več mikotoksinov, pri 2,4% je bila EU najvišja dovoljena vsebnost presežena. Zaradi relativno visokega deleža pozitivnih vzorcev, neskladnosti, povprečnih koncentracij pozitivnih vzorcev in velike porabe pšenice in pšeničnih izdelkov ter zaradi relativno visokih koncentracij mikotoksinov v pozitivnih vzorcih koruznih izdelkov, lahko ocenimo, da lahko pšenični in koruzni

izdelki med vsemi žiti in žitnimi izdelki prispevajo največ k izpostavljenosti slovenskega prebivalstva mikotoksinom. Med vsemi mikotoksini je DON vseboval najvišji delež pozitivnih in neskladnih rezultatov. Najbolj pogosta kombinacija sopojavljanja v vseh vzorcih je bila DON-ZON, predvsem v pšeničnih izdelkih. V bodoče bi bila koristna razširitev raziskave na vsebnost mikotoksinov v integriranih in ekoloških žitnih izdelkih, zaradi pridobitve statistično značilnih rezultatov in da bi našli vzroke za potencialno višjo vsebnost mikotoksinov v teh izdelkih, v primerjavi s konvencionalnimi, kar bi lahko privedlo k dolgoročnemu zmanjšanju vsebnosti mikotoksinov. Raziskava ne kaže ekstremno pozitivnih ali negativnih odstopanj od primerljivih EU rezultatov in s tega vidika ti rezultati ne povzročajo večjih ali manjših skrbi za zdravje potrošnikov glede izpostavljenosti mikotoksinom preko žit in žitnih izdelkov. Iz raziskave zaključujemo, da obstaja potreba po nadaljevanju in izboljševanju kontrole mikotoksinov v žitnih izdelkih na slovenskem trgu tudi v prihodnosti.

## Reference

- AOAC International. (1999). Official Method of Analysis 999.07. Aflatoxin B1 and total aflatoxins in peanut butter, pistachio paste and paprika powder.
- Běláková, S., Benešová, K., Čáslavský, J., Svoboda, Z., & Mikulíková, R. (2014). The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in Czech malting barley, *Food Control*, 37, 93–98.
- Breidbach, A., Povilaityte, V., Mischke, C., Doncheva, I., van Egmond, H., & Stroka, J. (2008). JRC Scientific and Technical Reports: Validation of an Analytical Method to Determine the Content of T-2 and HT-2 Toxins in Cereals and Baby Food by Immunoaffinity Column Clean-up and GC-MS. Results of the collaborative study, EUR 23559 EN – 2008. Annex III: Foodstuffs – Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals, baby food and animal feed – GC-MS method with immunoaffinity clean-up.
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Burdaspal, P., Legarda, T. M., & Ramos, A. J. (2011). Presence of trichotecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain), *Food Control*, 22, 490–495.
- Cano-Sancho, G., Ramos, A. J., Marín, S., & Sanchis, V. (2012). Presence and co-occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in gluten-free and ethnic foods. *Food Control*, 26, 282–286.
- Council Regulation. (2007). Council Regulation (EC) No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. *Official Journal of European Union*, L 189, 1–23. Available at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:189:0001:0023:EN:PDF> Accessed 10.02.14.
- Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27, 187–198.



- EC (European Commission). (2002). Reports on Tasks for Scientific Cooperation. Reports of experts participating in Task 3.2.7. January 2002. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. Available at [http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf) Accessed 03.02.14.
- EC (European Commission). (2003). Reports on Tasks for Scientific Cooperation. Reports of experts participating in Task 3.2.10. April 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Available at <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf> Accessed 03.02.14.
- EC (European Commission). (2006a). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of European Union, L 70*, 12–34. Available at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:EN:PDF> Accessed 31.03.2014.
- EC (European Commission). (2006b). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of European Union, L 364*, 5–24. Consolidated version at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20121203:EN:PDF> Accessed 31.01.14.
- EC (European Commission). (2013). Commission Recommendation No 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of European Union, L 91*, 12–15. Available at <http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?val=724583:cs&lang=en&list=734501:cs,724583:cs,705526:cs.&pos=2&page=1&nbl=3&pgs=10&hwords=&checktexte=checkbox&visu=#texte> Accessed 31.01.14.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011a). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*, 9(6):2197. 1–124. doi:10.2903/j.efsa.2011.2197. Available at <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2197.pdf> Accessed 03.02.14.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011b). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal* 2011;9(12):2481. 1–187. doi:10.2903/j.efsa.2011.2481. Available at <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/2481.pdf> Accessed 03.02.14.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013a). Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products. Supporting Publications 2013:EN-406. 1–11. Available at <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/406e.pdf>. Accessed 03.02.14.

- EFSA (European Food Safety Authority). (2013b). Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA Journal* 2013;11(10):3379. 1–56. doi:10.2903/j.efsa.2013.337. Available at <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3379.pdf>. Accessed 03.02.14.
- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101–134.
- Ibáñez-Vea, M., Lizarraga, E., Gonzáles-Peñas, E., & Lopez de Cerain, A. (2012). Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from northern region of Spain. *Food Control*, 25, 81–88.
- ISO. (1998a). ISO 15141-1:1998(en). Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in cereals and cereal products — Part 1: High performance liquid chromatographic method with silica gel clean up. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (1998b). ISO 15141-2:1998(en). Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in cereals and cereal products — Part 2: High performance liquid chromatographic method with bicarbonate clean up. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2003). ISO 16050:2003(en). Foodstuffs — Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, and the total content of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in cereals, nuts and derived products — High-performance liquid chromatographic method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jakovac-Strajn, B., Pavšič-Vrtač, K., Ujčič-Vrhovnik, I., Vengušt, A., & Tavčar-Kalcher, G. (2010). Microbiological and mycotoxicological contamination in Slovenian primary grain production. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 8, 1151–1563.
- Juan, C., Ritieni, A., & Mañes, J. (2013). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chemistry*, 141, 1747–1755.
- Lo Magro, S., Campaniello, M., Nardiello, D., & Muscarella, M. (2011). Assessment of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> levels in commercial maize-based food products by liquid chromatography with fluorimetric detection and postcolumn chemical derivatization. *Journal of Food Science*, 76, T1–T4.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- Marques, M. F., Martins, H. M., Costa, J. M., & Bernardo, F. (2008). Co-occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in crops marketed in Portugal. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1, 130–133.
- Ministry of Agriculture, Forestry and Food of the Republic of Slovenia. (2004). Rules concerning the integrated production of arable crops. *Official Journal of the Republic of Slovenia*, No. 10/2004 (changes: 45/2008 and 110/2010). Available at <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV4491> Accessed 10.02.14.

- Montes, R., Segarra, R., & Castillo, M. (2012). Trichothecenes in breakfast cereals from the Spanish retail market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(1), 38–44.
- Ok, H. E., Choi, S. W., Chang, H. J., Chung, M. S., & Chun, H. S. (2011). Occurrence of five 8-ketotrichothecene mycotoxins in organically and conventionally produced cereals collected in Korea. *Food Control*, 22, 1647–1652.
- Pimentel, D., Marklein, A., Toth, M. A., Karpoff, M. N., Paul, G. S., McCormack, R., Kyriazis, J., & Krueger, T. (2009). Food versus biofuels: environmental and economic costs. *Human Ecology*, 37, 1–12.
- Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., & Cole, M. B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food Control*, 32, 205–215.
- Pleadin, J., Vahčić, N., Perši, N., Ševelj, D., Markov, K., & Frece, J. (2013). *Fusarium* mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*, 32, 49–54.
- RASFF (European Commission Rapid Alert System for Food and Feed). (2014). Available at [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm) Accessed 14.02.14.
- Rocha, M. E. B., Freire, F. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36, 159–165.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Ruiz, M. J., Font, G., & Berrada, H. (2013). Exposure estimates to *Fusarium* mycotoxins through cereals intake. *Chemosphere*, 93, 2297–2303.
- Roscoe, V., Lombaert, G. A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio, J., Kitchen, D., Kottelo, S., Krakalovich, T., Trelka, R., & Scott, P. M. (2008). Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: A 3-year survey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25, 347–355.
- Rubert, J., Soriano, J. M., Mañes, J., & Soler, C. (2013). Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 387–391.
- Serrano, A. B., Font, G., Ruiz, M. J., & Ferrer, E. (2012). Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry*, 135, 423–429.
- Serrano, A. B., Font, G., Mañes, J., & Ferrer, E. (2013). Emerging *Fusarium* mycotoxins in organic and conventional pasta collected in Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 259–266.
- Speijers, G. J. A., & Speijers, M. H. M. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 91–98.
- Statistical Office of the Republic of Slovenia. (2014). [Supply balance sheet for cereales \(1000t\), calendar year, Supply and use, Cereals, Human consumption \(net\) Slovenia, annually](#) (2008–2012). *SI STAT portal*, Available at <http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> Accessed 06.02.14.

- The European Parliament and the Council. (2002). Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Union*, L31, 1–24. Consolidated version at <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20090807:EN:PDF> Accessed 04.02.14.
- UK FSA (United Kingdom Food Standards Agency). (2009). Analysis of Mycotoxins in Foods: Four Year Surveillance Programme (Year 1). Report Number : C03067. November 2009. Available at [http://www.foodbase.org.uk//admintools/reportdocuments/609-1-1028\\_C03067\\_Analytical\\_Report.pdf](http://www.foodbase.org.uk//admintools/reportdocuments/609-1-1028_C03067_Analytical_Report.pdf) Accessed 03.02.14.
- Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2013). 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry*, 136, 750–757.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129–144.

## **Cilj 2: Razvoj metode (LC-MS/MS) za določanje izbranih mikotoksinov hkrati v silazah in analiza večjega števila vzorcev koruzne in travne silaže s slovenskih kmetij**

### **POVZETEK**

V prehrani goveda pogosto opazimo krmljenje s pokvarjeno oziroma plesnivo silažo. Zadnja leta v Evropi opisujejo porast kontaminiranosti s plesnimi iz rodu *Penicillium* in s toksini, ki jih te plesni proizvajajo.

V Sloveniji je zelo malo podatkov o vsebnosti mikotoksinov v silazah, zato smo v tem delu preiskali 120 vzorcev silaž (60 travnih in 60 koruznih), iz različnih področij Slovenije. S tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) smo določili 16 mikotoksinov (deoksinivalenol-DON, 3-acetil DON, 15-acetil DON, zearalenon, penicilinsko kislino, mikofenolno kislino, ciklopiazonsko kislino, fumonizina B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub>, ohratoksin A, tenuazojsko kislino, rokefortin C, HT-2 in T-2 toksin, gliotoksin in neosolaniol). Večinoma v koruzni silaži in manj v travni silaži (skupaj 77 %) smo v koncentracijah 0,06-5,83 mg/kg ugotovili mikotoksin DON. Zearalenon smo ugotovili le v 23% koruznih silaž (0,06-4,15 mg/kg), penicilinsko kislino (0,01–0,27 mg/kg) pa v 70 % travnih silaž. Mikofenolno kislino (0,05–0,23 mg/kg) smo dokazali v 57 % travnih in 5 % koruznih silaž. Vse koncentracije mikotoksinov smo podali pri 12 % vsebnosti vlage v vzorcu. Gliotoksina in neosolaniola nismo zaznali v nobenem vzorcu.

Prežvekovalci so na mikotoksine manj občutljivi kot druge živalske vrste, saj vampova mikroflora učinkovito razgradi večino zaužitih toksinov. Vendar je prav zaradi nemotenega delovanja vampove mikroflore še posebej pomembno, da v krmi ni mikotoksinov oziroma drugih substanc z antimikrobnimi učinki.

### **SUMMARY**

In cattle nutrition, feeding is often performed with putrid or moldy silage. There are reports indicating that silage in Europe is becoming increasingly contaminated with fungi of the genus *Penicillium* and its toxins in the last few years.

In Slovenia, deficit of data about the presence of mycotoxins in silage is present. Therefore we examined 120 samples of silage (60 grass and 60 maize silage) from different regions of Slovenia. The samples were examined using the liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to determine the presence of 16 mycotoxins (deoxynivalenol, 3-acetyl DON, 15-acetyl DON, zearalenone, penicillic acid, mycophenolic acid, cyclopiazonic acid, fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, ochratoxin A, tenuazoic acid, roquefortine C, HT-2 and T-2 toxin, gliotoxin and neosolaniol).

Mainly in maize silage and (in total 77 %) the mycotoxin DON was discovered in concentrations 0,06–5,83 mg/kg mg/kg. Zearalenone (0,06–4,15 mg/kg) was detected in 23 % of maize silage samples and penicillic acid (0,01–0,27 mg/kg) were detected in 70 % of grass silage samples. Mycophenolic acid (0,05–0,23 mg/kg) was found in 57 % of maize and in 5 %

of samples of maize silage. All concentrations of mycotoxins apply for 12 % moisture content in the sample. Gliotoxin and neosolaniol were not found in any of the samples

Ruminants are generally less susceptible to mycotoxins than other species, as the ruminal microflora effectively degrade most ingested toxins. Thus it is essential that, in order for the ruminal microflora to function normally, forage contains no mycotoxins or other substances with antimicrobial effects.

## 1 OPIS PROBLEMA IN CILJEV

Silaža je eden najpomembnejših virov hrane za govedo tako v Sloveniji kot tudi drugje po svetu. Pogosto je kontaminirana z različnimi vrstami gliv, ki lahko tvorijo mikotoksine in druge neželene sekundarne metabolite (Driehuis in sod., 2008, Rasmussen in sod., 2010). Pri dobri silaži moramo v procesu siliranja doseči anaerobne pogoje in rast mlečnokislinskih bakterij, ki spodbujajo naravno fermentacijo. V takšnih pogojih se pH silaže zniža na vrednost, pri kateri je rast škodljivih bakterij (npr. *Clostridium sp.*) in večine plesni zavrta. Neustrezne razmere med siliranjem, tvorba kondenza, izpostavljanje silaže vročini, deževnici in insektom vodijo do zmanjšanja prehranske vrednosti silaže, neželene rasti toksigenih gliv in produkcije mikotoksinov (Richard in sod., 2009).

Plesnive silaže lahko pri živalih zaradi vdihavanja spor povzročijo obolenja dihal. Zauživanje takšne silaže lahko povzroči motnje v poteku vampove fermentacije, motnje v reprodukciji in poškodbe ledvic. Zaradi stika s kožo se lahko pojavijo bolezenske spremembe tudi na koži in očeh (Amigot in sod., 2006). V zadnjih 30 letih je postalo jasno, da lahko plesni, ki se pogosto pojavljajo v hrani in krmi (tudi v silaži), proizvajajo toksine, imenovane mikotoksini. Le-ti so v preteklosti povzročili hude epidemije tako pri ljudeh kot tudi pri živalih. Mednje štejemo ergotizem, alimentarno toksično alevkijo, stahibotritoksikozo in aflatoksikozo (Pitt, 2000).

Mikotoksini lahko povzročajo akutno in kronično zastrupitev, poleg tega pa lahko delujejo mutageno in teratogeno. Najpogosteje je opisana akutna zastrupitev, pri kateri opazimo zmanjšanje jetrne in ledvične funkcije, kar lahko v skrajnem primeru vodi v smrt. Nekateri mikotoksini vplivajo na sintezo proteinov in na ta način povzročajo občutljivost kože, nekroze in imunske pomanjkljivosti; spet drugi so nevrotoksini, ki v nizkih odmerkih povzročajo mišični drget, v višjih pa možganske okvare ali smrt. Tudi dolgoročne posledice nizkih doz mikotoksinov so različne. Poglavitna posledica kronične izpostavljenosti mikotoksinom je indukcija rakavih obolenj, še posebej na jetrih (Driehuis in sod., 2008).

Najpomembnejši mikotoksini, ki se pojavljajo v krmi so: aflatoksini, deoksinivalenol (DON) in drugi trihoteceni, zearalenon (ZEA), fumonizini, ohratoksin A in ergot alkaloidi. DON ima v krmi največjo prevalenco in sicer med 20 in 100 %. Še posebej pogosto ga najdemo v žitih oziroma v krmnih koncentratih (Driehuis in sod., 2008).

## 1.1 Mikotoksini v prehrani govedi

Prežvekovalci so zaradi pestrosti svojega obroka izpostavljeni velikemu številu različnih mikotoksinov. Zaužijejo jih lahko na paši, z voluminozno krmo in žiti, iz katerih so sestavljene krmne mešanice. Največji del obroka predstavlja voluminozna krma. Zaradi okužbe žit s plesnimi *Fusarium* se lahko njihovi toksini najdejo tudi v silaži. Po drugi strani pa zaradi napak pri siliranju v silaži pogosto najdemo tudi toksine, ki jih izločajo plesni vrste *Penicillium* (PR toksin, patulin, rokefortini, penicilinska kislina, mikofenolna kislina) in *Aspergillus* (aflatoksini, kojinska kislina) (Jakovac-Strajn, 2009).

### 1.1.1 Aflatoksini

Aflatoksini povzročajo akutno in kronično zastrupitev pri živalih in ljudeh. Povzročajo poškodbe jetrnih celic, cirozo jeter in tumorje na jetrih. Imajo tudi teratogene učinke (Pitt, 2000). Izolirani in karakterizirani so bili v času, ko so pogin več kot 100 000 puranov pripisali plesnivi arašidni krmi, ki je vsebovala aflatoksine (Bennett in Klich, 2003). Znani so štirje naravni aflatoksini, ki jih zaradi modre (blue) fluorescence imenujemo B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub>, zaradi zelene (green) pa G<sub>1</sub> in G<sub>2</sub> (Pitt, 2000).

V naravi aflatoksine proizvajajo *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* in *A. nomius*. *A. flavus* in *A. parasiticus* imata veliko afiniteto za oreške in oljna semena, zato so z njima pogosto kontaminirani arašidi, bombažna semena, pa tudi koruza. Sprva so predvidevali, da je invazija plesni največkrat posledica nepravilnega sušenja in skladiščenja pridelkov, danes pa menijo, da je najbolj pomembna invazija plesni pred žetvijo. Pri koruzi je okužba s plesnimi pogosto posledica poškodb, ki jih na rastlini povzročijo insekti, lahko pa plesni napadejo tudi zdrave poganjke. Kljub omenjenemu pa *A. flavus* napade žita skoraj izključno zaradi slabega ravnanja z njimi po žetvi (Pitt, 2000).

Aflatoksini se pri prežvekovalcih hitro in dobro resorbirajo iz prebavil in se presnovijo v biološko aktivne spojine, med drugim tudi v aflatoksin M<sub>1</sub> in M<sub>2</sub>. Toksini se v mleku pojavijo že dvanajst ur po zaužitju in se razmeroma hitro izločijo iz organizma. Pri kravah, ki so 7 dni dobivale aflatoksin B<sub>1</sub>, ga štiri dni po končanem dajanju v mleku niso več našli (Dreihuis in sod., 2008).

### 1.1.2 Ohratoksini

Od toksinov, ki jih izločajo plesni vrste *Aspergillus*, so poleg aflatoksinov zelo pomembni tudi ohratoksini. Njihov primarni tarčni organ so ledvice. Ohratoksin A je nefrotoksičen, hepatotoksičen, imuno supresiven, potencialno teratogen in karcinogen (Bennett in Klich, 2003). Najpogostejše patološke spremembe, ki jih opazimo ob velikih odmerkih, so nekroze renalnih tubulov in periportalnih jetrnih celic. Največjo vlogo ima pri etiologiji nefritisov pri prašičih (Pitt, 2000). Dokazali so ga v krvi in drugih tkivih, tudi v mleku (Bennett in Klich, 2003).

Prvotno je bil opisan kot metabolit *A. ochraceus*, vrste z naravnim habitatom v razpadajoči vegetaciji, semenih, oreških in sadju. *A. ochraceus* je široko zastopan v suhi hrani raznih vrst in v oreških (Pitt, 2000). Prav tako naj bi ohratoksine producirali *A. alliaceus*, *A.*

*auricomus*, *A.carbonarius*, *A.glaucus*, *A. melleus*, *A. niger* in *Penicillium verrucosum* (Bennett in Klich, 2003).

Prežvekovalci so odpornejši proti ohratoksinu A kot neprežvekovalci, saj mikroorganizmi v predželodcih razgradijo mikotoksin. Vendar pride ob nizki vrednosti pH v predželodcih do zmanjšane delovanja mikroorganizmov in posledično do znakov zastrupitve z ohratoksinom A (Jouany in Diaz, 2005).

### **1.1.3 Fumonizini**

Fumonizini se hitro presnavljajo in izločijo iz organizma pri večini živalskih vrst. Znano je, da lahko povzročijo dve akutni bolezni, levkoencefalomalacijo pri konjih in oslih ter edem pljuč pri prašičih. V poskusih na podganah so ugotovili hepatotoksično in hepatokancerogeno delovanje. O vplivu fumonizinov na prežvekovalce je malo podatkov – ugotovili so le zvišane vrednosti aspartat transaminaze in gamaglutamil transferaze pri teletih in jagnjetih (Jouany in Diaz, 2005). Epidemiološko jih povezujejo z rakom na požiralniku pri ljudeh. Nekatere kronične patološke učinke fumonizinov pa bo potrebno še raziskati (Pitt, 2000).

Glavni proizvajalec fumonizinov je *Fusarium verticilloides*, ki je endemična plesen na koruzi po svetu (Pitt, 2000). Poleg tega ga proizvajajo še *F. proliferatum* in *F. nygamai*, pa tudi *Alternaria alternata*. Za razliko od večine drugih mikotoksinov, topnih v organskih topilih, so fumonizini hidrofilni. Zaradi tega so za proučevanje zahtevni (Bennett in Klich, 2003).

### **1.1.4 Trihoteceni**

DON (poznani tudi pod imenom vomitoksin) in nivalenol (NIV) sta dva izmed številnih trihotecenov (T-2 in HT-2 toksin, 3-acetil DON (3-ADON), 15-acetil DON (15-ADON), neosolaniol, satratoksin, verukarin, roridin, diacetoksiscirpenol), ki jih proizvajajo plesni vrste *Fusarium* (Bennett in Klich, 2003).

Koruze in žita v različnih delih Evrope, severne Amerike in Azije so pogosto kontaminirani z DON. Uživanje hrane, ki vsebuje DON, lahko vodi do zdravstvenih težav pri ljudeh in živalih (Vanderbroucke, 2011). Najpogosteje ga proizvaja plesen *F. graminearum*, vrsta, ki je endemična na pšenici in drugih žitih po svetu (Pitt, 2000). Proizvajajo jih še glive iz rodov *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* in drugi (Bennett in Klich, 2003).

Prevelik vnos kontaminirane hrane se pri ljudeh kaže kot akutna slabost, bruhanje, diareja, bolečina v trebuhu, glavobol, vrtenje in vročina. Pri živalih se akutna izpostavljenost DON kot zmanjšana konzumacija hrane in bruhanje, daljša izpostavljenost pa povzroči zaostajanje v rasti in ima negativne učinke na timus, vranico, srce in jetra. Raziskave na miših so pokazale, da lahko DON povzroči skeletne napake in živčne motnje (NTP, 2009). Med farmskimi živalmi so najbolj občutljivejši prašiči, ki krmo z DON odklanjajo že pri koncentraciji 2 mg/kg. Zaradi slabšega prirasta nastajajo velike ekonomske izgube (Vanderbroucke, 2011). Prežvekovalci so na učinke DON precej neobčutljivi, delno verjetno zaradi sposobnosti vampovih mikroorganizmov, ki lahko v 24-ih urah detoksicirajo DON, če ga je v krmi do 10 mg/kg (Rotter in sod., 1996). Majhna toksičnost pri govedu je torej povezana z razgradnjo



epoksi vezi v molekuli toksina v vampovem soku in s hitrim izločanjem spojine v obliki konjugata z glukuronsko kislino s sečem (Jakovac Strajn, 2009).

Krma s koncentracijo 10–20 mg DON/kg krme povzroči manjšo konzumacijo krme, slabše priraste in mlečnost. Molznice so v primerjavi s pitanci in ovcami na DON občutljive že pri nižjih koncentracijah, verjetno zaradi izpostavljenosti večjemu stresu (Morgavi in Riley, 2007).

T-2 toksin povzroča zavračanje krme in gastrointestinalne lezije pri govedu, pri teletih pa so opisali tudi znižanje vsebnosti serumskih imunoglobulinov in določenih proteinov komplementa. Nekateri avtorji poročajo tudi o zmanjšanem številu belih krvnih celic in nevtrofilcev (Jouany in Diaz, 2005).

### **1.1.5 Zearalenon**

Zearalenon (ZEA) je mikotoksin z estrogenim učinkom, ki ga, tako kot trihotecene, proizvaja *F. graminearum*, zato se trihoteceni (prevsem DON) in ZEA v krmi pogosto pojavljajo skupaj (Pitt, 2000). Pri samicah povzroča motnje v plodnosti in mrtvorodenost mladičev, pri samcih pa slabšo kvaliteto semena. Zearalenon in derivati se vežejo na receptorje naravnih estrogenov in povzročijo estrogene učinke. Izločajo se razmeroma hitro z žolčem, blatom in urinom. Pri prežvekovalcih se resorbira iz prebavil in se s pomočjo vampovih mikroorganizmov ali pa kasneje v jetrih, presnovi v  $\alpha$ -zearalenol, ki je okoli štirikrat bolj aktiven kot primarni toksin in  $\beta$ -zearalenol, ki ima manjšo afiniteto za estrogene receptorje, vendar je toksičen za endometrijske celice (Jakovac Strajn, 2009).

### **1.1.6 Ostali mikotoksini, ki se pojavljajo v silaži**

Travna in koruzna silaža sta lahko kontaminirani z rokefortinom C in mikofenolno kislino, ki ju proizvaja *Penicillium roqueforti*. Omenjena plesen je sposobna rasti pri nizkih vrednostih kisika in je najpogostejša kvarljiva plesen silaž (Driehuis in sod., 2008).

Patulin producirajo številne plesni, najprej pa je bil izoliran iz *Penicillium patulum* (zdaj *Penicillium griseofulvum*). Številne študije so bile usmerjene v njegovo antibiotično aktivnost, vendar so kasneje ugotovili tudi njegovo toksičnost. *P. expansum*, modra plesen, ki povzroči gnitje jabolk, breskev, češenj in drugega sadja, v današnjem času najpogosteje izloča patulin. Patulin je toksičen v velikih koncentracijah v laboratorijskih poskusih, vendar pa dokazov za naravno zastrupitev ni (Bennett in Klich, 2003). Pri prežvekovalcih povzroči hude poškodbe živčnega tkiva, ki se kažejo kot ataksija in pareza. Pojavi se lahko tudi hemoragični sindrom in smrt živali (Jouany in Diaz, 2005).

Mikofenolna kislina, ki je prav tako kot zgoraj naštetimi mikotoksini pogosto opisan kontaminant silaž, je fermentacijski produkt *Penicillium brevicompactum* in sorodnih gliv. Odkrili so jo leta 1893 in ji dokazali blag baktericidni učinek. Je inhibitor encima, pomembnega pri sintezi purinskih nukleotidov in tako pri sintezi DNK. Izprazni zaloge gvanozinskih in deoksigvanozinskih nukleotidov, predvsem v limfocitih T in B, kar zavre proliferacijo teh celic. Posledično se zmanjšata celični imunski odziv in tvorba protiteles (Bren in Kandus, 2006).

Preostali mikotoksini, ki so pogosto opisani v silažah, so še PR toksin, rokefortini, penicilinska kislina in kojinska kislina (Miller, 2008, O'Brien in sod., 2006). O načinu

njihovega delovanja danes vemo še zelo malo. Penicilinska kislina, ki se je v preteklosti uporabljala kot antibiotik, povzroča maščobno degeneracijo jeter in nekrozo jetrnih celic pri miših. V farmakoloških študijah pa so ugotovili, da širi krvne žile in ima antidiuretični učinek (Harwig in Munro, 1975).

**Cilj:** Z metodo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), ki smo jo v Sloveniji za dokaz več mikotoksinov hkrati v silaži uvedli prvič, smo dokazali 16 mikotoksinov (DON, 3-ADON, 15-ADON, zearalenon, penicilinsko kislino, mikofenolno kislino, ciklopiazonsko kislino, fumonizina B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub>, ohratoksin A, tenuazojsko kislino, rokefortin C, HT-2 in T-2 toksin, gliotoksin in neosolaniol). Ker takšnih raziskav v Sloveniji še ni bilo smo glede na tuje vire predvidevali, da bodo tudi v slovenski silaži najbolj zastopani rokefortini, presnovki plesni *Penicillium spp.* Rezultati so to hipotezo ovrgli, najbolj razširjen mikotoksin v koruznih silazah je bil DON, v travnih pa penicilinska kislina. Uporaba metode za sočasno določanje mikotoksinov omogoča pridobitev velikega števila podatkov v krajšem času in zmanjša stroške analize za posamezni toksin. Omogoča tudi določanje toksinov, ki jih do sedaj nismo spremljali in na ta način boljši vpogled v stanje onesnaženosti silaž z mikotoksini.

## 2 KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE

Velikokrat z mikotoksini povezujemo le žita in pri tem pozabljamo, da je velik del obroka pri prežvekovalcih sestavljen tudi iz voluminozne krme(seno, slama in silaža), za katerega vemo, da je pogosto kontaminiran z različnimi vrstami plesni, ki se začnejo razvijati že na polju ali pa kasneje med skladiščenjem. Tej problematiki se posveča premalo pozornosti. Eden od vzrokov so verjetno težave, pri katerih naletimo pri vzorčenju silaž. Vsak odvzeti vzorec, ki ga pošljamo v preiskavo mora biti reprezentativen; kar pomeni, da mora imeti lastnosti cele serije. Tega pa pri vzorčenju silaž ne moremo zagotoviti, ker vzorec pogosto jemljemo le na mestu, kjer imamo dostop. Po podatkih iz literature je znano, da so plesni iz rodu *Aspergillus*, *Penicillium* in *Monascus* pogosti kontaminanti silaž (O'Brien in sod., 2006). V zadnjih letih opisujejo, da je silaža najbolj pogosto kontaminirana s plesnijo *Penicillium roqueforti* in s toksini, ki jih omenjena plesen proizvaja. Kot najbolj verjetna vzroka za takšno stanje izpostavljajo spremembe v tehnologiji pridelave krme in povečanje obsega farm. *P. roqueforti* se lahko razvija pri nizkih pH vrednostih in zelo majhni prisotnosti kisika v substratu (Nielsen in sod., 2006, Miller, 2008).

Vrste plesni iz rodu *Penicillium* proizvajajo različne sekundarne presnovke, vključno z rokefortinom, PR toksinom, penitremom A in mikofenolno kislino (Miller, 2008). Škodljivi učinki omenjenih substanc na domače živali še niso v celoti raziskani. V plesnivih silazah sta najpogosteje ugotovljena rokefortin in mikofenolna kislina, PR toksin in patulin pa sta zaradi svoje nestabilne strukture ugotovljena le občasno (O'Brien in sod., 2006). Za vse našteje presnovke je poznano, da sami po sebi niso dovolj toksični, da bi povzročali znake zastrupitve, vendar je njihova toksikologija še nepopolna, poleg tega pa še niso pojasnjeni mehanizmi njihovega medsebojnega delovanja (O'Brien in sod., 2006; Miller, 2008) Kljub

temu, da so v večini raziskav iz plesnive silaže najpogosteje izolirali plesni vrste *Penicillium*, pa v nekaterih raziskavah (Amigot in sod., 2006, Richard in sod., 2009) ugotavljajo, da je v plesnivih silažah največ plesni iz rodu *Aspergillus*. Od njihovih toksičnih presnovkov izpostavljajo aflatoksin B<sub>1</sub> in gliotoksin, ki deluje imunosupresivno. Raziskave v Nemčiji so pokazale pogosto kontaminacijo z rokefortinom C, v ZDA pa je silaža najbolj kontaminirana s PR toksinom. Na Irskem predstavlja balirana travna silaža 30% vse silaže, ki se jo letno pokrmi govedu. Z nedavno opravljeno raziskavo so tudi pri njih ugotovili, da več kot 90 % balirane travne silaže kaže vidne znake plesnivosti. Z laboratorijskimi testi so potrdili visoke vsebnosti toksičnih presnovkov plesni iz rodu *Penicillium* (Miller, 2008, O'Brien in sod., 2006).

Pri delu na terenu opažamo, da so glavne nepravilnosti pri travnih silažah so prepozna košnja, onesnažena trava z zemljo, preveč uvela trava, premalo stisnjene, ovite in poškodovane bale, slabo potlačeni silosi, premajhen in nepravilen odvzem itd. Pri koruznih silažah pogosto opazimo gretje in plesnenje, ki sta največkrat posledica spravila preveč zrele koruze, slabo potlačenih silosov in premajhnega odvzema. Razlog za gretje in plesnenje koruzne silaže je tudi naknadna fermentacija sladkorjev, ki jih je veliko predvsem v silažah iz dolgozelenih hibridov. Žal pa so velikokrat vzroki za težave tudi objektivni in sicer različne nepredvidene situacije npr. trenutne letne vremenske razmere in s tem povezana hranilna vrednost ter bolezni in okužbe rastlin. Na dolgi rok pa moramo upoštevati tudi klimatske spremembe (dolgotrajne suše, razne ujme), ki prav tako zmanjšajo neoporečnost krme.

V krmi je zakonsko reguliran le aflatoksin B<sub>1</sub>, za toksine, ki jih izločajo plesni *Fusarium*, pa so podana le priporočila (Evropska Komisija, 2006a). V okviru uradnega nadzora se analizira razmeroma malo vzorcev, zato v Sloveniji nimamo sistematično zbranih podatkov o onesnaženosti silaž z mikotoksini.

### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 Material**

Raziskave so bile opravljene na 60 vzorcih travne in 60 vzorcih koruzne silaže.

#### **3.2 Metode**

##### **3.2.1 Odvzem in priprava vzorcev**

Za raziskavo smo zbrali vzorce travne in koruzne silaže iz govejih farm po Sloveniji. Vsako farmo smo obiskali dvakrat. Prvič smo vzorčili oktobra 2011, 2012 in 2013, drugič pa aprila 2012, 2013 in 2014 (Tabela 1). Prvo leto smo vzorčili na Štajerskem in Prekmurju (Ptuj, Ormož, Murska Sobota), drugo leto v osrednji Sloveniji (okolica Ljubljane, Grosuplje, Kranj), tretje leto pa na Primorskem (Vipava, Ajdovščina, Postojna).

Tabela 1. Število odvzetih vzorcev travne in koruzne silaže.

	Število vzorcev koruzne silaže	Število vzorcev travne silaže	Skupaj
Štajerska in Prekmurje			
Prvi odvzem 2011	10	10	20
Drugi odvzem 2012	10	10	20
Osrednja Slovenija			
Prvi odvzem 2012	10	10	20
Drugi odvzem 2013	10	10	20
Primorska			
Prvi odvzem 2013	10	10	20
Drugi odvzem 2014	10	10	20
Skupaj	60	60	120

Vzorci silaž smo odvzeli iz koritastih silosov na mestu dnevnega odvzema silaže. Vzorce smo jemali iz sredine silosov, vsaj 0,5 m od vrha, tal in strani. Posamične vzorce smo premešali in naredili končni vzorec, ki je tehtal približno 3 kg. V laboratoriju smo naredili 3 vzorce po 0,5 kg. Del vzorcev smo zmrznili, del pa posušili na 60 °C, zmleli in jih do analiz shranili na 14 °C.

### 3.2.2 Metoda določanja več mikotoksinov hkrati

Mikotoksine (DON, 3-ADON, 15-ADON, ZEA, penicilinsko kislino, mikofenolno kislino, ciklopiazonsko kislino, fumonizina B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub>, ohratoksin A, tenuazojsko kislino, rokefortin C, HT-2 in T-2 toksin, gliotoksin in neosolaniol) smo določili z LC-MS/MS. Mobilna faza A je bila mešanica deionizirane vode, 5 mM amonijevega acetata in 0,5 % očetne kisline, mobilna faza B pa mešanica metanola, 5 mM amonijevega acetata in 0,5 % očetne kisline. Pretok mobilne faze je bil 300 µL/min, injekcijski volumen pa 10 µL. Gradientno mešanje smo izvajali po naslednjem programu: 95 % A, v 4 minutah smo delež zmanjšali na 60 %, v naslednjih osmih minutah pa na 30 %. Ta delež smo zadržali 4 minute, potem pa smo ga v 1,5 minute zmanjšali na 10 %. To razmerje smo zadržali 2,5 minute, nato pa smo ga v 1 minuti spremenili nazaj na 95 % in kolono s to sestavo mobilne faze kondicionirali 4 minute. Temperatura kolone je bila 40 °C, napetost na kapilari 3,4 kV, temperatura odparevanja topila 500 °C, temperatura ionskega izvora 150 °C, napetost kolizijske celice pa 20 V.

Vzorec smo pripravili tako, da smo v 250 ml ekstrakcijsko bučko natehtali 10,0 g zmletga vzorca, mu dodali 100 ml mešanice acetonitrila in deionizirane vode ter stresali na stresalniku eno uro. Vzorec smo prefiltrirali skozi stekleni filtrirni papir in odpipetirali 4,0 ml prečiščenega ekstrakta v vialo ter pri približno 60 °C pod vakuumom, posušili do suhega. Suhi ostanek smo raztopili v 0,5 ml mešanice metanola in vode, prenesli v vialo, centrifugirali in vstavili v aparaturo.

Umeritvene krivulje smo pripravili ločeno, za vsako vrsto matriksa, z merjenjem standardov, pripravljenih v posameznem matriksu. Za pripravo umeritvene krivulje smo dodali primerne volumne standarne raztopine toksinov v prečiščen ekstrakt vzorca. Za vsako

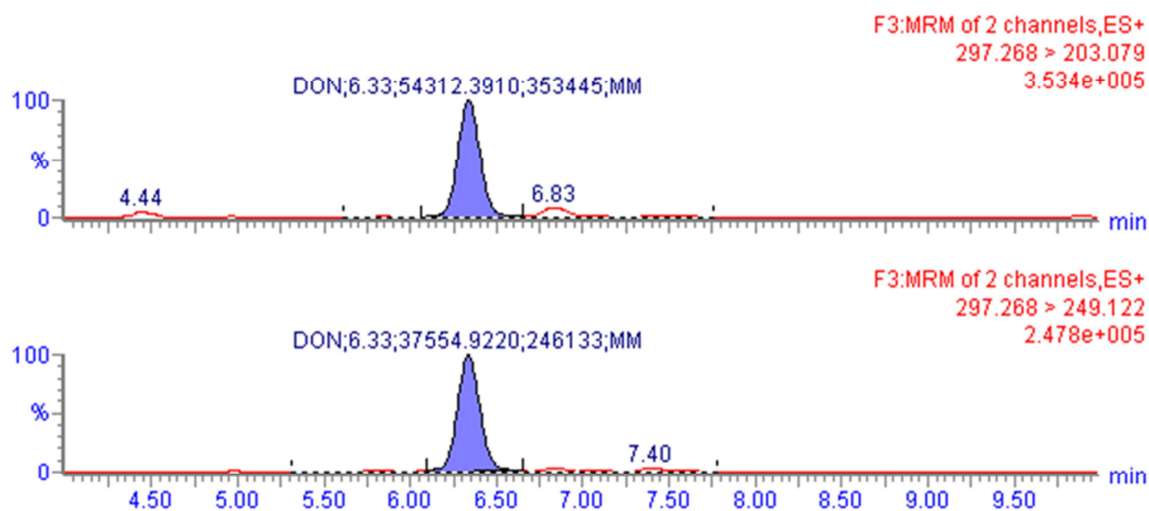
točko umeritvene krivulje smo odpipetirali v vialo 4,0 ml prečiščenega ekstrakta in ustrezen volumen raztopine toksinov. Meja detekcije (Limit of Detection, LOD) in meja kvantifikacije (Limit of Quantification, LOQ) za posamezen mikotoksin je razvidna iz Tabele 2.

Tabela 2. Meje detekcije (LOD) in kvantifikacije (LOQ) mikotoksinov.

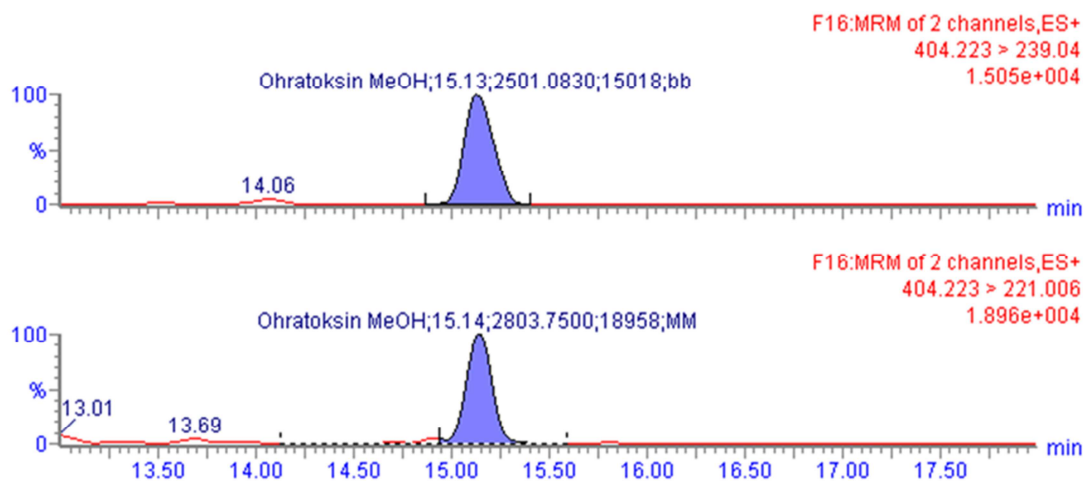
Toksini	LOD [mg/kg]	LOQ [mg/kg]
Ohratoksin A	0,010	0,020
Zearalenon	0,020	0,040
Fumonizin B <sub>1</sub>	0,020	0,040
Fumonizin B <sub>2</sub>	0,020	0,040
DON	0,050	0,100
3-acetil DON	0,050	0,100
15-acetil DON	0,050	0,100
HT-2	0,050	0,100
T-2	0,050	0,100
Neosolaniol	0,050	0,100
Penicilinska kislina	0,025	0,050
Rokefortin C	0,025	0,050
Mikofenolna kislina	0,025	0,050
Tenuazojska kislina	0,025	0,050
Ciklopiazonska kislina	0,090	0,180
Gliotoksin	0,100	0,190

#### 4 REZULTATI

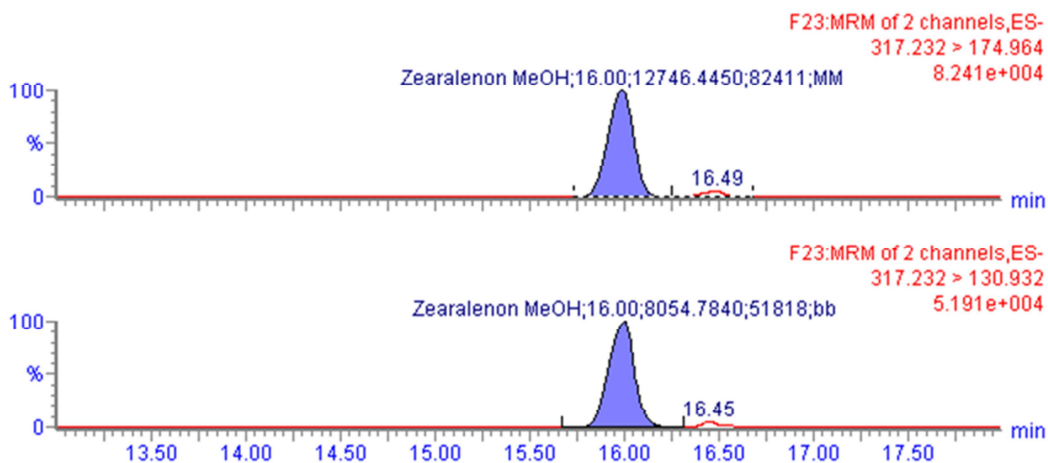
Slike 1–5 prikazujejo kromatograme za posamezen mikotoksin, dobljene pri meritvah z LC-MS/MS. Prikazujejo čas do zaznave določenega mikotoksina oziroma čas, v katerem mikotoksin potuje čez stacionarno fazo.



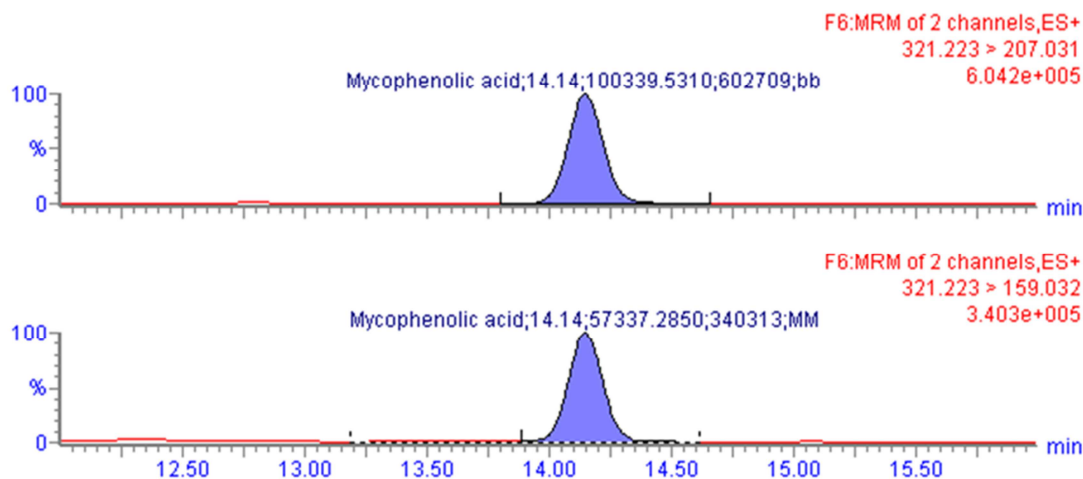
Slika 1. Kromatogram DON.



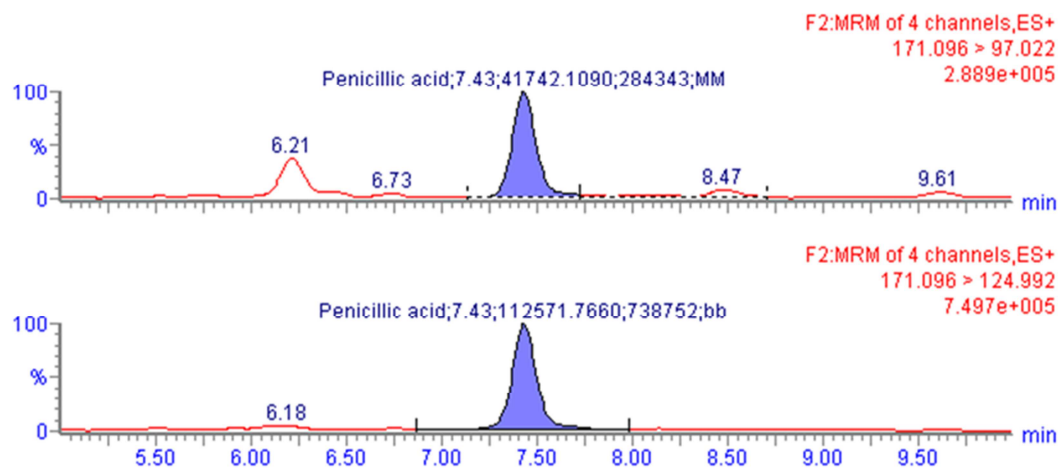
Slika 2. Kromatogram ohratoksin A.



Slika 3. Kromatogram zearalenon.



Slika 4. Kromatogram mikofenolna kislina.



Slika 5. Kromatogram penicilinska kislina.

#### 4.1 Vsebnost mikotoksinov v koruzni in travni silaži

Vsebnosti mikotoksinov po letih in vrstah silaže so predstavljeni v Slikah 6–10. Prikazane so vrednosti, če je vsaj 5 vzorcev in več vsebovalo določen mikotoksin. Bistvenih razlik med odvzemom jeseni in spomladi ni bilo.

Mikotoksini, ki jih v posameznem letu nismo ugotovili, so zbrani v Tabeli 2. Gliotoksina in neosolaniola nismo dokazali v nobenem vzorcu. Iz Tabele 2 razberemo, da je koruzna silaža v vseh letih vsebovala več različnih mikotoksinov kot travna silaža.

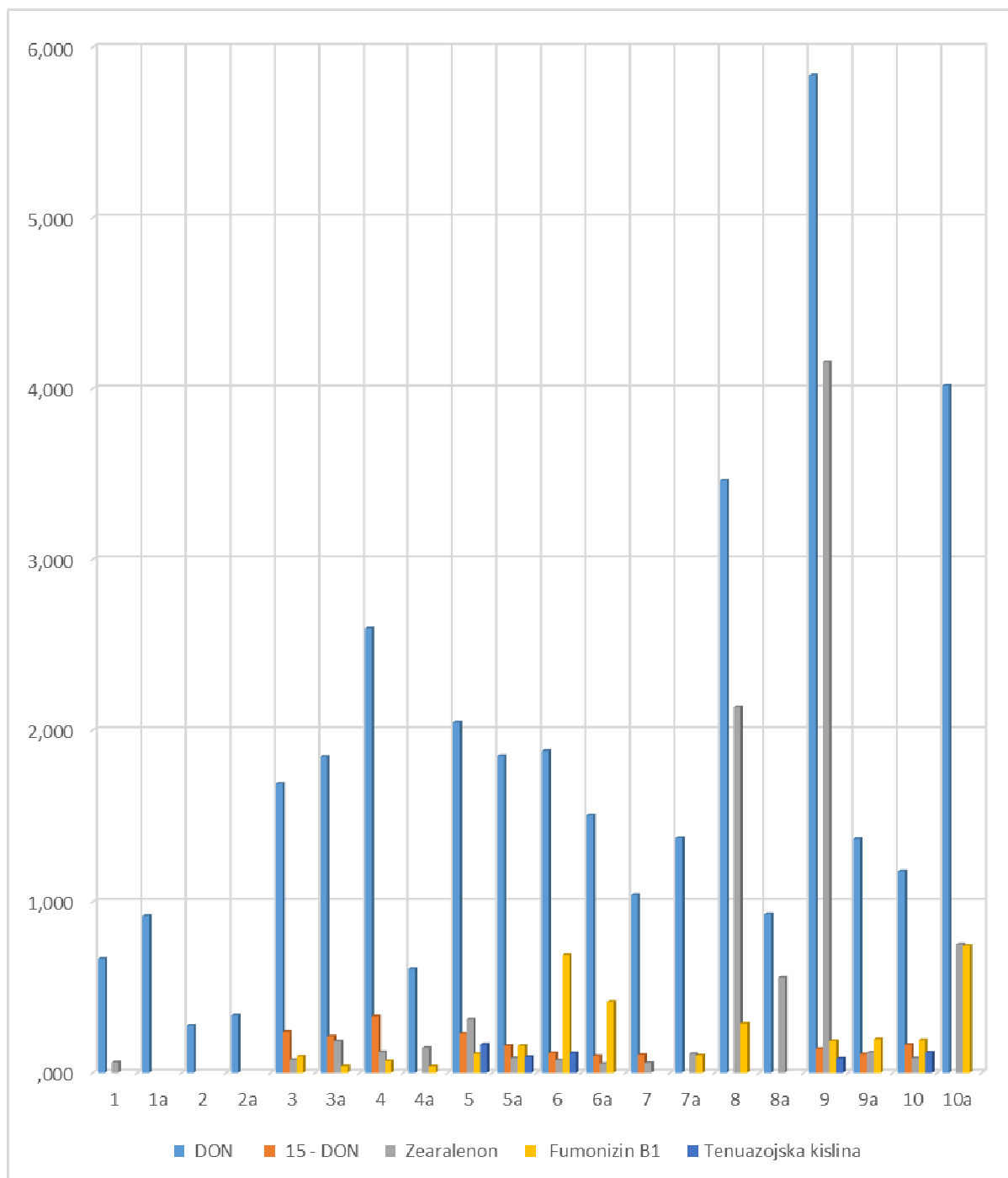
Tabela 2. Mikotoksini, ki jih v posameznem letu v vzorcih silaže nismo ugotovili.

Odvzem	Koruzna silaža	Travna silaža
Oktober 2011, marec 2012 (Štajerska in Prekmurje)	ciklopiazonska kislina, gliotoksin, neosolaniol, ohratoksin A, T-2 toksin	ciklopiazonska kislina, 3-ADON, 15-ADON, gliotoksin, fumonizin B <sub>1</sub> , fumonizin B <sub>2</sub> , neosolaniol, tenuazojska kislina, zearalenon
Oktober 2012, marec 2013 (Osrednja Slovenija)	3-ADON, gliotoksin, fumonizin B <sub>1</sub> , fumonizin B <sub>2</sub> , HT-2, mikofenolna kislina, neosolaniol, ohratoksin A, T-2, zearalenon	ciklopiazonska kislina, 3-ADON, 15-ADON, gliotoksin, fumonizin B <sub>1</sub> , fumonizin B <sub>2</sub> , HT-2, mikofenolna kislina, neosolaniol, penicilinska kislina, rokefortin C, T-2, tenuazojska kislina, zearalenon
Oktober 2013, marec 2014 (Primorska)	3-ADON, 15-ADON, gliotoksin, HT-2, neosolaniol, penicilinska kislina, T-2, zearalenon	3-ADON, 15-ADON, gliotoksin, HT-2, mikofenolna kislina, neosolaniol, ohratoksin A, rokefortin C, T-2, zearalenon



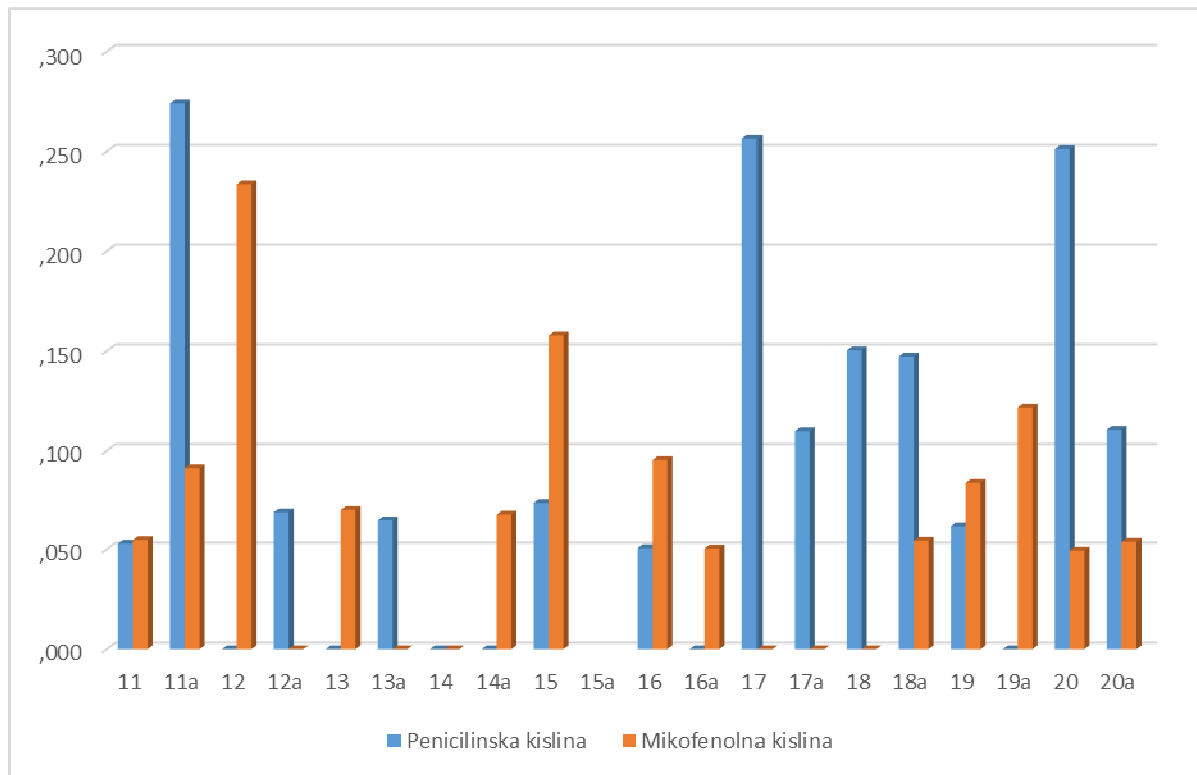
#### 4.2 Vsebnost mikotoksinov v koruzni in travni silaži leta 2011/12 (Štajerska in Prekmurje)

Rezultati so predstavljeni v slikah 6 in 7. V koruznih silažah (Slika 6) je po en vzorec vseboval nizke koncentracije (0,05–0,7 mg/kg) 3-ADON, penicilinske kisline, mikofenolne kisline in rokefortina C. Fumonizin B<sub>2</sub> smo ugotovili v treh vzorcih (0,10–0,7 mg/kg), prav tako toksin HT-2 (0,10–0,36 mg/kg).



Slika 6. Vsebnosti mikotoksinov (mg/kg) v vzorcih koruzne silaže, odvzetih oktobra 2011 (oznake 1–10) in marca 2012 (oznake 1a–10a).

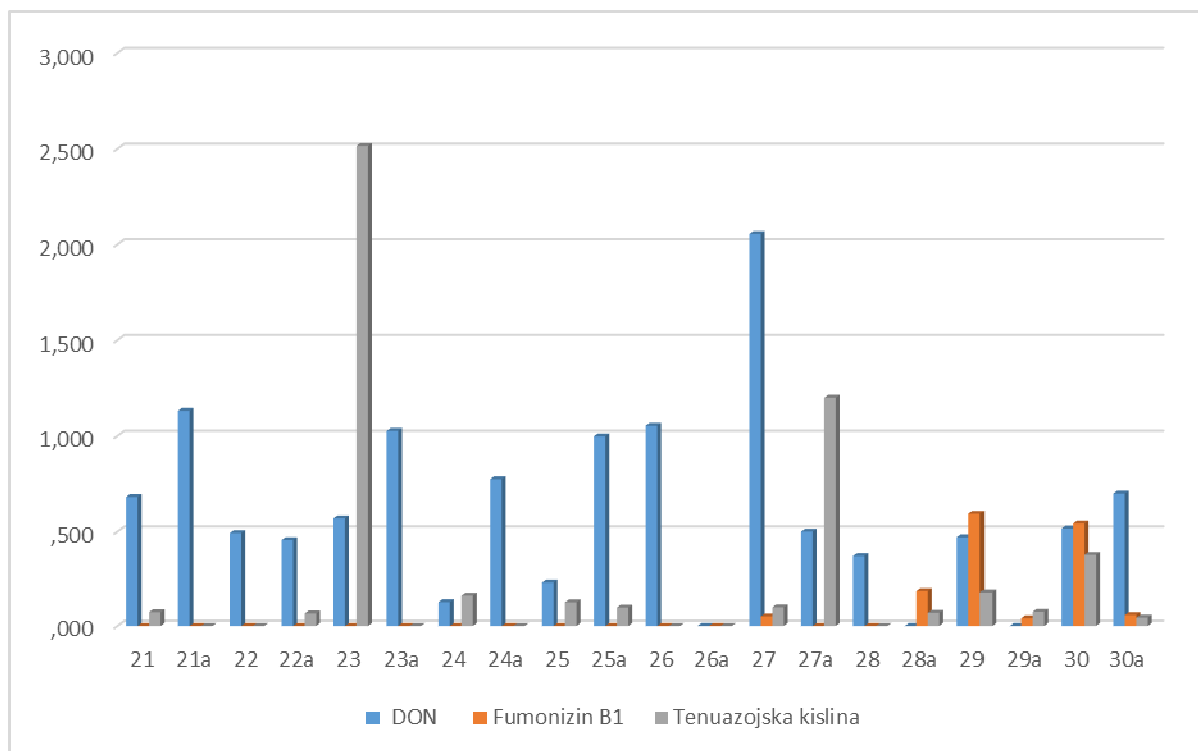
V travnih silazah (Slika 7) smo za razliko od koruznih silaž v več kot petih vzorcih dokazali le dva mikotoksina: DON in penicilinsko kislino. En vzorec je vseboval ohratoksin A (0,02 mg/kg).



Slika 7. Vsebnosti mikotoksinov (mg/kg) v vzorcih travne silaže, odvzetih oktobra 2011 (oznake 11–20) in marca 2012 (oznake 11a–20a).

#### 4.3 Vsebnost mikotoksinov v koruzni in travni silaži leta 2012/13 (osrednja Slovenija)

V vzorcih koruzne in travne silaže smo našli enake mikotoksine: DON, fumonizin B<sub>1</sub> in tenuazojsko kislino.



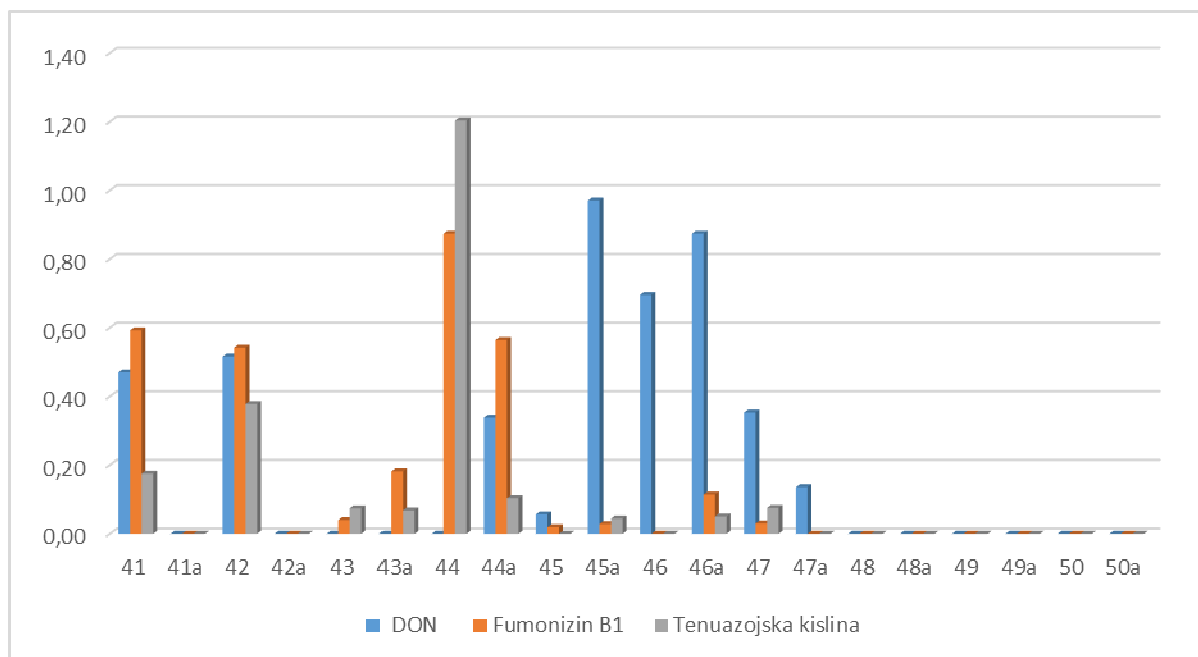
Slika 8. Vsebnosti mikotoksinov (mg/kg) v vzorcih koruzne silaže, odvzetih oktobra 2012 (oznake 21–30) in marca 2013 (oznake 21a–30a).

Nizke koncentracije rokefortina C (1,67 mg/kg) in ciklopiazonske kisline (0,16) je vseboval po en vzorec silaže. Dva vzorca sta vsebovala fumonizin B<sub>2</sub> (0,18 mg/kg) in dva 15-Ac DON (0,31 in 0,28 mg/kg).

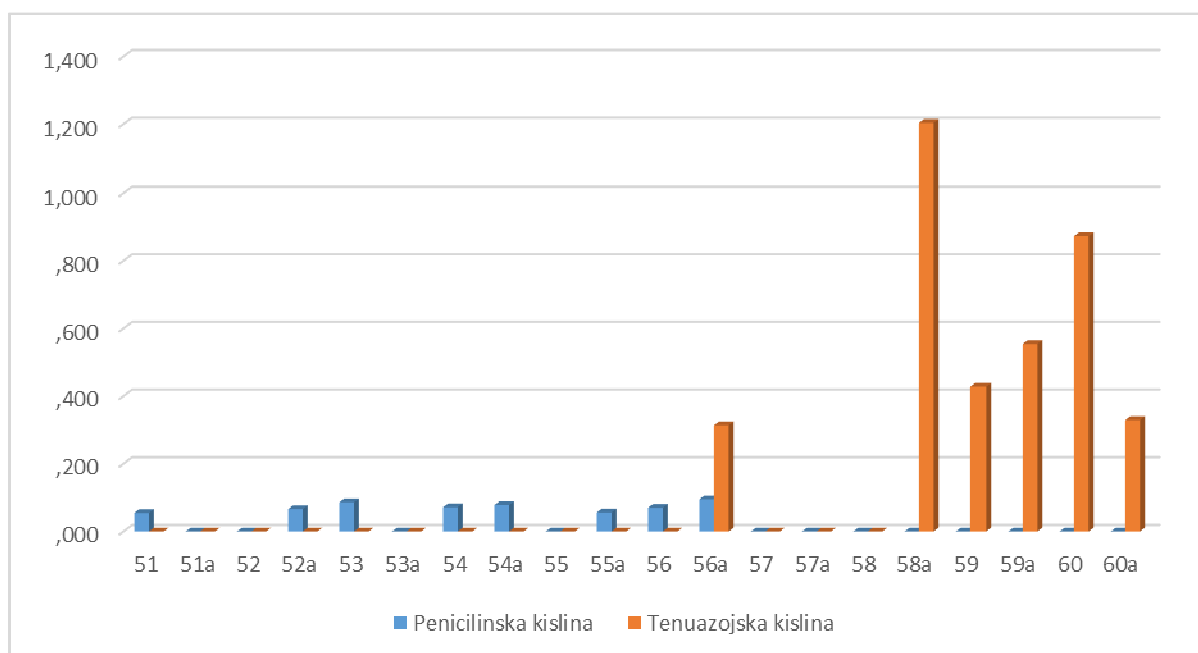
Vsebnosti mikotoksinov (mg/kg) v vzorcih travne silaže, odvzetih oktobra 2012 in marca 2013, ne prikazujemo v grafu, ker nobenega mikotoksina nismo ugotovili v vsaj petih vzorcih. V štirih vzorcih smo ugotovili DON (0,09–0,82 mg/kg). Ohratksin A smo ugotovili v enem vzorcu (0,02 mg/kg), prav tako zearalenon (0,14 mg/kg).

#### 4.4 Vsebnost mikotoksinov v koruzni in travni silaži leta 2013/14 (Štajerska in Prekmurje)

V vzorcih koruzne silaže so prevladovali DON, fumonizin B<sub>1</sub> in tenuazojska kislina, v vzorcih travne silaže pa penicilinska in tenuazojska kislina. V štirih vzorcih smo ugotovili fumonizin B<sub>2</sub> (0,18–0,21 mg/kg), v dveh pa ciklopiazonsko kislino (0,16 in 0,20 mg/kg) in mikofenolno kislino (0,10 in 0,16 mg/kg). Ohratksin A smo ugotovili v enem vzorcu (0,7 mg/kg), prav tako rokefortin C (1,67 mg/kg).



Slika 9. Vsebnosti mikotoksinov (mg/kg) v vzorcih koruzne silaže, odvzetih oktobra 2013 (oznake 41–50) in marca 2014 (oznake 41a–50a).



Slika 10. Vsebnosti mikotoksinov (mg/kg) v vzorcih travne silaže, odvzetih oktobra 2013 (oznake 51–60) in marca 2014 (oznake 51a–60a).

DON smo ugotovili v treh vzorcih (0,13–0,67 mg/kg), ter v enem vzorcu fumonizin B<sub>1</sub> (0,87 mg/kg) in fumonizin B<sub>2</sub> (0,21 mg/kg).

## 5 RAZPRAVA, ZAKLJUČKI IN PRIPOROČILA

Silaže so pogosto kontaminirane z mikotoksini in tudi dobra preventiva ne more preprečiti njihove pojavnosti. V naši raziskavi smo v koruzni silaži ugotovili v treh zaporednih letih na treh področjih Slovenije predvsem DON, fumonizin B<sub>1</sub> in tenuazojsko kislino. Koncentracija toksinov, izražena na 12 % vlago, je bila za DON 0,16–5,7 mg/kg, za fumonizin B<sub>1</sub> 0,02–0,7 mg/kg in za tenuazojsko kislino 0,02–2,5 mg/kg.

V travni silaži smo ugotovili v primerjavi s koruzno silažo druge mikotoksine, poleg tega pa jih je bilo ugotovljenih manjše število. V letu 2012/13 je bila kontaminacija najmanjša, saj niti pet vzorcev ni vsebovalo istega mikotoksina. V letih 2011/12 sta prevladovala penicilinska kislina (0,02–0,2 mg/kg) in mikofenolna kislina (0,02–0,3 mg/kg), v letih 2013/14 pa penicilinska kislina (0,02–0,1 mg/kg) in tenuazojska kislina (0,02–1,2 mg/kg).

Mikotoksini, ki so se pojavili pri večini koruznih silaž, so se pojavili le v nekaj vzorcih travnih silaž in obratno.

Večina vzorcev, ki je vsebovala DON, je vsebovala tudi ZEA, kar ugotavljajo tudi drugi raziskovalci. Na Nizozemskem sta bila DON (povprečna koncentracija 0,273 mg/kg) in ZEA (povprečna koncentracija 0,028 mg/kg) identificirana kot mikotoksina z največjo incidenco v prehrani krav molznic (Dreihuis in sod., 2008). Poleg njiju pa so dokazali tudi visoke vrednosti rokefortina C in mikofenolne kisline, incidenca fumonizinov pa je bila nizka. Druga dva toksina, pomembna za govedo, ohratoksin A in T-2 toksin, sta bila v tej raziskavi dokazana v posameznih vzorcih. Zanimiva bi bila še podatka za aflatoksin B<sub>1</sub>, sterigmatocistin in patulin. Rokefortin C, ki je omenjen kot zelo pogost mikotoksin v silažah, smo dokazali v treh vzorcih koruznih silaž.

Raziskave v Nemčiji so pokazale pogosto kontaminacijo silaže z rokefortinom C (Miller, 2008), v ZDA pa je silaža najbolj kontaminirana s PR toksinom. Na Irskem predstavlja balirana travna silaža 30 % vse silaže, ki se jo letno pokrmi govedu. Z nedavno opravljeno raziskavo so ugotovili, da več kot 90 % balirane travne silaže kaže vidne znake plesnivosti. Z laboratorijskimi testi so potrdili visoke vsebnosti toksičnih presnovkov plesni iz rodu *Penicillium* (O'Brien in sod., 2006).

PR toksina v naši raziskavi nismo določali, ker nam kljub prizadevanju ni uspelo dobiti standarda, rokefortin C pa smo ugotovili le, kot omenjeno, v treh vzorcih koruznih silaž, kar nas je presenetilo. Pričakovali smo večjo koncentracijo omenjenega toksina. Že pri pregledu literature smo ugotovili, da se objavljena dela o vsebnostih mikotoksinov v silažah delijo na tista, ki kot najpogostejše kontaminante navajajo presnovke plesni *Penicillium* (O'Brien in sod., 2006, Mansfield in sod., 2007, Richard in sod., 2009) in na tista, ki navajajo presnovke plesni *Fusarium* (med njimi DON in ZEA) (Amigot in sod., 2006, Dreihuis in sod., 2008). Dobljeni podatki kažejo, da v Sloveniji v koruzni silaži prevladujejo presnovki gliv *Fusarium* (DON, fumonizini), od presnovkov gliv *Penicillium* pa penicilinska kislina in mikofenolna kislina. Tenuazojsko kislino, ki smo jo prav tako pogosto dokazali, najbolj pogosto izločajo glive iz rodu *Alternaria*.

Raziskava, narejena v Vermontu, ZDA je prav tako potrdila, da v koruznih silazah prevladujejo toksini plesni *Fusarium*, predvsem DON. Ugotovili so ga v 63% od 278 vzorcev (Amigot in sod., 2006).

V raziskavi v Pensilvaniji (ZDA) je v 120 preiskanih vzorcih koruzne silaže prevladoval rokefortin C (v 60% vzorcev), v koncentraciji 0,01–5,71 µg/kg, sledila je mikofenolna kislina, ki so jo ugotovili v 42% vzorcev (0,02–1,30 µg/kg). Poleg teh dveh toksinov so dokazali še vsebnost patulina (0,01–1,21 µg/kg) in ciklopiazonske kisline (0,02–1,43 µg/kg) (Mansfield in sod., 2007).

Za DON so najbolj občutljiva živalska vrsta prašiči, saj krmo z DON zavračajo. Za razliko od njih pa do danes njegov učinek na prežvekovalce ni razjasnen. Klinična opazovanja nekaterih čred kažejo na povezavo med DON v krmi in slabim stanjem črede. V nekaterih raziskavah so ugotovili učinek DON na ješčnost živali, mlečnost in sestavo mleka. Koncentracije, pri katerih so ugotavljali omenjene spremembe, so bile 10–20 mg DON/kg krme, kar je veliko več od naših dobljenih koncentracij (Dänicke in sod., 2005; Korostelova in sod., 2007). Vendar naši rezultati niso zanemarljivi, ker danes vemo, da so živali v farmskih razmerah kronično izpostavljene mikotoksinom. Posledica je slabši imunski odziv organizma in večja dovzetnost za okužbe, kar pa skoraj nikoli ne povežemo z učinki mikotoksinov (Korostelova in sod., 2007).

Zadnje raziskave kažejo, da lahko mikotoksini, ki jih izločajo plesni vrste *Fusarium* pri kravah molznicah, s stimulacijo primarnega humoralnega odgovora na specifične antigene, zmanjšajo imunski odziv organizma. Avtorji svetujejo, da bi polaganje okužene krme moralo zato biti minimalno (Korosteleva in sod., 2009).

Krave v obporodnem obdobju so še posebno občutljive na krmo kontaminirano s plesnimi, sporami in mikotoksini. V pozni brejosti, med porodom in na začetku laktacije pride do večjih metaboličnih sprememb. Konzumacija krme je predvsem v obdobju brejosti in prve dni po telitvi, kot posledica stresa, bolečine in hormonalnih sprememb, lahko zmanjšana tudi za 20%. Pogosto se razvijejo ketoze, hipokalcemije in jetrne lipidoze. Sama negativna bilanca pa se še poslabša ob prisotnosti mikotoksinov, ki vplivajo na vampovo mikrofloro (vpliv na vampove bakterije, protozoje) (Fink-Gremmels, 2008).

V Sloveniji je bilo pred nedavnim z namenom ugotavljanja kontaminiranosti žit, ki jih kmetje v Sloveniji pridelujejo in uporabljajo za prehrano živali, preiskano precejšnje število vzorcev žit na vsebnost saprofitskih mikroorganizmov in mikotoksinov. Skupno je bilo onesnaženih 73 % vzorcev, največ z DON (66 %) v koncentraciji od 0,150–14,4 mg/kg, sledili so ZEA (30 %, 20–630 µg/kg), fumonizin B<sub>1</sub> (28 %, 10–4863 µg/kg) in fumonizin B<sub>2</sub> (21 %, 10–1629 µg/kg). Toksina HT-2 in T-2 sta bila ugotovljena v nizki koncentraciji v dveh, aflatoksin B<sub>1</sub> in ohratoksin A pa v enem vzorcu (Jakovac Strajn in sod., 2010). Rezultati omenjene raziskave in tega dela kažejo, da je DON mikotoksin, ki se v Sloveniji pojavlja najpogosteje, tako v žitih kot v silaži.

Vzorci silaž smo na terenu jemali dvakrat, da bi se prepričali, če je bila silaža pri prvem odvzemu manj kontaminirana kot pri drugem. Rezultati niso pokazali nobenih razlik med silažo odvzeto novembra in tisto, ki je bila odvzeta aprila, čeprav je vmes preteklo dovolj časa, da bi se razvilo več plesni. To lahko kaže tudi na dobro siliranje in shranjevanje silaže.

Glede na to, da več kot 90 % mikotoksinov nastane tekom rasti že na polju, je smiselno začeti ukrepati tam. Pomembnih je več okoljskih dejavnikov kot so temperatura, sestava zraka, vlaga, aktivnost vode, pH in kemijska sestava zemlje ter tudi biotski faktorji (insekti, vretenčarji, mikroorganizmi). Priporočena je uporaba rastlin odpornih proti *Fusarium spp.* in primerno kolobarjenje. Ker dež in velika temperaturna nihanja povečujejo možnost nastanka mikotoksinov, jih je treba upoštevati pri žetvi (Aragon in sod., 2011).

Pomembno je tudi zaporedno sajenje določenih rastlin. Če na primer za koruzo posejemo žito je večja verjetnost za kontaminacijo z DON (Obst in sod., 1997).

Čeprav lahko nekatere plesni rastejo tudi v anaerobnih pogojih ali v okolju z zelo malo kisika, ustvarjanje anaerobnih pogojev v silaži zavre rast večino plesni. Pri tem je treba upoštevati dvoje: kompaktnost in pokritost. Kompaktnost zmanjša vsebnost kisika v samem materialu, pokritost pa vzdržuje anaerobne pogoje. Če je silaža dovolj kompaktna bodo kisiku izpostavljene le plasti, ki so v kontaktu z zrakom. Velikost delcev silaže je tesno povezana s kompaktnostjo, pri čemer velja pravilo, da bolj kot je silaža suha, manjši morajo biti njeni delci. Silažo je potrebno pokriti takoj po siliranju s kakovostno plastično folijo namenjeno silaži, saj bo slaba folija prepuščala zrak in tako omogočila rast plesnim ter kasneje produkcijo mikotoksinov (Aragon in sod., 2011).

Čeprav znamo dokazati veliko različnih presnovkov plesni v silazah, kar smo dokazali tudi v tem delu, pa njihovi škodljivi učinki na domače živali še niso v celoti raziskani, prav tako še niso pojasnjeni mehanizmi njihovega medsebojnega delovanja. Penicilinska kislina in tenuazojska kislina, ki smo ju dokazali tudi v naših silazah sta substanci, o katerih v literaturi najdemo zelo malo podatkov. Pripisujejo jima škodljivo delovanje, vendar toksični odmerki še niso ugotovljeni (Wood, 1992, EFSA, 2011).

Obstajajo dokazi, da imajo mikotoksini tudi sinergistični učinek z drugimi metaboliti gliv, metaboliti rastlin, na katerih rastejo plesni ali celo s sestavinami, ki so dodane žitom ali hrani. Študije so pokazale, da je npr. čisti zearalenon manj toksičen od tistega, ki se naravno pojavlja v žitih, kar kaže na prisotnost dodatnih toksičnih substanc v matriksu (NTP, 2009).

Kot smo že opisali, lahko plesni vrste *Penicillium*, med drugim izločajo rokefortine, PR toksin, penitrem A, mikofenolno kislino in andrastin A. Izpostavili bi mikofenolno kislino, ki jo dobro poznajo v medicini, ker jo predpisujejo bolnikom po presaditvi ledvic. Deluje zaviralno na imunski odziv organizma, zato v kombinaciji z drugimi zdravili zmanjša stopnjo zavrnitve presadkov. Nezaželeni stranski učinki so na prebavila in kostni mozeg (Bren in Kandus, 2006). Kot zanimivost naj navedemo rezultate laboratorijskih preiskav iz držav EU, ki so pokazali, da je v vidno plesnivih silazah lahko več kot 20 mg rokefortina C/kg krme ter mikofenolna kislina in andrastin A. V majhnih koncentracijah (0,1–5 mg/kg) so te silaže vsebovale tudi rokefortine A, B in D, festuklavine, markfortin A in agroklavin. Iz vizualno neplesnivih vzorcev, torej takšnih, ki so jih po izgledu in vonju ocenili dobro, pa so izolirali majhne količine mikofenolne kisline in andrastina A (O'Brien in sod., 2006). Pomemben in zanimiv je tudi podatek, da je bilo zdravstveno stanje na kmetijah, kjer smo odvzeli vzorce, dobro.

Glede na to, da je silaža vsako leto drugačna, saj je letina odvisna od vremenskih in drugih pogojev, bi bilo smiselno raziskave nadaljevati in jih ponavljati nekaj let. Le na ta način bi lahko preverili ali se vsebnosti mikotoksinov v vzorcih ponavljajo in jih je mogoče predvideti, ali je njihova vsebnost vsako leto drugačna. Hkrati bi z večletnimi preiskavami

lahko potegnili vzporednice z vplivom vremena ter področja oziroma regije na pojav plesni in posledično vsebnosti mikotoksinov.

## 5.1 ZAKLJUČKI

Po podatkih iz literature so silaže pogosto kontaminirane z mikotoksini, katerih učinke danes še ne znamo v celoti oceniti in predvideti. S preiskavami 120 vzorcev travnih in koruznih silaž, odvzetih na različnih kmetijah v Sloveniji, smo ugotovili:

1. V koruzni silaži smo ugotovili v treh zaporednih letih na treh področjih Slovenije predvsem DON, fumonizin B1 in tenuazojsko kislino. V travni silaži smo ugotovili v primerjavi s koruzno silažo druge mikotoksine, predvsem penicilinsko, mikofenolno in tenuazojsko kislino. Travnna silaža je v primerjavi s koruzno manj kontaminirana.
2. Najbolj zastopan mikotoksin v silažah DON, ki smo ga dokazali v 77 % vseh vzorcev. Sledita mu zearalenon (23 %) in ter mikofenolna kislina (62 %). Rokefortin C smo dokazali le v 3. vzorcih koruzne silaže. Za trditev, da dobljeni rezultati predstavljajo stanje v Sloveniji, bi morali skozi daljše obdobje preiskovati večje število vzorcev.
3. Dobljeni podatki kažejo, da v Sloveniji v koruzni silaži prevladujejo presnovki gliv *Fusarium* (DON, fumonizini), od presnovkov gliv *Penicillium* pa penicilinska kislina in mikofenolna kislina. Tenuazojsko kislino, ki smo jo prav tako pogosto dokazali, najbolj pogosto izločajo glive iz rodu *Alternaria*.
4. Gliotoksina in neosolaniola nismo dokazali v nobenem vzorcu.
5. Metoda LC-MS/MS se je izkazala za uspešno, saj smo z njo dokazali 16 mikotoksinov. Težave so se pokazale pri dokazovanju patulina in kojične kisline, ki ju v tem delu nismo mogli ovrednotiti. Podatek o njuni vsebnosti v silažah (še posebno patulina) je zelo pomemben, zato bo v prihodnosti potrebno ugotoviti, kako ju bomo dokazovali.
6. Uporaba metode za sočasno določanje mikotoksinov omogoča pridobitev velikega števila podatkov v krajšem času in zmanjša stroške analize za posamezni toksin. Omogoča tudi določanje toksinov, ki jih do sedaj nismo spremljali in na ta način boljši vpogled v stanje onesnaženosti silaž z mikotoksini.

## 5.2 PRIPOROČILA

1. Glede na finančno omejenost raziskav v Sloveniji predlagamo, da se raziskave o vsebnostih mikotoksinov v silažah nadaljujejo. V projektu smo vsako leto analizirali 40 vzorcev, pri čemer smo imeli dve možnosti – ali jih odvzamemo po celi Sloveniji ali pa na posameznem področju. Odločili smo se za drugo možnost, poleg tega pa smo se odločili za odvzem jeseni in spomladi na isti kmetiji, da bi zaznali morebiten vpliv skladiščenja. Ugotovili smo, da razlik ni, zato bi se lahko v naslednjih letih osredotočili na posamezno področje ali pa bi vsako leto odvzeli vzorce po Sloveniji,



- kar pomeni manj vzorcev s posameznega področja, vendar je zajetih več področij. Najbolj kontaminirani so bili vzorci s Štajerske in iz Prekmurja.
2. V raziskavo so bile zajete kmetije, kjer pri živalih ni bilo opaznih kliničnih znamenj bolezni. Mogoče bi bilo smiselno, da se v prihodnosti usmerimo na kmetije, kjer imajo zdravstvene težave.
  3. Priporočamo, da se uvedena metoda za določanje več mikotoksinov hkrati izkoristi v nadaljnjih raziskavah in za strokovno operativno delo. V metodo bi bilo smiselno dodati še druge toksine (aflatoksine, bovericin, enine, patulin, sterigmatocistin, andrastin, itd.), kajti v člankih že opisujejo določanje več kot 100 mikotoksinov hkrati. Poudarimo naj, da so te metode opisane raziskovalno, zato ne verjamemo, da bi jih lahko uporabljali v vsakdanji praksi. Izvedljivo pa je, da bi lahko naenkrat dokazovali cca. 25 mikotoksinov.

## Literatura

- Amigot SL, Fulgueria CL, Bottai H, Basilico JC, 2006. New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biol Technol*, 41: 215–224.
- Aragon YA, Rodrigues I, Hofstetter U, Binder EM, 2011. Mycotoxins in Silages: Occurrence and Prevention. *Iran J App Anim Sci*, 1(1): 1–10.
- Auerbach H, 2006. Mould growth and mycotoxin contamination of silages: sources, types and solutions. <http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mould-growth-mycotoxin-contamination-t219/p0.htm> (10.10.2014)
- Benett JW, Klich M, 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16(3): 497–516.
- Bren A, Kandus A, 2006. Mesto mikofenolata v nefrologiji. *Med Razgl*, 45: 301–306.
- Dänicke S, Matthaus K, Lebzien P et al, 2005. 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 Anim Nutr*, 89:303–315.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, Te Giffel MC, 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit Contam B*, 1(1): 41–50.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA J*, 39: 1–27.
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J*, 9(10): 2307.
- Evropska Komisija, 2006. Priporočilo 2006/576/ES o prisotnosti deoksinivalenola, zearalenona, ohratoksina A, toksinov T-2 in HT-2 ter fumonizinov v proizvodih, namenjenih za krmo. *UL EU L* 229, 7–9.
- Evropska Komisija, 2011. Uredba (ES) št. 574/2011 o spremembi Priloge 1 k Direktivi 2002/32/ES Evropskega Parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti za nitrit, melamin, *Ambrosio* spp. ter prenosa nekaterih kokcidiostatikov ali sredstev proti histomonijazi in o konsolidaciji prilog I in II k Direktivi, *UL EU L* 159, 7–24.
- Fink-Gremmels J, 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Addit Contam A*, 25(2): 172–180.

- Fink-Gremmels J, 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet J*, 176: 84–92.
- Harwig J, Munro IC, 1975. Mycotoxins of possible importance in diseases of Canadian farm animals. *Can Vet Jour*, 16 (5): 125–141.
- Jakovac Strajn B, 2009. Pomen plesni v patologiji prehrane pri govedu. V: Podiplomsko izpopolnjevanje veterinarske zbornice, Rogla, 27. in 28. marec 2009. *Zbornik podiplomskega izpopolnjevanja : Rogla, 27. in 28. marec 2009*. Ljubljana: Veterinarska zbornica, sekcija zasebnih veterinarjev praktikov, str. 13–15.
- Jakovac-Strajn B, Pavšič Vrtač K, Ujčič Vrhovnik I, Vengušt A, Tavčar Kalcher G, 2010. Microbiological and mycotoxicological contamination in Slovenian primary grain production. *Toxicol Environ Chem*, 92(8): 1551–1563.
- Jouany JP, Diaz DE, 2005. Effects of mycotoxins in ruminants. In: Diaz DE, ed. *The mycotoxin blue book*. Nottingham: University Press, 295–321.
- Korosteleva SN, Smith T, Boermans HJ, 2007. Effects of feedborne *Fusarium* mycotoxins on performance, metabolism and immunity of dairy cows. *J Dairy Sci*, 90: 3867–3873.
- Korosteleva SN, Smith TK, Boermanst HJ, 2009. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxin on metabolism and immunity of dairy cows. *J Dairy Sci*, 90 (8): 1585–1593.
- Mansfield MA, Jones AD, Kuldau GA, 2007. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology*, 98: 330–336.
- Mansfield MA, Kuldau GA, 2007. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia*, 99 (2): 269–278.
- Miller DJ, 2008. Mycotoxins in small grains and maize: Old problems, new challenges. *Food Addit Contam*, 25 (2): 219–230.
- Morgavi DP, Riley RT, 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feed contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim Feed Sci Technol*, 137: 201–212.
- NTP (National Toxicology Program), 2009. Chemical information Review document for Deoxynivalenol. [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/noms/support\\_docs/deoxynivalenol060809.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/noms/support_docs/deoxynivalenol060809.pdf) (10.10.2014)
- O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC, 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem*, 54: 9268–9276.
- Obst A., Lepschy-von Gleissenthall J, Beck R, 1997. On the etiology of *Fusarium* head blight of wheat in South Germany-Preceding crops, weather conditions for inoculum production and head infection, proneness of the crop to infection and mycotoxin production. *Cereal Res Community*, 25: 699–703.
- Pitt JI, 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*, 53(1): 184–192.
- Rasmussen RR, Storm IMLD, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF, 2010. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 397: 765–776.
- Richard E et al, 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem Toxicol*, 45: 2420–2425.

- Richard E, Heutte N, Bouchart V, Garon D, 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim Feed Sci Technol*, 148: 309–320.
- Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ, 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health*, 48: 1–34.
- Wood GE, 1992. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. *J Anim Sci*, 70: 3941–3949.

### **Cilj 3: Ugotavljanje okuženosti različnih sort/hibridov pšenice in koruze s fuzariozami s poljskimi poskusi in s tem povezane odpornosti ter preučitev arhivskih podatkov in znanstvene literature o pojavljanju fuzarioz na koruzi in žitih v Sloveniji**

#### **1 UVOD**

Na območjih zmernega podnebja koruzo okužuje več vrst gliv iz rodu *Fusarium*. Povzročajo trohnobo korenin, stebel in plesnivost storžev. Zmanjšanje pridelka zaradi okužb v povprečju znaša med 10 in 30 %. Poleg tega so nekatere *Fusarium* vrste sposobne tvoriti mikotoksine, tako na polju kot po spravi pridelka. Največ mikotoksikoloških raziskav je bilo narejenih v zvezi z mikotoksini v zrnju, čeprav so v nekaterih raziskavah ugotovili mikotoksine tudi v trohnečih steblih, okuženih listih in celi rastlini. Slednje lahko predstavlja resno tveganje pri koruzi, ki jo uporabljamo za svežo krmo in silažo.

Prisotnost mikotoksinov v koruznem zrnju povzroča povsod po svetu veliko zaskrbljenost, ker je njihova prisotnost v krmi in hrani pogosto povezana z kroničnimi ali akutnimi mikotoksikozami živine in v manjšem obsegu ljudi. Ocenjeno je bilo, da je 25 % svetovnega pridelka hrane kontaminiranega z mikotoksini, koruza pa je z nekaterimi fuzarijskimi toksini, kot so DON in FB<sub>1</sub>, onesnažena še v večjem obsegu.

Po podatkih doslej izvedenih monitoring raziskav v Sloveniji koruzo najpogosteje okužujejo glive iz vrst *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* in *F. avenaceum*, medtem ko v manjšem obsegu oz. sporadično *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* ter še nekatere druge. Pri nas dominantne vrste naj bi po literaturnih podatkih tvorile pomembne mikotoksine, kot so DON, NIV, ZEN in MON (Milevoj, 2002; Logrieco in sod., 2002) (Preglednica 1).

Podobno kot koruzo tudi žita okužujejo številne fuzarioze. Do sedaj je evidentiranih 12 vrst. Okužujejo predvsem korenine, stebela in zrna žit. Okužbe z njimi povzročajo v povprečju 10 do 40 % izpade pridelka. Poleg tega tudi te fuzarioze pred in po žetvi tvorijo mikotoksine. Z njimi so predvsem močno onesnaženi pridelki pšenice in ječmena, ki kot kulturi predstavljata kar 80 % pridelave žit v Evropi. Ostala vrste žit (rž, tritikala, oves) so manj občutljive na okužbo klasov s fuzariozami in so zaradi tega njihova zrna tudi manj kontaminirana z mikotoksini.

Najpogosteje zastopane *Fusarium* vrste izolirane iz okuženih klasov pšenice v Evropi in pri nas so *F. graminearum*, *F. avenaceum*, in *F. culmorum*, nekoliko manj *F. poae*, *F. equiseti*, v manjši meri oz. sporadično pa se pojavljajo vrste *F. tricinctum*, *F. cerealis*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum* in *F. solani* (Bottalico in Perrone, 2002; Zemljič in sod., 2008) (Preglednica 2).

Kot je razvidno iz prikazanega, tako koruzo kot pšenico okužujejo skoraj identične *Fusarium* vrste, kar omogoča njihovo ohranjanje v ozkem kolobarju koruza-žita in posledično večjo gospodarsko škodo. Slovensko kmetijstvo je živinorejsko usmerjeno, tako da na njivah pretežno gojimo rastline, ki so namenjene živalski krmi (koruza, žita itn.). Ugotovimo lahko, da pri nas v poljedelski pridelavi prevladuje ozek kolobar (koruza, žita) ali v nekaterih primerih celo monokultura (koruza). Predominatni glivni vrsti povzročiteljici fuzarioz tako pri koruzi kot žitih sta *F. graminearum* in *F. avenaceum*, ki tvorita pomembne mikotoksine (DON, NIV; ZEN in MON). Kot tretja pomembna vrsta se pri koruzi pojavlja *F. subglutinans* (MON) pri pšenici pa *F. culmorum* (DON, ZEN).

Zavedati se moramo, da glive rodu *Fusarium* ne živijo samo na rastoči koruzi oz. žitih, temveč se lahko zelo dobro razvijajo kot saprofiti na uskladiščenih pridelkih, silažni koruzi in celo na izdelkih živilske industrije.

**Preglednica 1:** Toksogene *Fusarium* vrste in njihovi najpogostejši mikotoksini na koruzi v Evropi (Logrieco in sod., 2002).

VRSTA	POJAVLJANJE		MIKOTOKSIN
	severni/ centralni del	južni del	
»Rdeče fuzarioze«			
<i>F. graminearum</i>	+++	+	DON, AcDON, NIV, FUS, ZEN
<i>F. subglutinans</i>	++	±	MON, BEA, FUP
<i>F. avenaceum</i>	++	±	MON
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. culmorum</i>	+	-	DON, NIV, ZEN, ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	-	T2, HT2, NOS
<i>F. poae</i>	+	-	DAS, NIV
<i>F. equiseti</i>	+	±	DAS, ZEN, ZOH
<i>F. acuminatum</i>	+	±	T2, NEO
<i>F. verticillioides</i>	+	+	-
<i>F. proliferatum</i>	+	+	-
»Rožnate fuzarioze«			
<i>F. verticillioides</i>	+	+++	FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , FB <sub>3</sub>
<i>F. proliferatum</i>	±	+++	FB <sub>1</sub> , FB <sub>2</sub> , FUP, MON, BEA
<i>F. subglutinans</i>	+++	+	MON, BEA, FUP
<i>F. graminearum</i>	+	±	-
<i>F. culmorum</i>	+	±	-
<i>F. equiseti</i>	+	±	-
<i>F. solani</i>	±	+	-
<i>F. semitectum</i>	±	+	-
<i>F. cerealis</i>	±	±	-
<i>F. sporotrichioides</i>	±	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	+	-

DON= deoksinivalenol, NIV= nivalenol, ZEN= zearalenon, AcDON= monoacetil deoksinivalenol, FUS= fuzarenon-X, MON= moniliformin, BEA= beauvericin, ZOH= zearalenoli ( $\alpha$  in  $\beta$  izomere), DAS= diacetoksiskirpenol, T2= T-2 toksin, HT2= HT-2 toksin, NEO= neosolaniol, FB= fumonizini

**Preglednica 2:** Najpogostejše *Fusarium* vrste na pšenici v Evropi in njihovi mikotoksini (Bottalico in Perrone, 2002).

VRSTA	POJAVLJANJE		MIKOTOKSIN
	severni/ centralni del	južni del	
<i>F. graminearum</i>	+++	+++	DON, NIV, ZEN, AcDON, FUS
<i>F. avenaceum</i>	+++	++	MON, BEA, ENS
<i>F. culmorum</i>	+++	++	DON, ZEN, ZOH, NIV
<i>F. poae</i>	++	+	NIV, BEA, DAS, FUS, ENS
<i>F. equiseti</i>	++	+	DAS, ZEN, ZOH
<i>F. tricinctum</i>	+	+	MON
<i>F. cerealis</i>	+	±	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. sporotrichioides</i>	+	±	T2, HT2, T2ol, NEO
<i>F. acuminatum</i>	±	±	T2, NEO
<i>F. subglutinans</i>	±	-	MON
<i>F. solani</i>	±	-	-
<i>F. oxysporum</i>	±	-	-

DON= deoksinivalenol, NIV= nivalenol, ZEN= zearalenon, AcDON= monoacetil deoksinivalenol, FUS= fuzarenon-X, MON= moniliformin, BEA= beauvericin, ENS= eniatini, ZOH= zearalenoli ( $\alpha$  in  $\beta$  izomere), DAS= diacetoksiskirpenol, T2= T-2 toksin, HT2= HT-2 toksin, T2ol= T-2 tetraol, NEO= neosolaniol

Pojavnost gliv *Fusarium* spp. v pridelkih, krmi in izdelkih živilsko predelovalne industrije je odvisno od številnih dejavnikov okolja kot tudi načina pridelave in skladiščenja (izbor sort, gnojenje, obdelava tal, kolobar, kemično varstvo, tehnologija skladiščenja in obdelave zrnja ipd.).

Nekatere raziskave kažejo, da so zaradi ekstenzivnosti v ekološki pridelavi okužbe pšenice s fuzariozami manj pogoste kot v konvencionalni, vendar pa so v nasprotju s tem ugotovili, da ni razlik v vsebnosti DON in ZEN v zrnju. Glede na majhnost slovenskega kmetijskega prostora se kažejo tendence k povečevanju obsega ekološke pridelave. Žita in izdelki iz žit so danes v Sloveniji osnovni tržni artikli ekološko usmerjenih kmetij. Če bi ugotovili, da pri nas ekološko pridelano žito vsebuje manj mikotoksinov, bi bila to vsekakor tržna priložnost in prednost tako na domačem kot tujem tržišču.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 UGOTAVLJANJE POLJSKE OKUŽENOSTI KLASOV PŠENICE IN VRSTNE ZASTOPANOSTI *FUSARIUM* VRST V ZRNJU RAZLIČNIH SORT PŠENICE IN KORUZE

#### 2.1.1 Poskusne površine

Vsako leto na pridelovalnih površinah Biotehniške šole Rakičan (Prekmurje) in Centra za razvoj kmetijstva in podeželja Jable (centralna Slovenija) izvajajo sortne makroposkuse strnih žit in koruze. V okviru teh poskusov je vsakoletno posejanih vsaj 20 sort pšenice oziroma hibridov koruze. Gre za nabor perspektivnih sort namenjenih pridelavi v Sloveniji, ki se med seboj razlikujejo po ranosti, tipu, izvoru idr. Poskusni lokaciji se me seboj močno razlikujeta po vremenskih razmerah, predvsem količini padavin, ki močno vplivajo na pojavnost fuzarioz. Na poskusnih parcelah izvajajo integriran način pridelave žit in koruze.

#### Podatki o poskusnih lokacijah:

Lokacija **Rakičan** (46°38'N, 16°11'E, nadmorska višina: 184 m) leži v osrednjem delu Prekmurja v bližini Murske Sobotice. Referenčna meteorološka postaja je Murska Sobota, ki je prav tako v Rakičanu v neposredni bližini poskusa. Povprečna dolgoletna srednja temperatura zraka znaša 9,3 °C, najhladnejši je mesec januar s povprečno temperaturo –2 °C, maksimalna povprečna mesečna temperatura 19,5 °C. Povprečna letna količina padavin je v dolgoletnem povprečju znašala 812 mm. Tla na tej poskusni lokaciji so tipična distrična rjava tla na holocenski prodnati naplavini.

Lokacija **Jable** (46°8'N, 14°34'E, nadmorska višina: 305 m) leži v osrednjem delu Ljubljanske kotline v predalpskem klimatskem območju Slovenije. Referenčna meteorološka postaja je Brnik. V dolgoletnem povprečju (1951–94) je srednja letna temperatura znašala 8,5 °C. Najhladnejši mesec je januar s povprečno mesečno temperaturo –2,1 °C, najtoplejši pa julij z 18,8 °C. Na leto povprečno pade 1352 mm padavin. Tla na lokaciji Jable so zmerno oglejena tla na silikatno apnenčasti podlagi.

V raziskavo smo vključili tudi vzorce ekološko pridelane pšenice, da bi ugotovili kakšna je njihova okuženost v primerjavi z integrirano pridelano pšenico. V ta namen smo pridobili reprezentančno število vzorcev ekološko pridelane pšenice, ki izvirajo iz območja v bližini naših poskusnih lokacij (Prekmurje, Gorenjska in osrednja Slovenija), nekaj pa tudi iz drugih pridelovalnih območij.

### **2.1.2 Spremljanje cvetenja in poljsko ugotavljanje okuženosti klasov pšenice**

V mesecu maju in juniju smo v rastnih sezonah 2012-2014 na obeh lokacijah spremljali cvetenje različnih sort pšenice. Zabeležili smo začetek cvetenja, polno cvetenje in konec cvetenja (BBCH 61, 65 in 69). Pridobili smo tudi meteorološke podatke za omenjeni lokaciji.

Za ugotavljanje okuženosti klasov pšenice smo v razvojni fazi BBCH 71-75 (vodena do srednja mlečna zrelost) naključno nabrali 3 krat po 30 klasov posamezne sorte pšenice in po 10 stopenjski skali (Stack in McMullen, 1998) vizualno ocenili okuženost klasov in izračunali povprečno okuženost posamezne sorte s fuzariozami.

### **2.1.3 Identifikacija *Fusarium* vrst na zrnju pšenice in koruze**

Za vsako sorto oziroma hibrid smo po žetvi na obeh lokacijah vzeli reprezentativne vzorce zrnja. Odvzeli smo jih iz 30 kg vreč, za vsako sorto po 2 kg. Polovico odvzetega vzorca smo uporabili za fitopatološko analizo, drugo polovico pa namenili za analizo na mikotoksine. V fitopatološkem laboratoriju smo po metodi, ki jo predpisuje ISTA, ugotavljali povprečno okuženost zrn pšenice oziroma koruze s fuzariozami in določili njihovo vrstno sestavo. Iz dela vzorca namenjenega za fitopatološko analizo smo za vsako sorto/ hibrid naključno odvzeli po 100 zrn, jih površinsko sterilizirali z 1 % raztopino Na-hipoklorita, dobro sprali s sterilno vodo in posušili na sterilnem vpojnem papirju. Po pet zrn smo v sterilnih pogojih v petrijevke premera 9 cm, ki so vsebovale modificiran PDA agar (15 g PDA, 10 g tehnični agar, 0,121 g penicilina G, 0,542 g streptomycin sulfata in dopolnili s destilirano vodo do 1000 ml). Antibiotike smo dodali po avtoklaviranju. Za vsako sorto/ hibrid smo tako uporabili po 20 petrijevk in skupaj fitopatološko analizirali 100 zrn. Tako nacepljene petrijevke smo inkubirali v rastni komori v temi pri 20 °C in 60 % r.v.z. Po deset dnevni inkubaciji smo začeli dnevno pregledovati iz zrn zrastle kolonije gliv z mikroskopom pod 100 in 400X povečavo. Naša opazovanja so bila osredotočena na morfologijo makrokonidijev, prisotnost oz. odsotnost mikrokonidijev ter drugih anatomske morfoloških pokazateljev pomembnih za identifikacijo vrst. Pri tem smo si pomagali z determinacijskimi ključi za vrste rodu *Fusarium* (Gerlach and Nirenberg, 1982; Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006; Summerell et al., 2003).

### **2.1.4 Odpornost različnih hibridov koruze na okužbo s fuzariozami**

Na omenjenih poskusnih lokacijah bomo izmed vseh posejanih hibridov koruze izbrali pet, ki se med seboj razlikujejo po deklarirani občutljivosti na fuzarioze, zrelostnem razredu, tipu zrna (trdinka, zobanka, poltrdinka). V mesecu juliju smo na obeh lokacijah umetno okužili stebela in storže petih izbranih hibridov koruze (BC 416, P9494, Flovita, Futurixx in PR37N01) v fenofazi BBCH 61-69 suspenzijo trosov in micelija treh izolatov *Fusarium graminearum*, pridobljenimi v letu 2011. Ob spravi koruze smo s pomočjo 7-stopenjske ocenjevalne skale ugotavljali občutljivost oz. odpornost posameznih hibridov na umetno okužbo s fuzariozami.

Za umetno okuževanje in ocenjevanje okuženosti smo uporabili metode objavljene v publikaciji Screening Corn for Resistance to Common Diseases in Canada (Reid in Zhu, 2005)

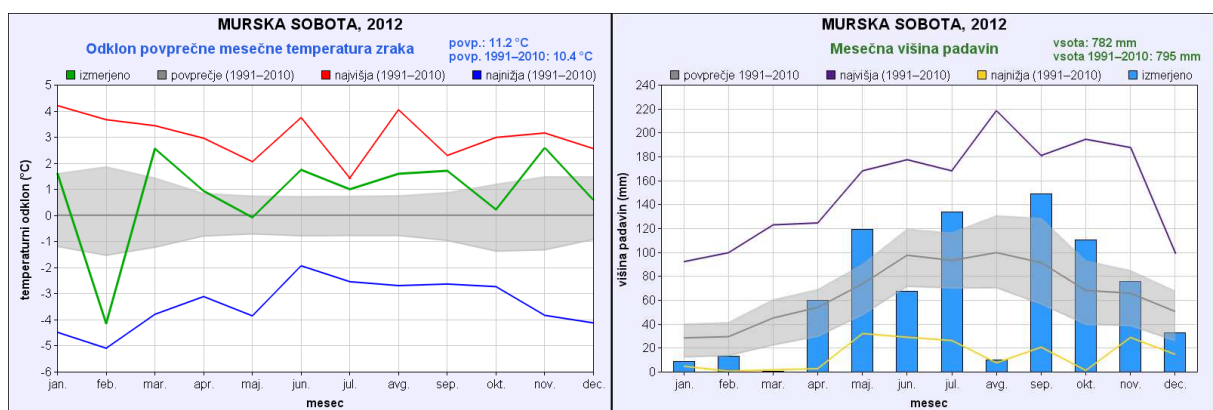
### 3 REZULTATI

#### 3.1 Vremenske razmere v času izvajanja raziskave s podrobnejšim komentarjem o delu rastne dobe pšenice

Poleg komentarja o dejanskih vremenskih razmerah po posameznih letih na poskusnih lokacijah (Rakičan, Jable) so dodane slike, ki prikazujejo izmerjene temperature in padavine po posameznih letih v primerjavi z dvajsetletnim povprečjem (1991–2010). Ker za lokacije, kjer je potekal poskus, primerjav dolgoletnih povprečij s podatki iz tekočega leta nismo mogli pridobiti ali pa jih ni, smo podali le te iz najbližje meteorološke postaje; v primeru Rakičana Mursko Soboto in za Jable podatke iz postaje Ljubljana. V nekaterih primerih prihaja do manjših odstopanj, ki pa bistveno ne odstopajo od dejanskih razmer na poskusnih lokacijah.

#### **Rakičan 2012**

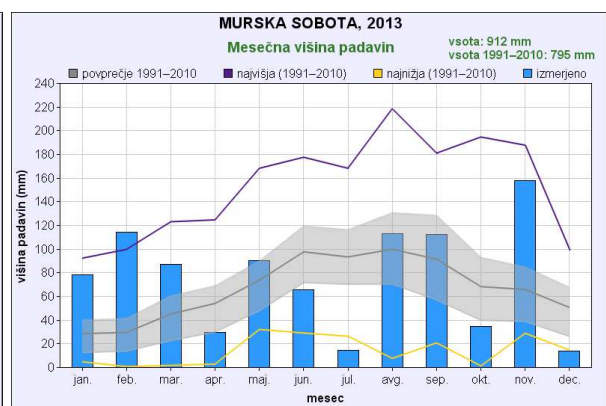
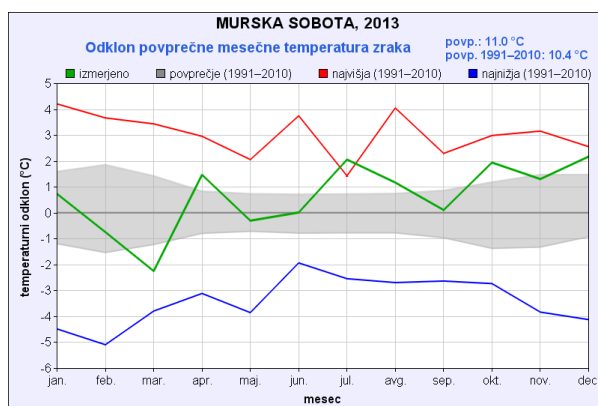
Povprečna mesečna temperatura zraka v maju je bila za 1,4°C višja od dolgoletnega povprečja (1961–1990; 15,8 °C). Vendar je bilo sredi maja, v času cvetenja večine sort pšenice, hladno obdobje s povprečnimi dnevno temperaturo 13,1°C, kar je za 1,6 °C hladneje od dolgoletnega povprečja. Junij je bil toplejši za 3,5 °C od dolgoletnega povprečja. Od konca junija do žetve je bil izrazit vročinski val, ko so bile poprečne dnevne temperature nadpovprečne in so se gibale okrog 25 °C. Maja je padlo 119 mm padavin, kar je za 64 % več od povprečja. Vendar so bile te padavine v obliki nalivov. 23. maja je padlo kar 50 mm padavin. V juniju je padlo 69 % padavin od dolgoletnega povprečja, prva dekada julija je bila prav tako suha.





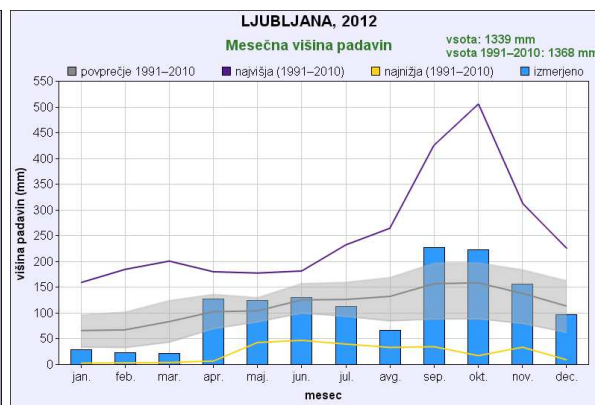
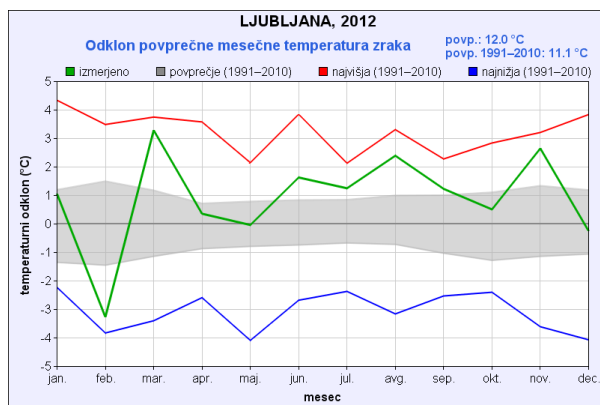
## Rakičan 2013

Razvoj pšenice je v tem letu »zamužala« zaradi nadpovprečno snežene zime in zelo hladnega marca. Maj je bil povprečno topel, z izrazito hladnim obdobjem v zadnji dekadi meseca. Zadnja dekada maja je bila za 2,2 °C hladnejša od dolgoletnega povprečja. Tudi povprečna dnevna temperatura zraka v juniju je bila na nivoju dolgoletnega povprečja, vendar sta bili na začetku in koncu meseca dve izraziti hladni obdobji. Temperature v juliju do žetve so bile na ravni dolgoletnega povprečja. V maju je padlo za 30 % več dežja kot v dolgoletnem povprečju. V juniju je padlo tri četrtine dolgoletne povprečne količine padavin. Deževno obdobje je bilo v prvi pentadi junija, vendar je večina količine padavin padla v treh padavinskih dnevih v zadnji dekadi tega meseca. V juliju je do žetve pšenice padlo le 15 mm padavin in to tri četrtine v enem padavinskem dnevu.



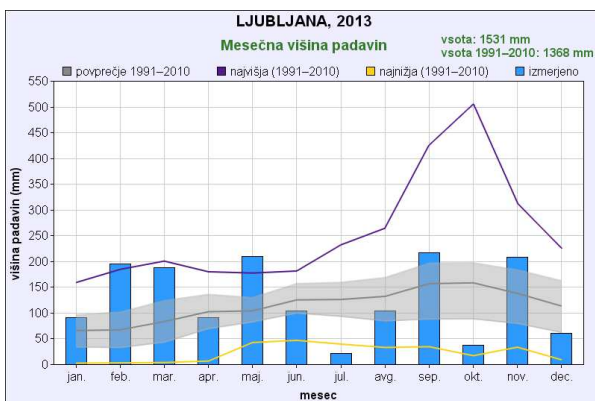
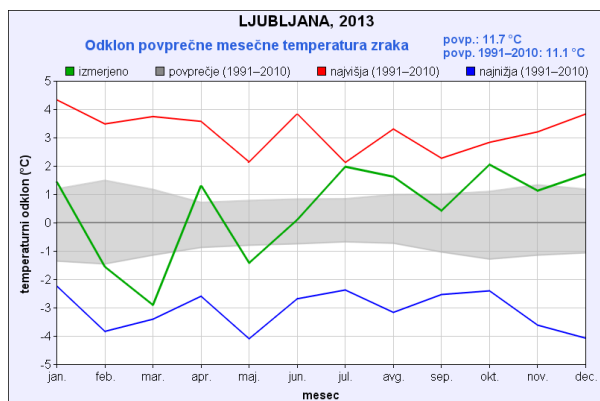
## Jable 2012

Povprečna mesečna temperatura zraka v maju je bila za 1,4°C višja od dolgoletnega povprečja (1961–1990). Vendar je bilo druga dekada maja hladnejša za 0,6 °C dolgoletnega povprečja. Junij je bil toplejši od dolgoletnega povprečja, izstopa predvsem zadnja dekada, ko je bila povprečna temperatura zraka za 3,9 °C višja od dolgoletnega povprečja. Maj je bil povprečno moker, kakor tudi prvi dve dekadi junija, v zadnji dekadi junija pa je padlo le okrog 50 % dolgoletne količine padavin. Prva dekada junija je bila nadpovprečno topla z le 14 % povprečnih padavin.



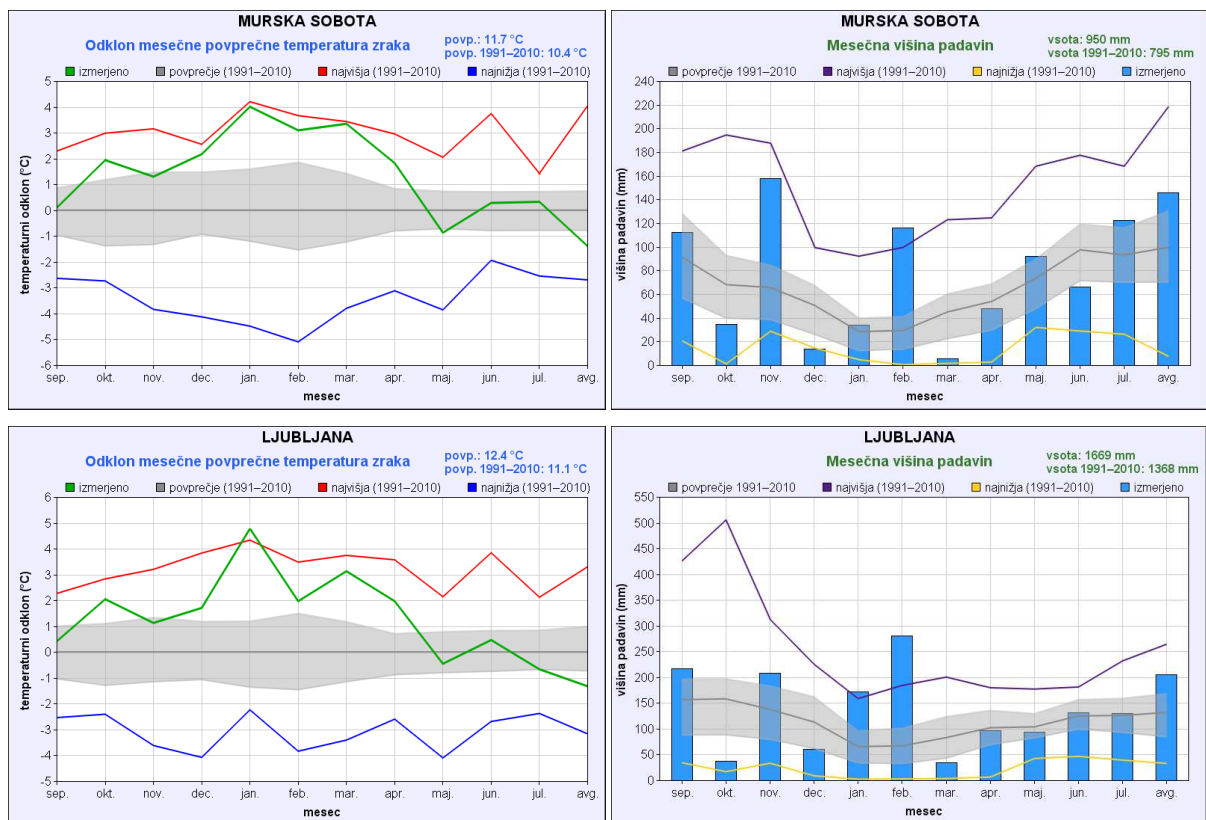
### Jable 2013

Razvoj pšenice je v tem letu »zamužala« zaradi nadpovprečno snežene zime in zelo hladnega marca. Maj je bil povprečno topel, z izrazito hladnim obdobjem v zadnji dekadi meseca. Zadnja dekada maja je bila za 3,1 °C hladnejša od dolgoletnega povprečja. V maju je padlo za 50 % več dežja kot v povprečju, zelo deževna je bila predvsem druga dekada ko je bila količina padavin višja kar za 93 %. Temperature zraka v prvi in drugi dekadi junija so bile na ravni dolgoletnega povprečja, druga dekada je bila za kar za 6,0 °C toplejša od dolgoletnega povprečja. Povprečna temperatura zraka v drugi dekadi junija je bila 22,3 °C. V začetku julija so bile povprečne dnevne temperature za 2,5 °C višje od dolgoletnega povprečja. Količina padavin je bila v prvi dekadi junija na nivoju dolgoletnega povprečja (58 mm), drugi dve dekadi pa sta bili suhi. V prvih dveh dekadah julija je padlo okrog 40 mm padavin v 8 padavinskih dnevih.



### Rakičan in Jable 2014

Kot je razvidno iz spodnjih slik je za leto 2014 za obe lokaciji značilna nadpovprečna topla zima in prvi meseci spomladi, kar se je odrazilo v zgodnejšem cvetenju pšenice, kasneje do žetve pa so se povprečne temperature gibale okoli dolgoletnega povprečja. Za obe lokaciji je značilen izredno suh marec, s količino padavin daleč pod dolgoletnim povprečjem, predvsem v Rakičanu.



### 3.2 Spremljanje cvetenja pšenice

Leta **2012** je pšenica na posestvu Rakičan, odvisno od sorte, cvetela od 8. do 27. maja, v Jablah pa od 16. maja do 5. junija 2012.

Na posestvu Rakičan je leta **2013** pšenica cvetela, odvisno od sorte, od 10. maja do 6. junija, v Jablah pa od 23. maja do 20. junija 2013. Cvetenje je bilo v primerjavi z letom 2012 kasnejše in zamaknjeno v daleč v mesec junij, predvsem zaradi nizkih temperatur in obilo padavin v mesecu maju.

Leta **2014** so v Rakičanu zaradi višjih povprečnih dnevni temperatur najzgodnejše sorte začele cveteti 28. aprila, zadnje pa so odcvetele 12. maja. Cvetenje pšenice se je v Jablah kot običajno začelo nekoliko kasneje, 10. maja, končalo pa 29. maja.

V prilogah 1 do 4 so prikazani podatki o cvetenju posameznih sort pšenice na obeh lokacijah v letih 2012 in 2013 (vodoravne krepke črte, kjer posamezne točke označujejo posamezno fenofazo cvetenja; BBCH 61, 65 in 69). Pokončni sivi stolpci označujejo dneve, ko je padlo več kot 0,1 mm dežja. Na levi ordinatni osi je navedena količina DON (mg/kg), ki je bila analitsko določena v zrnju posamezne sorte po njenem spraviu. Hoteli smo namreč ugotoviti, ali obstaja kakšna povezava med dolžino cvetenja posameznih sort, številom padavinskih dni v času cvetenja in vsebnostjo DON. Že iz samega grafičnega prikaza je razvidno, da ni neke izrazite povezave, kar je kasneje potrdila tudi statistična analiza podatkov.

### 3.3 Okuženost klasov pšenice

S pomočjo 10 stopenjske skale (Stack in McMullen, 1998) smo vsako leto vizualno ocenili okuženost klasov in izračunali povprečno okuženost posamezne sorte s fuzariozami. Hoteli

smo namreč ugotoviti ali obstaja kakšna močna povezava med poljsko oceno okuženosti klasov, laboratorijsko ugotovljeno okuženostjo zrnja in vsebnostjo DON.

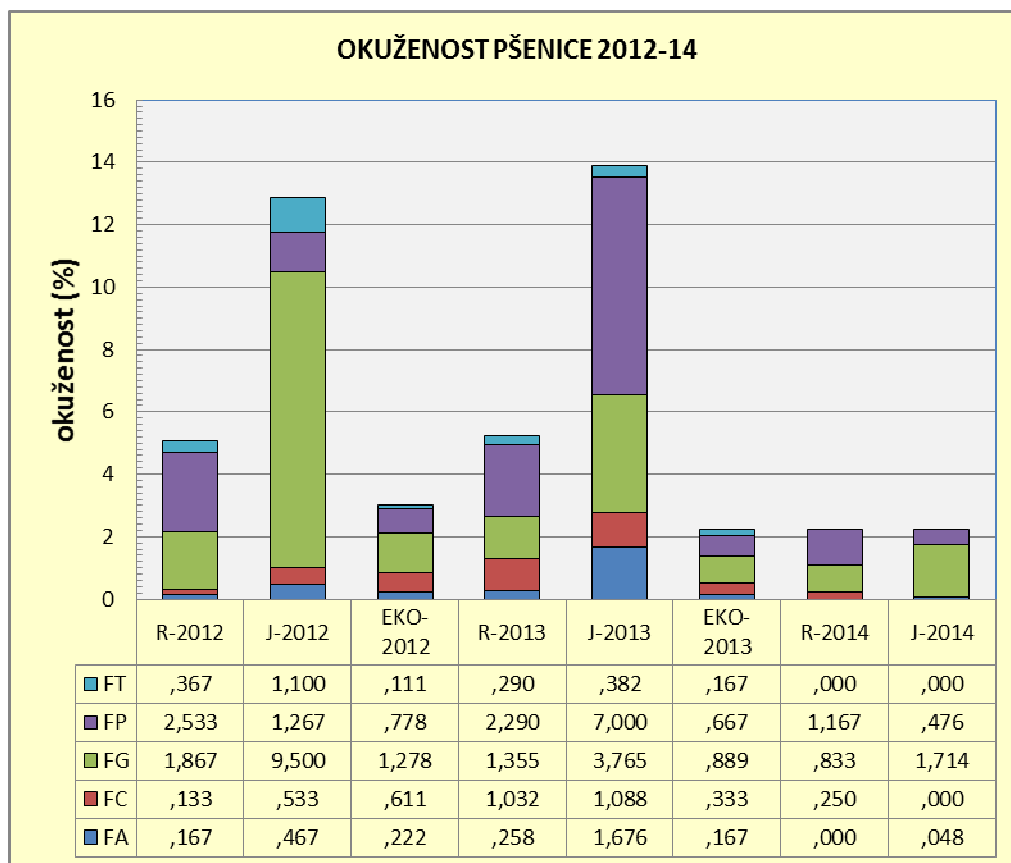
**Preglednica 3:** Povprečna okuženost klasov vseh preučevanih sort pšenice po posameznih letih.

Leto	Povprečna okuženost klasov (%)	
	JABLE	RAKIČAN
<b>2012</b>	3,52	1,87
<b>2013</b>	1,40	1,81
<b>2014</b>	1,83	0,08

Če te rezultate primerjamo s tistimi, kjer smo ugotavljali okuženost zrn pšenice v laboratoriju, ugotovimo, da poljska ocena okuženosti podceni dejansko končno okuženost zrn. To lahko razložimo s tem, da se fuzarioze na klasu od razvojne faze BBCH 71-75 progresivno razvijajo naprej vse do žetve pšenice in zaradi tega je kasnejša okuženost večja. S statistično analizo podatkov smo ugotovili, da ni statistično značilne povezave med poljsko okuženostjo klasov in vsebnostjo DON v zrnju.

### 3.4 Okuženost zrn pšenice

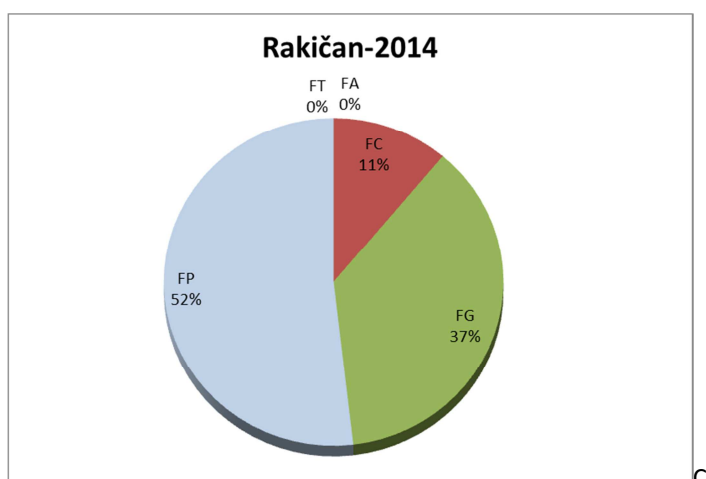
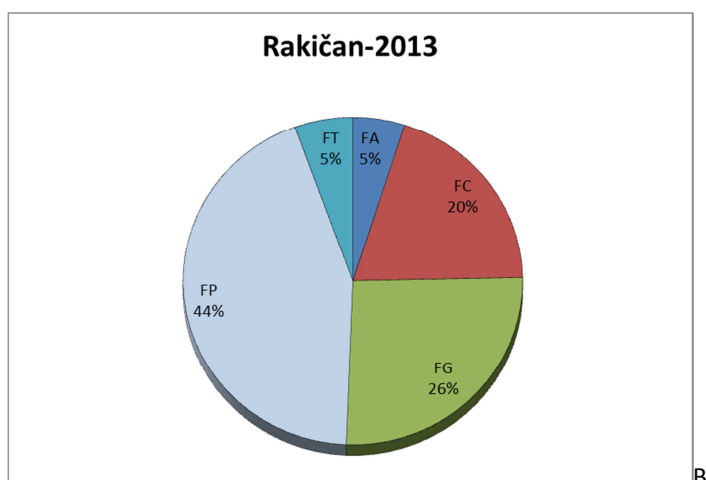
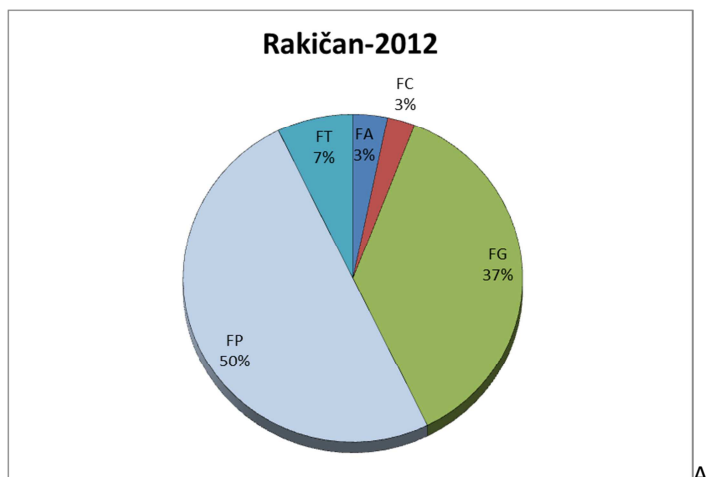
Po metodi, ki jo predpisuje ISTA, smo v laboratoriju ugotavljali povprečno okuženost zrn pšenice. V povprečju so bile sorte pšenice, ki so rastle v Jablah v letih 2012 in 2013 mnogo bolj okužene z fuzariozami, medtem ko v letu 2014 med lokacijama ni bilo bistvene razlike (slika 1). Tako je bila skupna okuženost zrnja fuzariozami v Jablah v posameznih letih od 2012-14 sledeča: 12,9 %, 13,9 % in 2,2 %, medtem ko je bila okuženost vzorcev pšenice iz Rakičana v istih letih 5,1 %, 5,2 % in 2,3 %. Vrstna sestava fuzarioz in njihov delež med okuženimi zrnji se je spreminjal med lokacijami kakor tudi med leti. Povprečna okuženost zrnja pšenice iz ekološke pridelave (18 vzorcev) je bila v letih 2012 in 2013 izrazito manjša kot integrirano pridelani. Skupna okuženost s fuzariozami je bila leta 2012 v povprečju 3 %, in v letu 2013 2,2 %).



**Slika 1:** Okuženost zrn pšenice s fuzariozami iz Rakičana (R), Jabel (J) in ekološke pridelave (EKO) v posameznih letih (FT – *Fusarium tricinctum*, FP – *F. poae*, FG – *F. graminearum*, FC – *F. culmorum*; FA – *F. avenaceum*).

Če pogledamo samo odstotek okuženosti z vrstama *F. graminearum* in *F. culmorum*, ki sta potencialni tvorki mikotoksina DON, je v pridelovalnih sezonah 2012–14 njun skupni povprečni delež v okuženih zrnih sort pšenice iz Jabel 10 %, 4,9 % in 1,7 %, ter precej manjši v Rakičanu; 2 %, 2,4 % in 1,1 %. Povprečen delež okuženosti zrn iz ekološke pridelave je bil s prej omenjenima glivama 1,9 % (2012) in 1,2 % (2013).

Kot je bilo že prej omenjeno se je vrstna sestava fuzarioz in njihov delež med okuženimi zrnji spreminjala tako med lokacijami kakor tudi med leti. Včasih skupna okuženost zrn s fuzariozami nekoliko zamegli sliko o tem, koliko je dejansko možnosti za večjo ali manjšo kontaminacijo zrnja z DON. Po zdaj znanih podatkih sta le dve vrsti potencialni tvorki tega toksina, kar je omenjeno že zgoraj. Na spodnjih slikah so prikazani deleži posameznih ugotovljenih *Fusarium* vrst na pšenici po lokacijah in letih (slika 2 in 3).



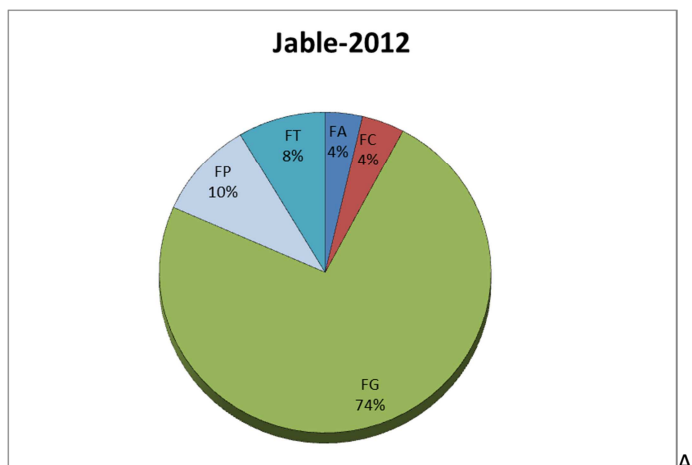
Vsa leta smo v Rakičanu ugotovili med vsemi fuzariozami precej visok delež vrste *F. poae* (od 44 do 52%). Z ozirom na visok delež te vrste med vsemi fuzariozami velja omeniti, da vrsta ni potencialna tvorka DON, omenja pa se jo kot vrsto, ki oblikuje nekatere druge pomembne mikotoksine, kot sta nivalenol in beauvericin.

Relativni delež vrste *F. graminearum* se je gibal med 37 % v letih 2012 in 2014 ter 26 % v letu 2013.

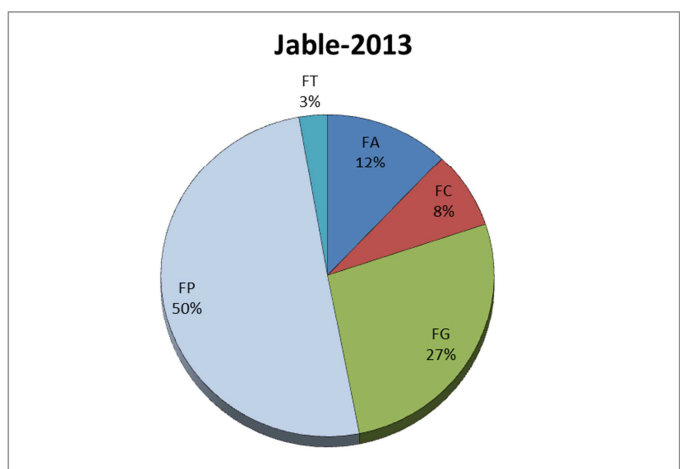
Zastopanost glive *F. culmorum* se med leti močno spreminja, od nekaj odstotkov leta 2012 pa do 20 % v letu 2013. Iz literature je poznano, da je ta gliva pogostejša v bolj severnih oz. centralnih območjih pridelave pšenice. Njeno večjo zastopanost leta 2013 bi lahko povezali z nižjimi temperaturami in padavinami v mesecu maju.

Zastopanost vrst *F. tricinctum* in *F. avenaceum* je bila v letih 2012-13 relativno majhna (3 do 7 %), medtem ko jih v letu 2014 sploh nismo ugotovili.

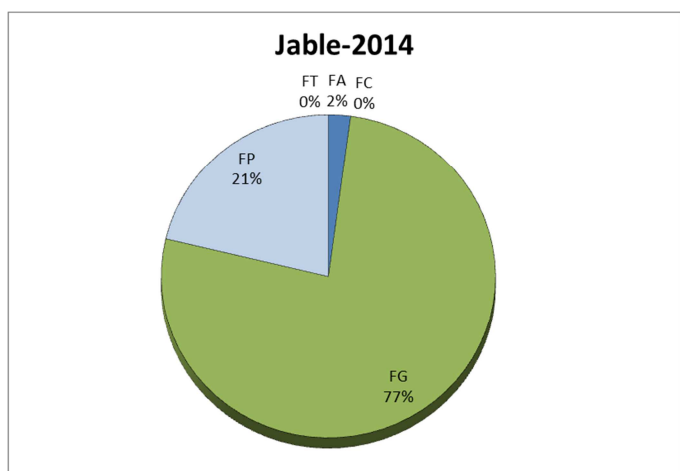
**Slika 2:** A-C Delež ugotovljenih posameznih *Fusarium* vrst v posameznih letih (2012-14) na poskusni lokaciji Rakičan (FT – *Fusarium tricinctum*, FP – *F. poae*, FG – *F. graminearum*, FC – *F. culmorum*; FA – *F. avenaceum*).



A



B



C

**Slika 3:** A-C Delež ugotovljenih posameznih *Fusarium* vrst v posameznih letih (2012-14) na poskusni lokaciji Jable (FT – *Fusarium tricinctum*, FP – *F. poae*, FG – *F. graminearum*, FC – *F. culmorum*; FA – *F. avenaceum*).

V Jabloh so se na zrnju pšenice pojavljale enake *Fusarium* vrste kot v Rakičanu vendar se njihov delež močno razlikuje. Leta 2012 in 2014 je prevladovala vrsta *F. graminearum* z več kot 70 % (74 % in 77 %), medtem ko je bil njen delež v letu 2013 precej manjši, le 27 %.

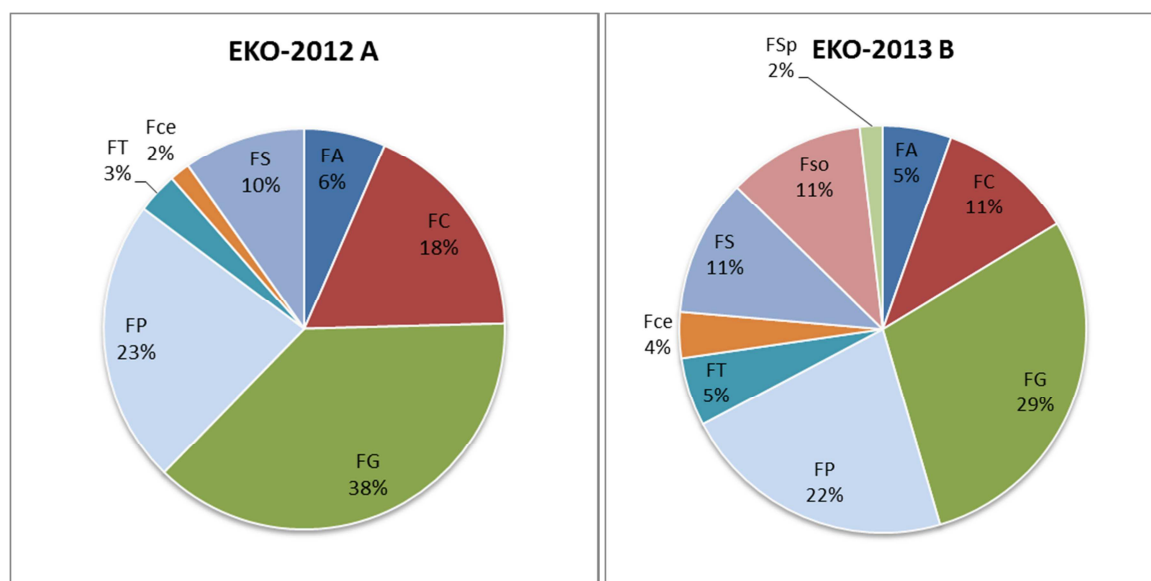
V teh dveh letih (2012 in 2014) je bil delež glive *F. poae* v primerjavi z Rakičanom relativno majhen (10 in 21 %), vendar pa je v letu 2013 dosegel 50 %, kar je primerljivo z rezultati iz Rakičana.

Gliva *F. culmorum* se je v letih 2012-13 pojavljala v manjšem obsegu (4 oz. 8 %), medtem ko jo leta 2014 sploh nismo zasledili.

V primerjavi z Rakičanom je bila v letih 2012-14 nekoliko pogosteje ugotovljena gliva *F. avenaceum* in sicer v 4, 12 in 2 % analiziranih okuženih zrn. Zastopanost glive *F. tricinctum* je bila primerljiva s tisto v Rakičanu.

Glivi *F. tricinctum* in *F. culmorum* v letu 2014 nismo ugotovili na analiziranem zrnju pšenice.

Precej manjšo okuženost pšenice iz ekološke pridelave velja pripisati dejstvu, da v tem načinu izvajajo precej bolj širok kolobar in ne samo dvopolje kuruza pšenica. Poleg tega velja omeniti, da večji del ekoloških pridelovalcev nima v kolobarju kuruza ali pa pride na pridelovalno površino šele po treh do štirih letih. Okuženi ostanki kuruza imajo namreč velik infekcijski potencial za okužbo kasneje posejane pšenice oz. ostalih strnih žit. Slika 4 A-B prikazuje vrstni sestav ugotovljeni *Fusarium* vrst na zrnju pšenice iz ekološke pridelave. Vrstni nabor je bolj pester kot na pšenici iz integrirane pridelave in ugotovljene so bile nekatere vrste, ki jih na zrnju iz integrirane pridelave nismo našli.



**Slika 4:** A-B Delež ugotovljenih posameznih *Fusarium* vrst v posameznih letih (2012-13) na vzorcih ekološko pridelane pšenice (FT – *Fusarium tricinatum*, FP – *F. poae*, FG – *F. graminearum*, FC – *F. culmorum*; FA – *F. avenaceum*; Fce – *F. cerealis*; FS – *F. subglutinans*; Fso – *F. solani*).

Delež glive *F. graminearum* je primerljiv s tistim v Rakičanu, vendar precej manjši kot v Jablah, predvsem v letu 2012. Zastopanost glive *F. culmorum* se je gibala med 11 in 18 %, *F. poae* med 22 in 23 %, *F. avenaceum* med 5 in 6 % in *F. tricinatum* med 3 in 5 %. Za razliko od Rakičana in Jabel smo iz zrn ekološko pridelane pšenice izolirali še nekatere druge fuzarioze. Gliva *F. subglutinans* (FS) je bila obe leti zastopana s približno enakim deležem okrog desetih odstotkov (10 in 11 %), *F. cerealis* (Fce) z 2 in 4 %. Leta 2013 smo determinirali še dve novi vrsti in sicer *F. solani* (Fso) (11 %) ter *F. sporotrichioides* (FSp) (2 %). Še enkrat pa moramo poudariti, da je bila skupna okuženost zrn pšenice s fuzariozami v letih 2012-13 precej manjša v primerjavi s pšenico iz integrirane pridelave. Naše rezultate potrjuje tudi raziskava Birzele in sodelavcev (2002) v Nemčiji.

Povprečna vsebnost DON v ekološko pridelani pšenici je bila v okolici Rakičana leta 2012 0,186 mg/kg, leta 2013 pa 0,131 mg/kg. V okolici Jabelj sta bili ti koncentraciji 0,209 mg/kg in 0,301 mg/kg.



### 3.5 Statistična analiza (ANOVA) pridobljenih podatkov v poskusih s pšenico v letih 2012-13

Podatke pridobljene v letih 2012–13 (prikazani v prilogah 5–8) na lokacijah Jable in Rakičan (vključenih 19 sort na obeh lokacijah) smo statistično obdelali z ANOVA in ugotovili:

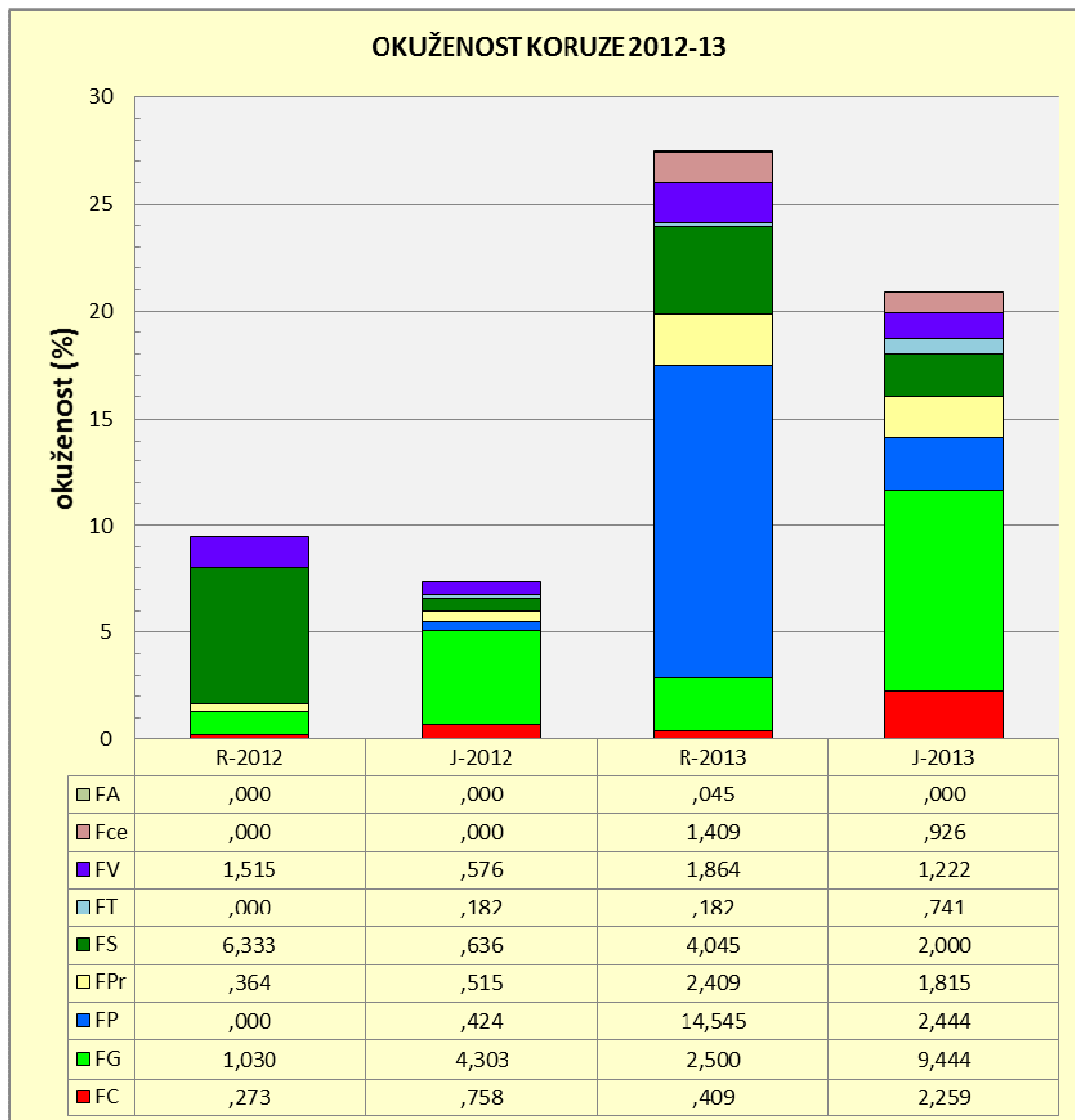
- med sezonama ni bilo statističnih razlik v povprečni vsebnosti DON v zrnju pšenice;
- v povprečju obeh let se je vsebnost DON v Jablah (699 µg/kg) statistično razlikovala od tiste v Rakičanu (130 µg/kg);
- v Rakičanu so vzorci iz ekološke pridelave vsebovali v povprečju nekoliko več DON kot tisti iz integrirane pridelave. V Jablah je bila vsebnost DON v zrnju iz integrirane pridelave izrazito višja kot v tistih iz ekološke pridelave;
- vse sorte, vključene v raziskavo, so imele v dvoletnem povprečju višje vsebnosti DON na Jablah kot v Rakičanu. Vendar je bila ta razlika med lokacijama statistično značilna le pri naslednjih sortah: Alixan, Ketchum, Lord, Lukullus in SY Moisson. Pri sortah Ketchum in Lord je povprečna vsebnost na Jablah celo presegala zakonsko dovoljeno mejo 1250 µg/kg;
- po deležu okuženih klasov se med seboj statistično ne razlikujejo lokacije, niti rastne sezone in posamezne sorte;
- v Jablah je bilo v povprečju okuženih 11,9 % zrn z glivami iz rodu *Fusarium*, v Rakičanu pa 5,0 %. Razlika je statistično značilna;
- v povprečni okuženosti zrn z vsemi fuzariozami v obeh letih med sortami ni statistično značilnih razlik;
- skupna količina padavin med cvetenjem pšenice nima vpliva na okuženost z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*;
- v Jablah je bilo povprečna okuženost zrnja z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, potencialnima tvorkama DON, 5,6 % v Rakičanu pa 2,2 %. Razlika je statistično značilna;
- obstaja močna povezava med okuženostjo pšenice (izraženo v deležih) z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* ter vsebnostjo DON. (kor. koeficient = 0.71;  $R^2 = 50,7$  %). Povezava je linearna:

$$DON = 0,0439 + 7,782 \times DFgFc \dots\dots (DFgFc \text{ je v deležih od } 0,0 \text{ do } 1; \text{ DON je izražen v mg/kg}).$$

ali drugače povedano: če se okuženost z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* poveča za 10 % (0,1), se kontaminiranost pšenice z DON poveča za 0.822 mg/kg oziroma 822 µg/kg.

### 3.6 Okuženost zrnja koruze

Okuženost zrn koruze smo ugotavljali na podoben način kot pri pšenici (slika 5).

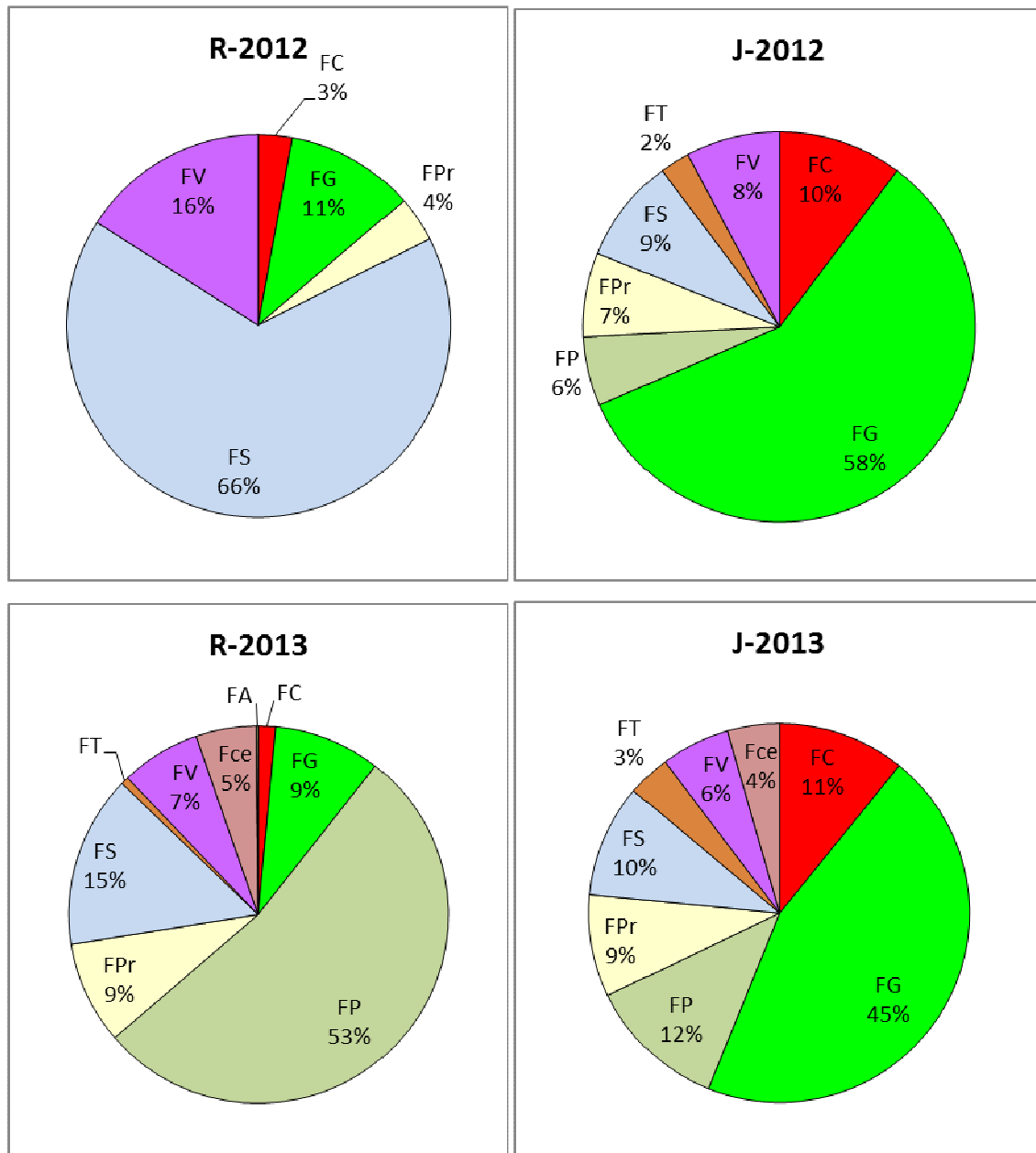


**Slika 5:** Okuženost zrn koruze s fuzariozami iz Rakičana (R), Jablah (J) v posameznih letih (FT – *Fusarium tricinctum*, FP – *F. poae*, FG – *F. graminearum*, FC – *F. culmorum*; FA – *F. avenaceum*; Fce – *F. cerealis*; FS – *F. subglutinans*; FPr – *F. proliferatum*; FV – *F. verticillioides*).

Povprečna okuženost zrn koruze z vsemi fuzariozami je bila leta 2012 na obeh lokacijah za približno  $\frac{2}{3}$  manjša kot leta 2013. V Jablah je dosegla 7,4 % in Rakičanu 9,5 %, medtem ko je bila leta 2013 20,9 % oziroma 27,4 %. V Rakičanu je leta 2013 izstopala okuženost z glivo *F. poae*, s katero je bilo okuženih kar 14,6 % zrn. V Rakičanu je bilo v obeh letih tudi več okužb z glivo *F. subglutinans* (6,3 oz. 4,1 %) kot v Jablah (0,6 oz. 2 %). Obe omenjeni glivi nista potencialni tvorki DON. Čeprav je bila povprečna skupna okuženost s fuzariozami obe leti večja v Rakičanu, se to ni odrazilo v vsebnosti DON. Razlog je v tem, da je bila koruza v Rakičanu mnogo manj okužena z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, potencialnima tvorkama DON, kot pa v Jablah. Povprečna okuženost z

omenjenima glivama je bila v Jablah 5,1 % (2012) in 11,7 % (2013) ter v Rakičanu 1,3 % (2012) in 2,9 % (2013). To se je seveda posredno odrazilo tudi v povprečni vsebnosti DON, ki je bila v Jablah 788 µg/kg (2012) in 987 µg/kg (2013) ter v Rakičanu 130 µg/kg (2012) in 160 µg/kg (2013).

V primerjavi s pšenico lahko vidimo, da je številčnost ugotovljenih vrst na koruzi precej večja. Razmerja oz. deleži posameznih ugotovljenih vrst po lokacijah in letih so prikazana na sliki 6.



**Slika 6:** Delež ugotovljenih posameznih *Fusarium* vrst v posameznih letih (2012-13) na poskusni lokaciji Rakičanu (R) in Jable (J); okrajšave za posamezne glive so enake kot pri sliki 5.

Iz prikazov je razvidno, da je obe leti v Jablah prevladovala *F. graminearum* (58 in 45 %). V Rakičanu je leta 2012 prevladovala gliva *F. subglutinans* (66 %), naslednje leto, 2013, pa gliva *F. poae* (53 %). Zastopanost glive *F. graminearum* je bila v Rakičanu obe leti približno enaka (11 in 9 %). Potencialna tvorba mikotoksina DON je bila v Jablah obe leti zastopana s približno 10 % (10 in 11 %), medtem ko je bil njen delež v Rakičanu zanemarljiv, med 1 in 3 odstotki. Gliva *F. subglutinans* je bila v letih 2012.13 v Jablah zastopana z 9 oz. 10 %, medtem ko je bil njen delež v Rakičanu precej večji, leta 2012 66 % in naslednje leto 15 %.

### 3.7 Povezava med okuženostjo zrnja koruze z glivama *F. graminearum* in *F. culmorum* in vsebnostjo DON

Povprečna okuženost z omenjenima glivama je bila v Jablah 5,1 % (2012) in 11,7 % (2013) ter v Rakičanu 1,3 % (2012) in 2,9 % (2013). To se je seveda posredno odrazilo tudi v povprečni vsebnosti DON, ki je bila v Jablah 788 µg/kg (2012) in 987 µg/kg (2013) ter v Rakičanu 130 µg/kg (2012) in 160 µg/kg (2013) (preglednica 4). Podobno kot pri pšenici smo izvedli statistično analizo podatkov za 15 hibridov koruze na obeh lokacijah za dve leti (2012, 2013).

**Preglednica 4:** Povprečna okuženost zrn koruze z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* v odstotkih in vsebnost mikotoksina DON (mg/kg) na lokacijah Jable in Rakičan v letih 2012-13.

Hibrid	JABLE				RAKIČAN			
	2012		2013		2012		2013	
	Σ FC&FG	DON [mg/kg]	Σ FC&FG	DON [mg/kg]	Σ FC&FG	DON [mg/kg]	Σ FC&FG	DON [mg/kg]
BC 244	3	<b>0,413</b>	4	<b>0,299</b>	0	0,053	1	<b>0,066</b>
BC 416	8	<b>1,440</b>	84	<b>7,645</b>	1	0,065	2	<b>0,084</b>
DANUBIO	2	<b>0,209</b>	11	<b>1,084</b>	1	0,121	2	<b>0,127</b>
DKC 4590	2	<b>0,336</b>	4	<b>0,282</b>	2	0,148	3	<b>0,144</b>
FUTURIXX	5	<b>0,931</b>	4	<b>0,305</b>	1	0,115	3	<b>0,163</b>
NK LUCIUS	4	<b>0,423</b>	5	<b>0,233</b>	0	0,099	2	<b>0,116</b>
NK TIMIC	21	<b>3,561</b>	13	<b>1,007</b>	1	0,128	4	<b>0,238</b>
NS 288	3	<b>0,240</b>	7	<b>0,453</b>	1	0,131	2	<b>0,077</b>
P9175	5	<b>0,952</b>	4	<b>0,397</b>	1	0,094	3	<b>0,139</b>
P9400	2	<b>0,269</b>	6	<b>0,440</b>	2	0,116	2	<b>0,144</b>
P9494	10	<b>1,625</b>	18	<b>1,356</b>	1	0,107	3	<b>0,169</b>
PR38A79	1	<b>0,203</b>	5	<b>0,243</b>	2	0,129	7	<b>0,335</b>
PR38N86	5	<b>0,601</b>	14	<b>1,199</b>	1	0,134	2	<b>0,160</b>
PR38Y34	2	<b>0,125</b>	5	<b>0,242</b>	3	0,272	2	<b>0,122</b>
SY FLOVITA	6	<b>0,987</b>	3	<b>0,237</b>	0	0,060	6	<b>0,354</b>

Ugotovili smo, da obstaja močna povezava med okuženostjo zrn koruze (izraženo v deležih) z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* ter vsebnostjo DON. (kor. koeficient = 0.96;  $R^2 = 92,95\%$ ).

Povezava je linearna:

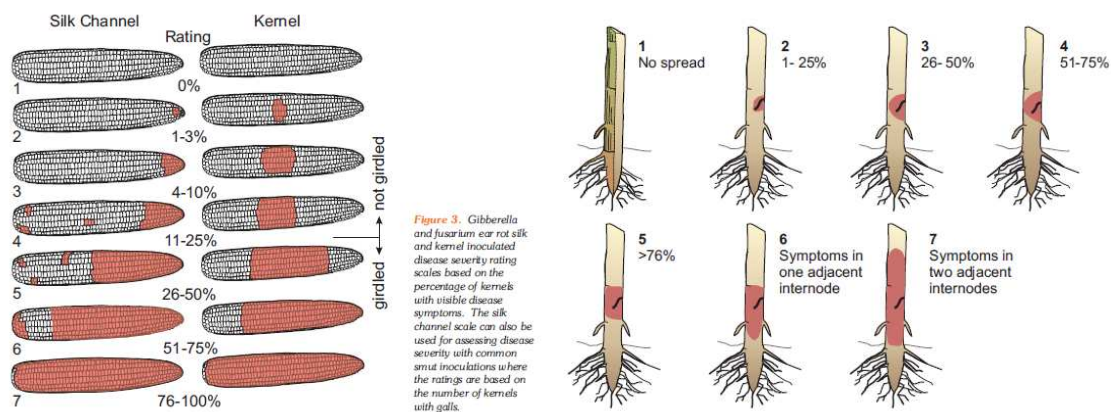
$$DON = 0,0179 + 9,447 \times DFgFc \dots\dots (DFgFc \text{ je v deležih od } 0,0 \text{ do } 1; DON \text{ je izražen v mg/kg}).$$

ali drugače povedano: če se okuženost z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum* poveča za 10 % (0,1), se kontaminiranost koruze z DON poveča za 0,963 mg/kg oziroma 963 µg/kg.

### 3.8 Preizkušanje odpornost različnih hibridov koruze proti glivi *Fusarium graminearum*

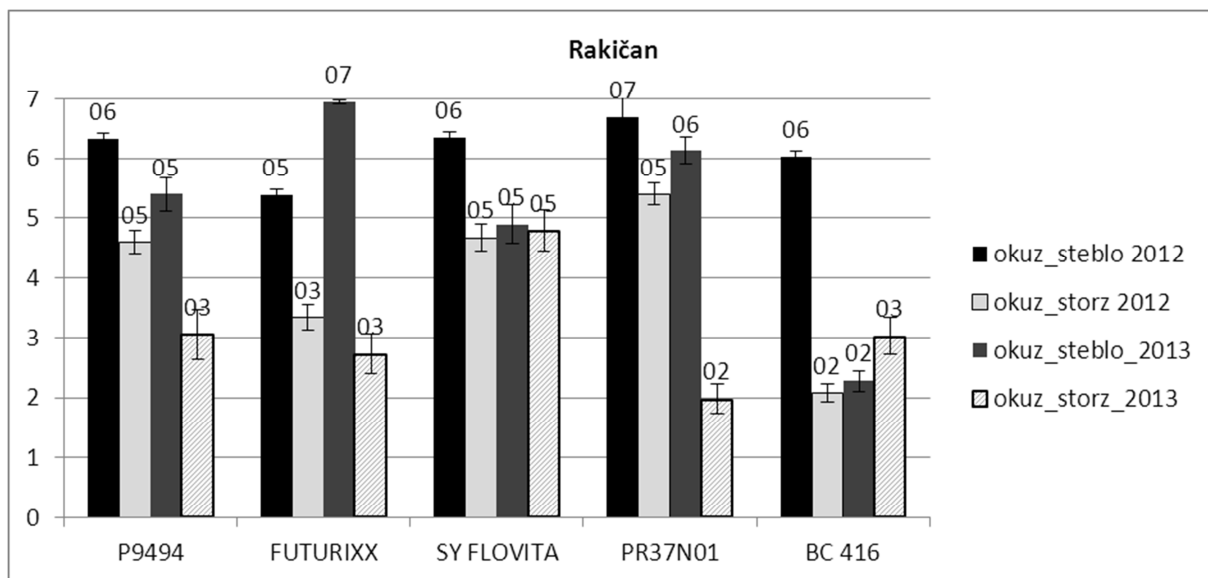
V mesecu juliju smo v letih 2012 in 2013 na obeh lokacijah umetno okužili stebela in storžev petih izbranih hibridov koruze (BC 416, P9494, Flovita, Futurixx in PR37N01) v fenofazi BBCH 61-69 suspenzijo trosov in micelija treh izolatov *F. graminearum*, pridobljenimi v letu 2011.

Okuženost stebela in storžev petih hibridov koruze smo ocenjevali po lestvicah avtorjev Reid in Zhu (2005) (slika 7).



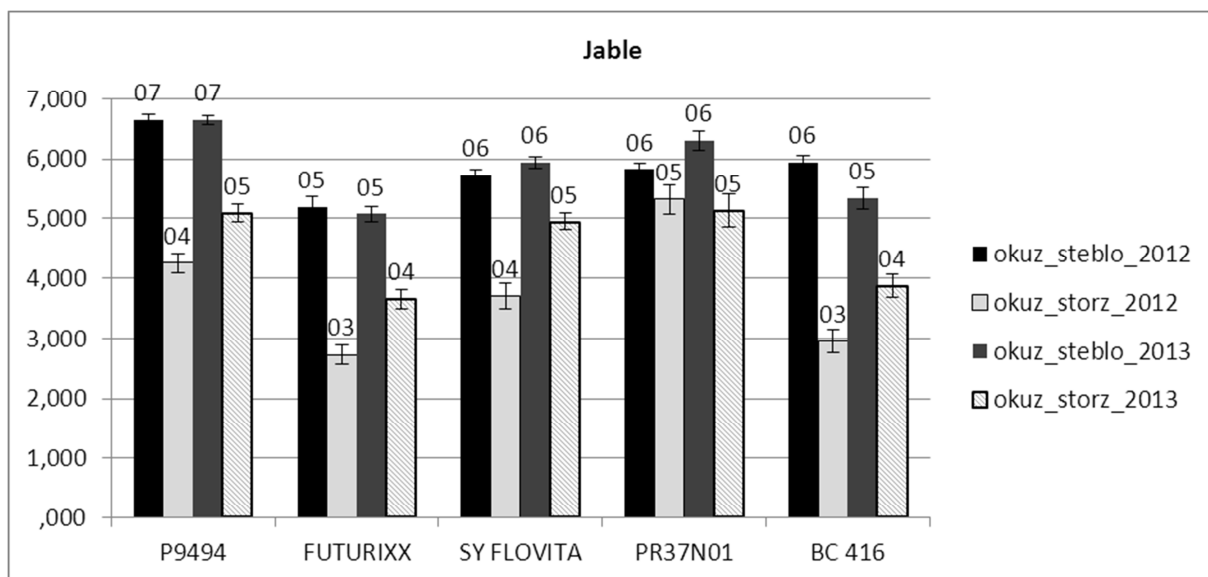
**Slika 7:** Lestvica okuženosti koruznih storžev (1-7) in stebela koruze (1-7) od mesta inokuliranega internodija (Reid in Zhu, 2005).

Na lokaciji Rakičan je pri okuženosti stebela koruze prišlo do statistično značilne razlike med okužbami v letih 2012 in 2013 pri hibridih P9494, FUTURIXX, SY FLOVITA in BC 416. Najmanjša okuženost stebela je bila ocenjena pri hibridu BC 416 v letu 2013, in sicer z oceno 2, pri ostalih hibridih pa z ocenami 5, 6 in 7. Tudi pri okuženosti storžev je bilo pri večini hibridov, razen pri SY FLOVITA, zaznati statistično značilno razliko pri primerjavi okuženosti po letih. Najmanj okuženi storži so bili pri hibridih BC 416 in FUTURIXX v obeh ocenjevanih letih in PR37N01 v letu 2013, ki so bili ocenjeni z oceno 2 in 3, najbolj okužene storže pa je imel hibrid SY FLOVITA v obeh letih in hibrid PR37N01 v letu 2012 (slika 8).

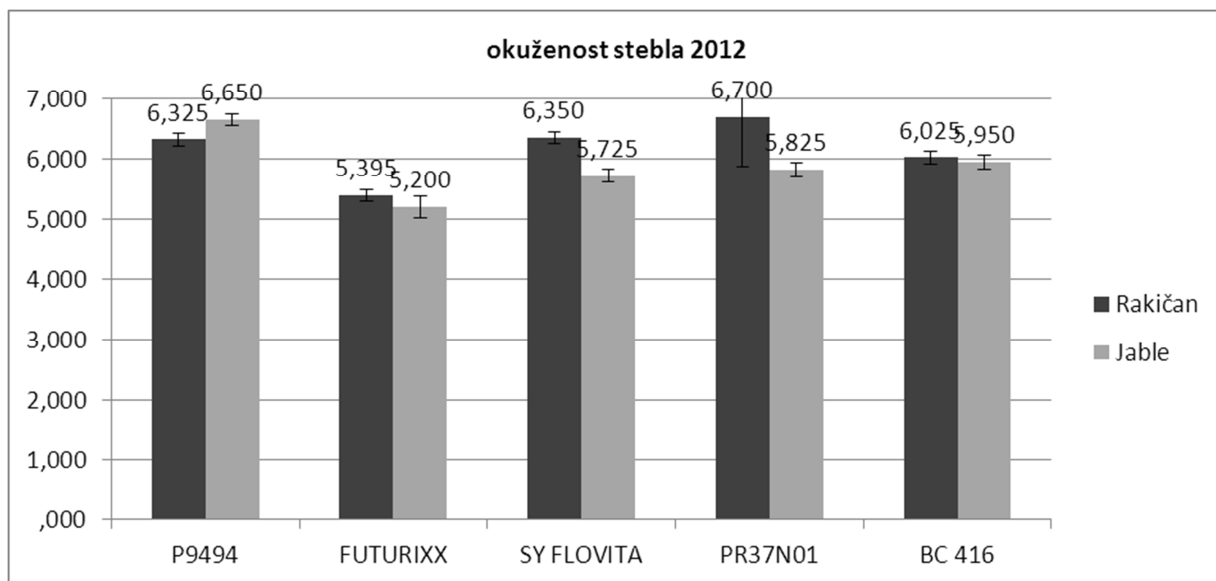


**Slika 8:** Primerjava povprečne okuženosti stebel in storžev petih hibridov koruze v Rakičanu leta 2012 in 2013

Na lokaciji Jable je pri okuženosti stebela koruze prišlo do statistično značilne razlike med okužbami v letih 2012 in 2013 pri SY FLOVITA, PR37N01 in BC 416. Najmanjša okuženost stebela je bila ocenjena pri hibridu FUTURIXX v obeh letih, z oceno 5, pri ostalih hibridih pa z ocenami 5, 6 in 7. Tudi pri okuženosti storžev je bilo pri večini hibridov, razen pri PR37N01, zaznati statistično značilno razliko pri primerjavi okuženosti po letih. Najmanj okuženi storži so bili pri hibridih BC 416 in FUTURIXX v obeh ocenjevanih letih in SY FLOVITA v letu 2012, ko so bili ocenjeni z oceno 3 in 4, najbolj okužene storže pa je imel hibrid PR37N01 v obeh letih in hibrid SY FLOVITA v letu 2013, ko so dobili oceno okužbe 5 (slika 9).

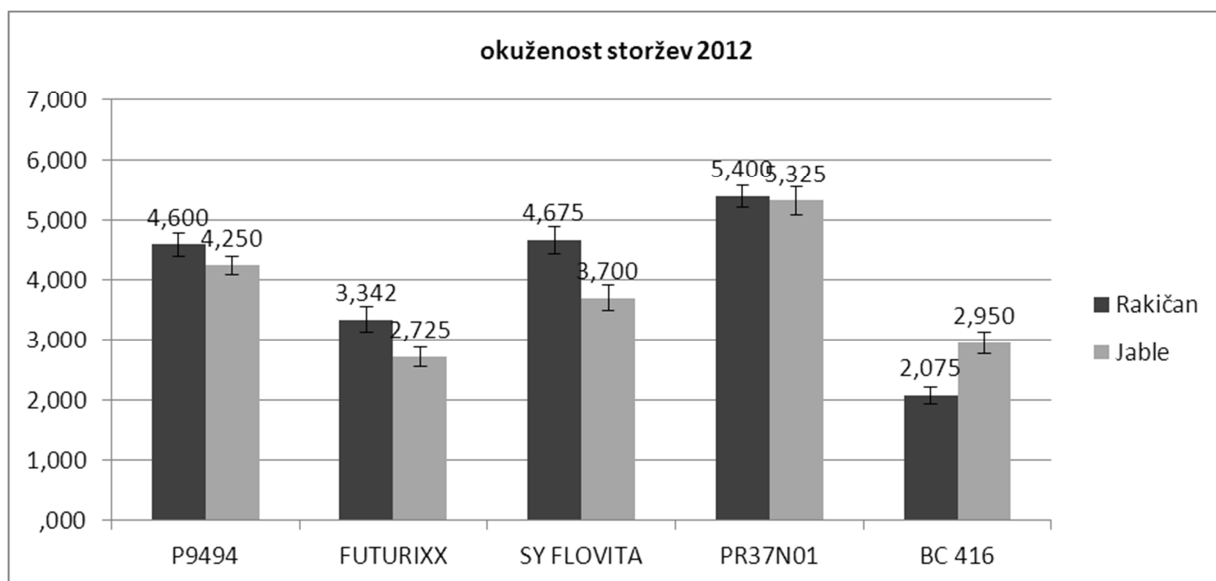


**Slika 9:** Primerjava povprečne okuženosti stebel in storžev petih hibridov koruze v Jablah leta 2012 in 2013



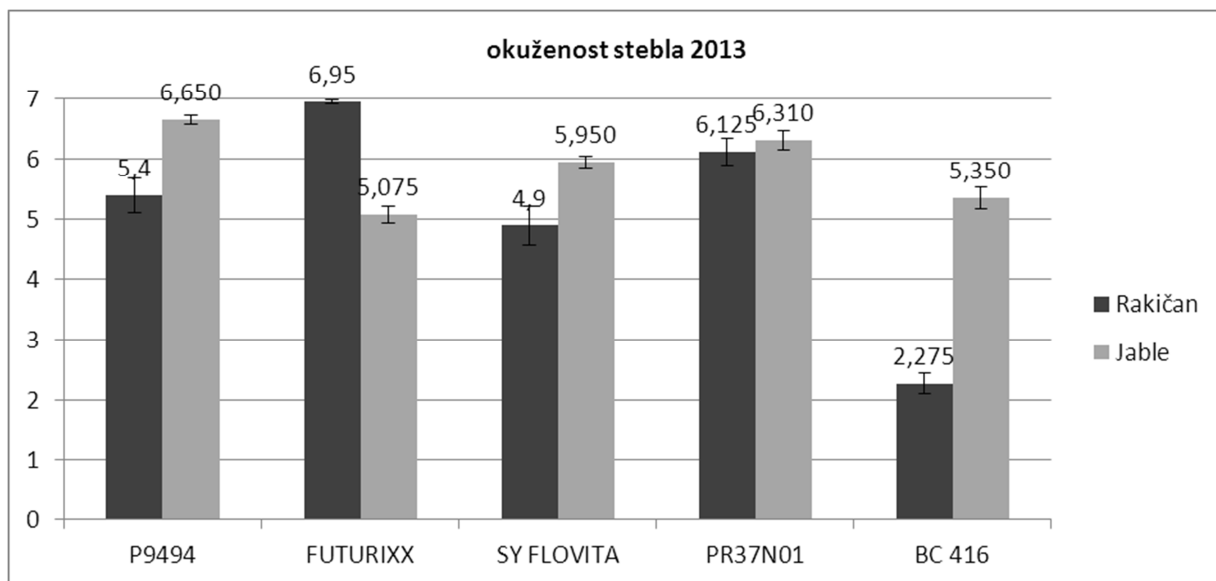
**Slika 10:** Primerjava povprečne okuženosti stebel petih hibridov koruze v Rakičanu in Jalah leta 2012.

Pri primerjavi lokacij, kjer smo okuževali stebila koruze v letu 2012, ni opaziti večjih razlik. Okuženost je bila pri vseh hibridih na obeh lokacijah ocenjena s 5 ali 6, kar pomeni, da je bilo okuženega več kot 76 % internodija ali pa se je okužba razširila na še sosednji internodij (slika 10).



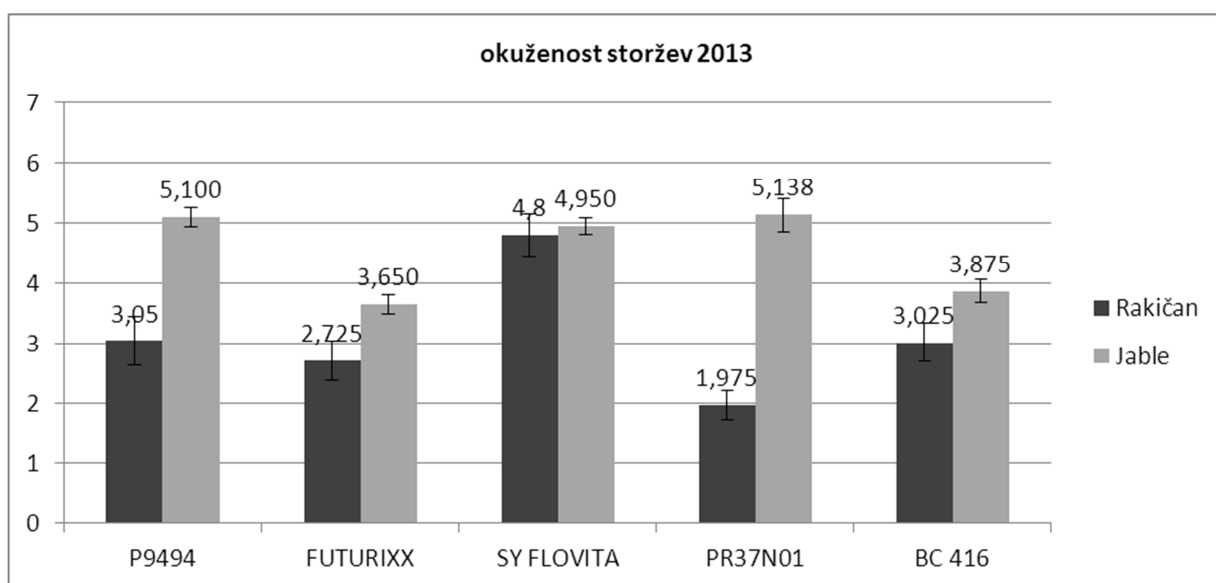
**Slika 11:** Primerjava povprečne okuženosti storžev petih hibridov koruze v Rakičanu in Jalah leta 2012.

Stopnja okuženosti storžev po lokacijah je nekoliko bolj variirala. Statistično značilne razlike med lokacijama z okuženimi storži koruze so se pojavile pri hibridih FUTURIXX, SY FLOVITA in BC 416 (slika 11).



**Slika 12:** Primerjava povprečne okuženosti stebel petih hibridov koruze v Rakičanu in Jablah leta 2013.

Pri primerjavi lokacij, kjer smo okuževali stebila koruze v letu 2013, izstopa hibrid BC 416, kjer je bila okuženost stebila v Rakičanu ocenjena z oceno 2, v Jablah pa z oceno 5. Razen pri hibridu PR37N01 je pri vseh ostalih statistično značilna razlika med lokacijama (slika 12).



**Slika 13:** Primerjava povprečne okuženosti storžev petih hibridov koruze v Rakičanu in Jablah leta 2013.

Pri primerjavi lokacij z okuženimi storži koruze v letu 2013, izstopa hibrid PR37N01, kjer je bila okuženost stebila v Rakičanu ocenjena z oceno 2, v Jablah pa z oceno 5. Razen pri hibridu SY FLOVITA je pri vseh ostalih statistično značilna razlika med lokacijama (slika 13).

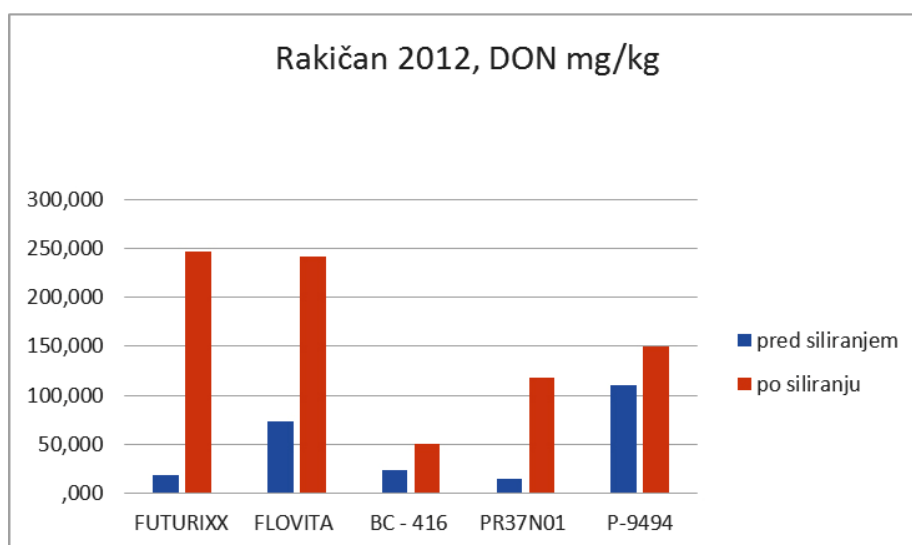
Pri umetni okužbi petih hibridov koruze na obeh lokacijah (Rakičan, Jable) in v dveh letih (2012, 2013) smo ugotovili, da so vsi hibridi zelo dovzetni za okužbo stebila, saj se je ocena okužbe pri vseh obravnavanjih zelo visoka. Izjema je bil hibrid BC 416 leta 2013 v Rakičanu,



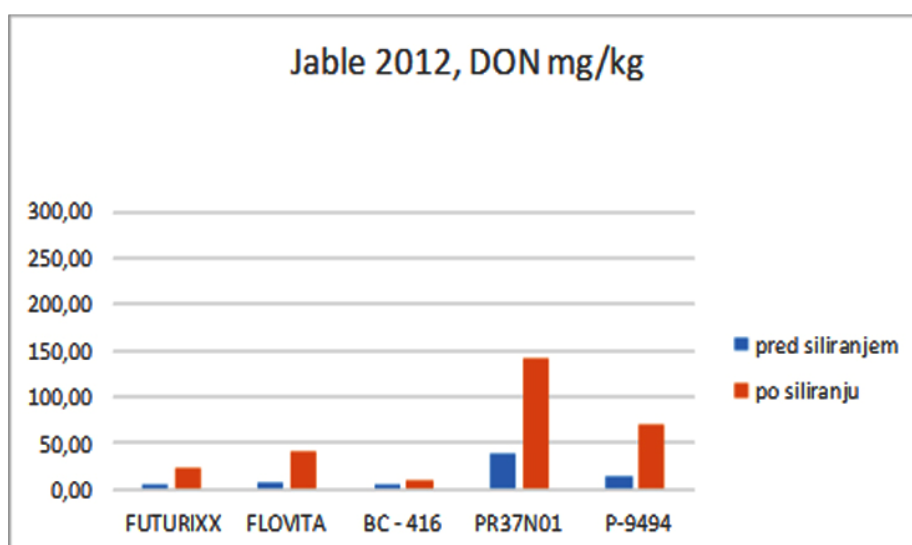
kar pa je bila najbrž posledica prisilnega dozorevanja zaradi katastrofalne suše. Manj dovzetni za okužbo so bili storži, vendar so ocene okužbe storžev med hibridi, lokacijami in leti variirale, tako da se ne more izpostaviti hibrida s konstantno nizko oceno okužbe storžev glede na obravnavanja.

### 3.9 Prisotnost mikotoksinov v okuženi koruzi pred in po siliranju

Vzorci izbranih hibridov koruze (enaki kot pri ugotavljanju odpornosti), smo v času voščene zrelosti poželi, razrezali v sekljalnikih in silirali v mikrosilosih (plastične kadi oz. vedra). Postopek siliranja je bil enak kot v klasičnih silosih. Vzorce za analizo smo odvzeli pred siliranjem in 6 mesecev po siliranju. Vsak hibrid smo silirali v treh plastičnih posodah in na koncu odvzeli povprečen vzorec iz vseh treh posod. Rezultati so podani na 12 % vlago. Rezultati onesnaženosti silaže z DON so razvidni iz slik 14–17.



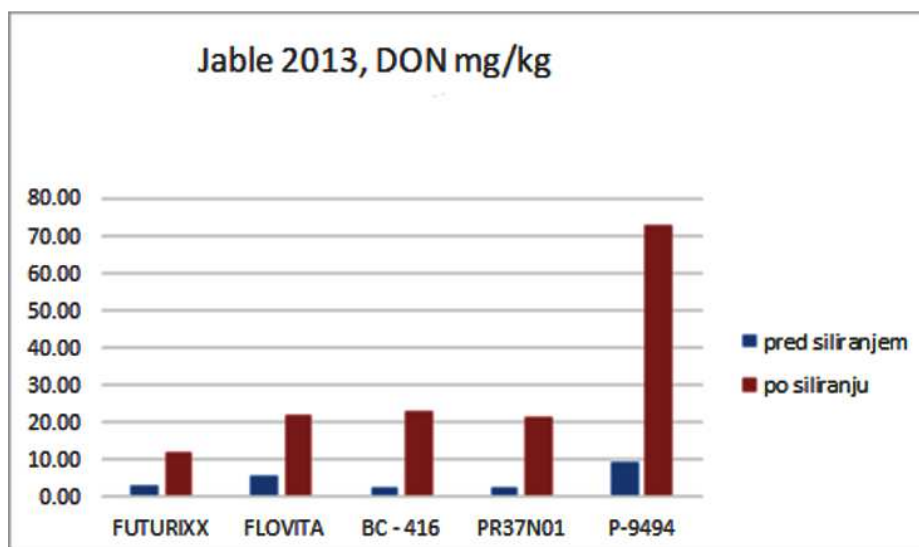
**Slika 14:** Lokacija Rakičan, leto 2012. Koncentracije DON (mg/kg) v koruzni silaži pred in pol leta po siliranju (vrednosti so prikazane na 12 % vlago).



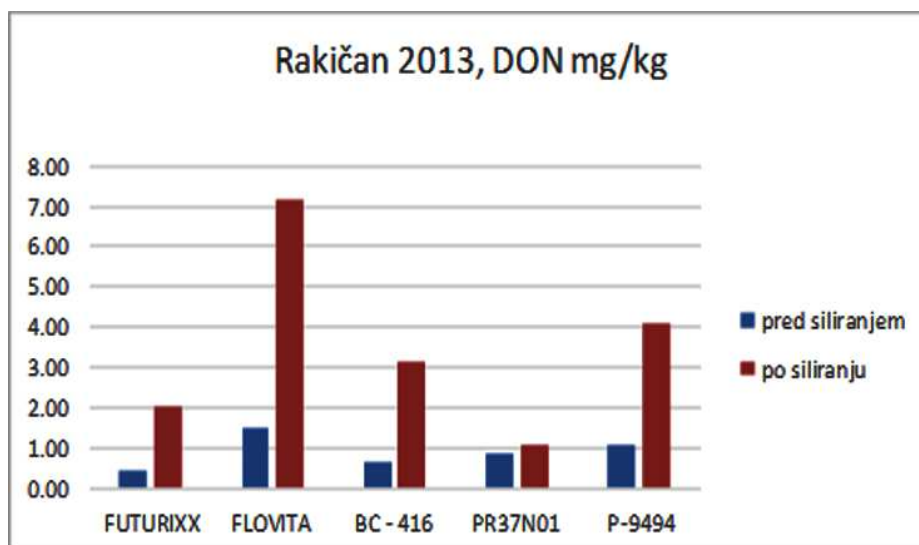
**Slika 15:** Lokacija Jable, leto 2012. Koncentracije DON (mg/kg) v koruzni silaži pred in pol leta po siliranju (vrednosti so prikazane na 12 % vlago).

Vsi vzorci so poleg DON vsebovali tudi 3-ADON in 15-ADON. Največje ugotovljene koncentracije 3-ADON so bile do 10 mg/kg, 15-ADON pa 30 mg/kg. Na lokaciji Rakičan smo v vseh vzorcih ugotovili tudi penicilinsko kislino in sicer v koncentracijah 0,7–4,8 mg/kg ter tenuazojsko kislino v koncentracijah 0,10–3,66 mg/kg. V posameznih vzorcih smo dokazali še zearalenon, fumonizine, mikofenolno kislino, ohratoksine in ciklopiazonsko kislino. Rokefortin C smo ugotovili v enem vzorcu iz Rakičana (PR37N01) in enem vzorcu iz Jabel (PR37N01).

V letu 2013 so bile ugotovljene koncentracije mikotoksinov na splošno manjše.



**Slika 16:** Lokacija Jable, leto 2013. Koncentracije DON (mg/kg) v koruzni silaži pred in pol leta po siliranju (vrednosti so prikazane na 12 % vlago).



**Slika 17:** Lokacija Rakičan, leto 2013. Koncentracije DON (mg/kg) v koruzni silaži pred in pol leta po siliranju (vrednosti so prikazane na 12 % vlago).

Tudi v letu 2013 se je koncentracija DON med siliranjem povečevala. Vsi vzorci so poleg DON vsebovali tudi 3-ADON in 15-ADON. Največje ugotovljene koncentracije 3-ADON so bile do 4,22 mg/kg, 15-ADON pa 20,17 mg/kg. Penicilinsko kislino smo dokazali v enem vzorcu iz Rakičana (P9494). V posameznih vzorcih smo dokazali še zearalenon, mikofenolno kislino, fumonizine, ohratoksin A in ciklopiazonsko kislino. Rokefortin C smo ugotovili samo po siliranju in to v vzorcih iz Rakičana (FUTURIXX, BC416, PR37N01, P9494) in iz Jabel (FLOVITA, PR37N01).

Mikotoksinov gliotoksina, neosolaniola in DAS nismo ugotovili v nobenem vzorcu iz 2012 in 2013.

Že pri ocenjevanju okuženosti stebel in storžev (točka 3.8) smo zaključili, da so bili storži manj dovzetni za okužbo, vendar so ocene okužbe storžev med hibridi, lokacijami in leti variirale, tako da se ne more izpostaviti hibrida s konstantno nizko oceno okužbe storžev glede na obravnavanja.

Z analizami silaž smo prej navedeno ugotovitev potrdili. Iz podatkov je razvidno, da vrsta hibrida vpliva na končno koncentracijo mikotoksinov v vzorcu, vendar na osnovi opravljenih raziskav ne moremo podati jasnih zaključkov, katera sorta bi bila na določeni lokaciji najprimernejša. Povzamemo lahko, da bi se na področju Prekmurja lahko uporabljali BC416 in Futurix, na območju Jabel pa bi v ožji izbor prišli BC416, Futurix in Flovita.

Priporočila: Smiselno bi bilo nadaljevati z enakimi raziskavami, ker bi samo z večjim številom podatkov lahko prišli do odgovorov in priporočil, kateri hibrid koruze bi bil primeren za določeno lokacijo v Sloveniji.

#### LITERATURA:

Birzele B., Meier A., Hindorf H., Krämer J., Dehne H.W. 2002. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in Rhineland, Germany. V: *Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology*, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 667–673.

Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. V: *Mycotoxins in plant disease; European Journal of Plant Pathology*, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 611–624.

Burgess L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P., Backhouse D. 1994. *Laboratory manual for Fusarium research*. 3rd ed. Sydney: University of Sydney, 136 str.

Gerlach W., Nirenberg H. 1982. The genus *Fusarium* a pictorial atlas. *Mitt Biol Bundesanst. Ld – u Forstw. Berlin-Dahlem*, 209: 1–406

Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*, 1st edn. Ames: Backwell, 110, 4: 573–85.

Logrieco A., Mule G., Morreti G., Botallico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. V: *Mycotoxins in plant disease;*

European Journal of Plant Pathology, Vol. 108. Logrieco A., Bailey J.A., Corazza L., Cooke B.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 597–609.

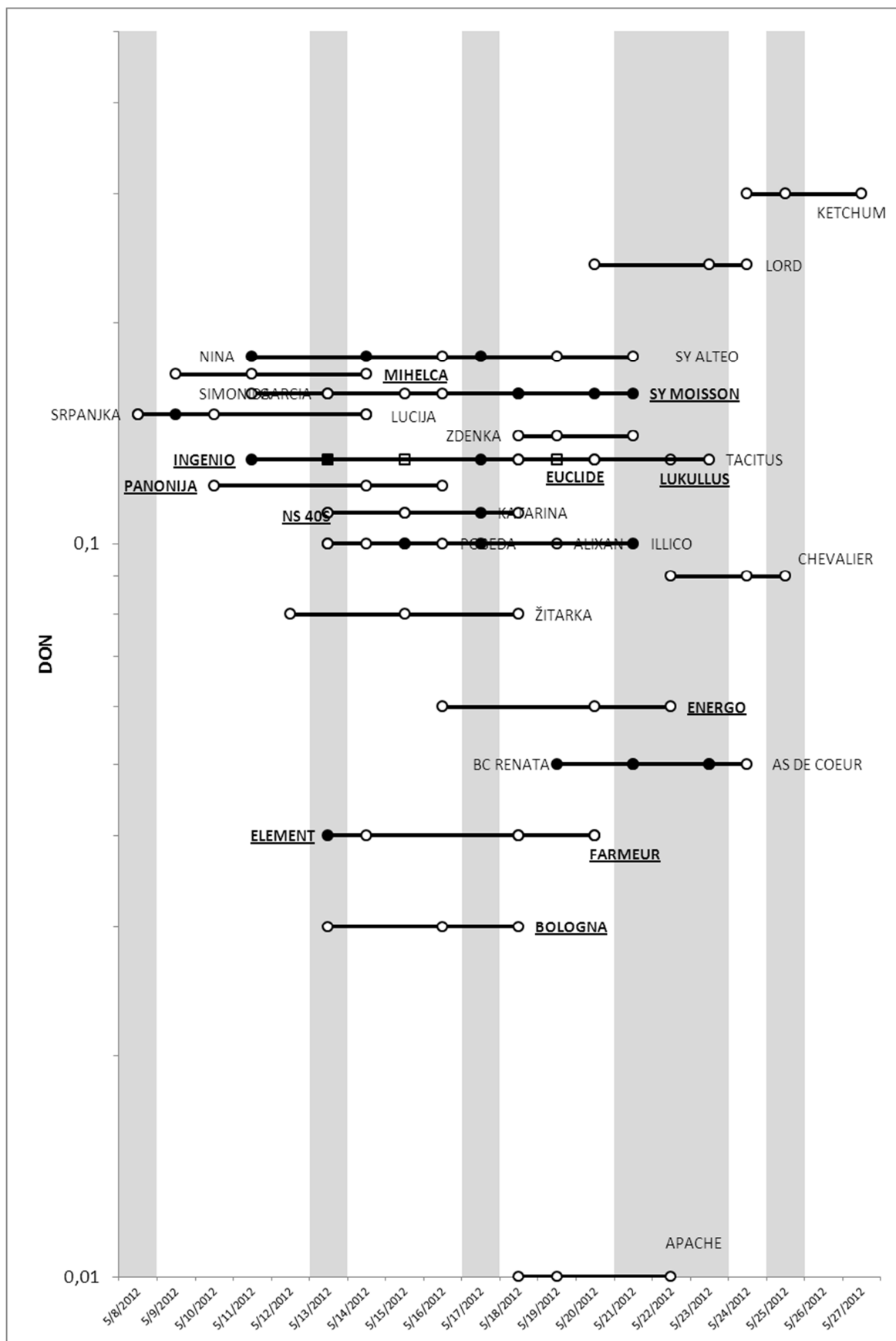
MILEVOJ L. Tri desetletja spremljanja fuzarioz (*Fusarium* spp.) pri koruzi = Three decades of maize fusarium diseases (*Fusarium* spp.) estimation. V: TAJNŠEK, Anton (ur.), ŠANTAVEC, Igor (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2002 : zbornik simpozija = New challenges in field crop production 2002 : proceedings of symposium, [Zreče, 5. in 6. december 2002], ([Novi izzivi v poljedelstvu], ISSN 1408-0591). Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2002, str. 78–82.

Reid L.M. in Zhu X., 2005. Screening Corn for Resistance to Common Diseases in Canada. Agriculture and Agri-Food Canada: Ontario Technical Bulletin, Ottawa, 380 ON, Canada, 26 s.

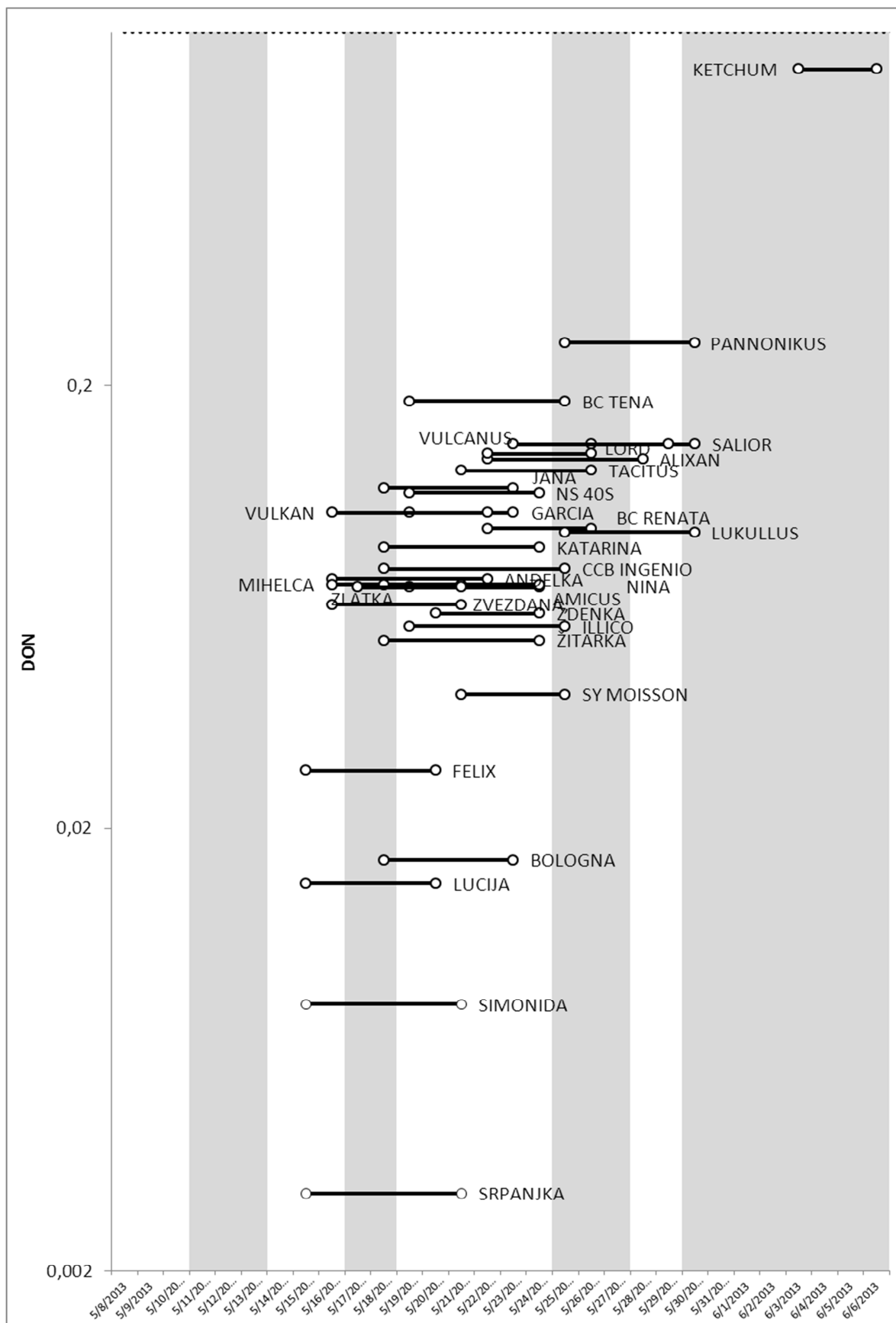
Stack in McMullen, 1998. A Visual Scale to Estimate Severity of Fusarium Head Blight in Wheat (<http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp1095.pdf>)

Summerell B.A., Salleh B., Leslie J.F. 2003. A utilitarian approach to Fusarium identification. Plant Dis. 87: 117–28.

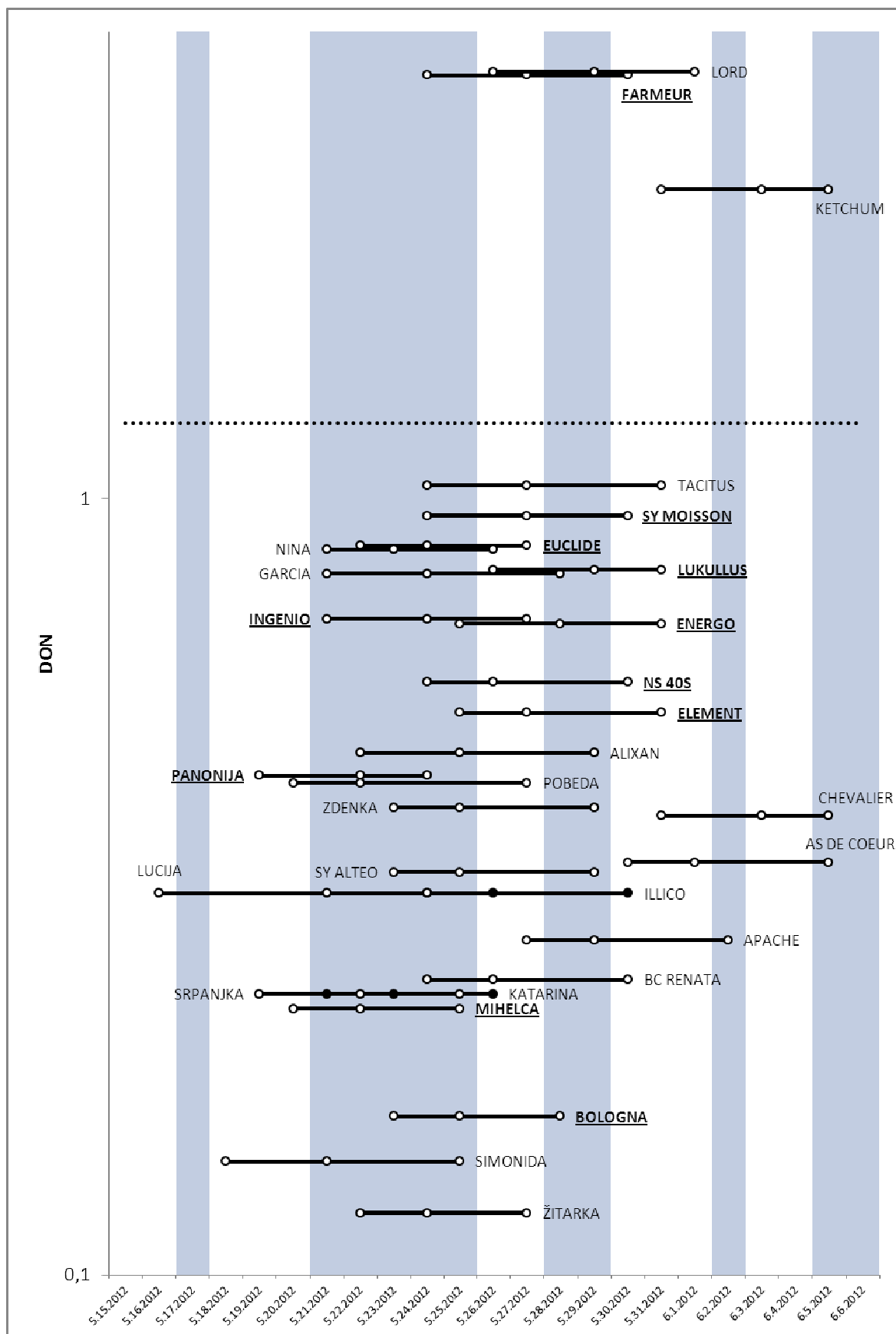
Zemljič A., Rutar R., Žerjav M., Verbič J. Vpliv sorte, gnojenja z dušikom in razkuževanja semena na okuženost zrnja pšenice s *Fusarium* sp. in onesnaženost z mikotoksini. V: Tajnšek, Anton (ur.). Novi izzivi v poljedelstvu 2008 : zbornik simpozija, Rogaška Slatina, [4. in 5. december] 2008. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2008, str. 257–262.



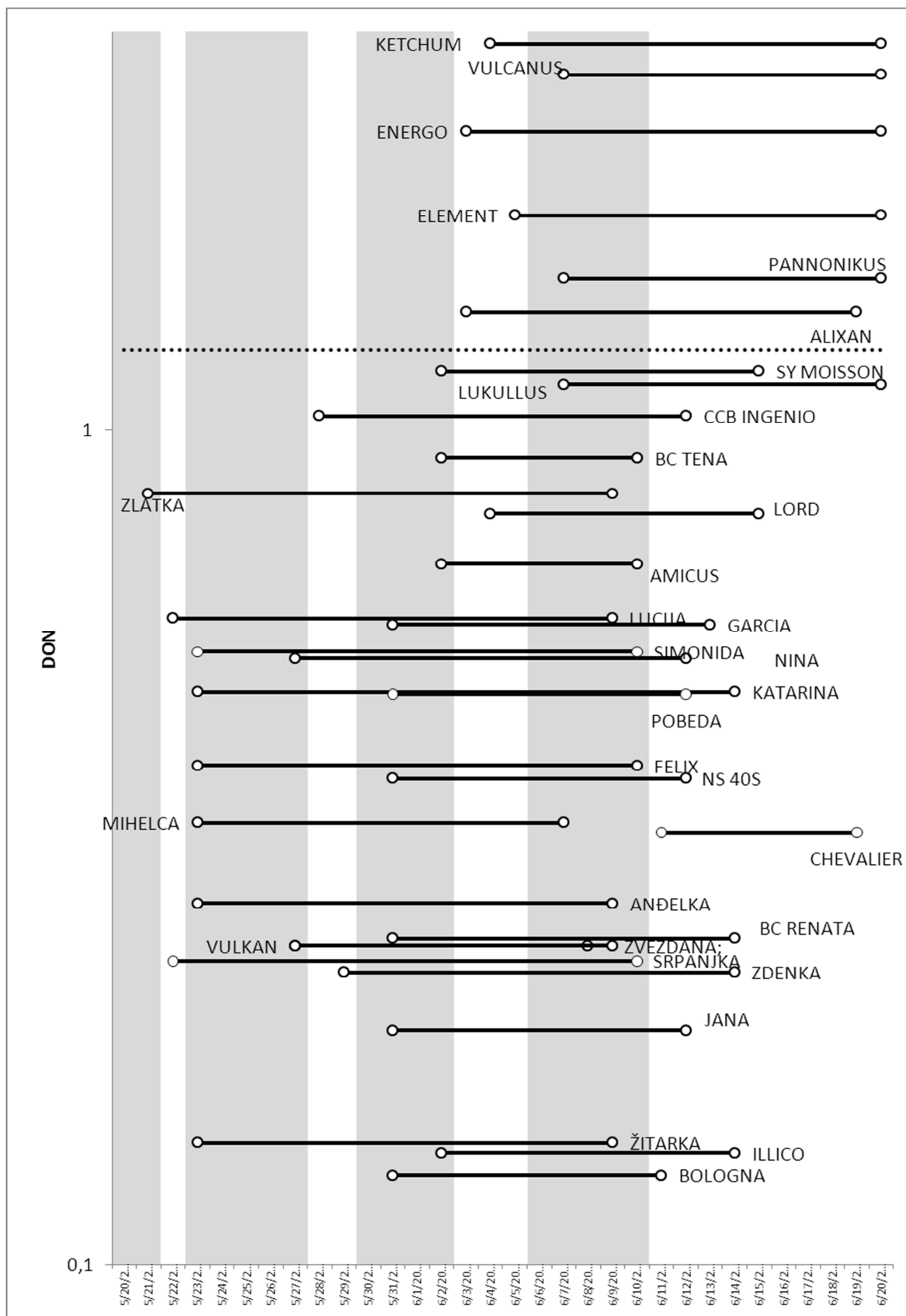
Priloga 1: Prikaz časa cvetenja, padavinskih dni in vsebnosti DON (mg/kg) pri posameznih sortah v Rakičanu leta 2012.



**Priloga 2:** Prikaz časa cvetenja, padavinskih dni in vsebnosti DON (mg/kg) pri posameznih sortah v Rakičanu leta 2013.



Priloga 3: Prikaz časa cvetenja, padavinskih dni in vsebnosti DON (mg/kg) pri posameznih sortah v Jablah leta 2012.



**Priloga 4:** Prikaz časa cvetenja, padavinskih dni in vsebnosti DON (mg/kg) pri posameznih sortah v Jablah leta 2013.



Leto	Lokacija	Sorta	Tip	povp ok klas	DON	ΣFusarium	FC_FG	ZC	KC	dni cvetenja	padavin (dni)	kol. pad. (mm)
2012	Rakičan	ALIXAN	G	0,12	0,104	8	1	13.maj	19.maj	7	2	15,4
2012	Rakičan	BC RENATA	G	0	0,047	3	1	19.maj	23.maj	5	3	52,9
2012	Rakičan	BOLOGNA	R	0,74	0,032	6	2	13.maj	18.maj	6	2	15,4
2012	Rakičan	GARCIA	G	0,25	0,159	8	2	13.maj	18.maj	6	2	15,4
2012	Rakičan	ILLICO	G	1,85	0,098	5	3	15.maj	21.maj	7	2	0,6
2012	Rakičan	INGENIO	R	8,76	0,135	6	2	11.maj	17.maj	7	2	15,4
2012	Rakičan	KATARINA	G	0,37	0,115	9	6	13.maj	17.maj	5	2	15,4
2012	Rakičan	KETCHUM	G	14,19	0,297	3	1	24.maj	27.maj	4	1	1,1
2012	Rakičan	LORD	G	4,56	0,24	4	3	20.maj	24.maj	5	3	52,9
2012	Rakičan	LUCIJA	G	0	0,149	7	2	8.maj	14.maj	7	2	19,1
2012	Rakičan	LUKULLUS	R	0,86	0,133	3	2	18.maj	22.maj	5	2	2,2
2012	Rakičan	MIHELCA	R	5,55	0,173	2	1	9.maj	14.maj	6	1	14,9
2012	Rakičan	NINA	G	4,56	0,18	9	4	11.maj	17.maj	7	2	15,4
2012	Rakičan	NS 40S	R	0,12	0,106	3	1	13.maj	18.maj	6	2	15,4
2012	Rakičan	SIMONIDA	G	0,12	0,156	3	1	11.maj	15.maj	5	1	14,9
2012	Rakičan	SRPANJKA	G	0	0,148	9	4	8.maj	14.maj	7	2	19,1
2012	Rakičan	SY MOISSON	R	1,97	0,155	8	2	18.maj	21.maj	4	1	0,1
2012	Rakičan	ZDENKA	G	1,11	0,144	3	2	18.maj	21.maj	4	1	0,1
2012	Rakičan	ŽITARKA	G	0,62	0,083	9	3	12.maj	18.maj	7	2	15,4
		Σ		45,75	2,654	108	43			110	35	301,1
		povprečje		2,41	0,14	5,68	2,26			5,8	1,8	15,8

**Priloga 5:** Zbirna preglednica po posameznih sortah pšenice; tipu: G-golica, R-resnica; okuženosti klasov (%); vsebnosti DON (mg/kg); skupna okuženost s fuzariozami (%); Okuženost z glivama *F. culmorum* (FC) in *F. graminearum* (FG); datum začetka (ZC) in konca cvetenja (KC); trajanje cvetenja (dni); število padavinskih dni med cvetenjem; skupna količina padavin med cvetenjem (mm) za lokacijo Rakičan v letu 2012.

Leto	Lokacija	Sorta	Tip	povp ok klas	DON	ΣFusarium	FC_FG	ZC	KC	dni cvetenja	padavin (dni)	kol. pad. (mm)
2012	Jable	ALIXAN	G	4,69	0,467	7	6	22.maj	29.maj	8	7	36,1
2012	Jable	BC RENATA	G	0,62	0,242	4	1	24.maj	30.maj	7	5	13,2
2012	Jable	BOLOGNA	R	0,25	0,162	2	2	23.maj	28.maj	6	5	16,6
2012	Jable	GARCIA	G	14,69	0,8	21	18	21.maj	28.maj	8	7	40,1
2012	Jable	ILLICO	G	0,86	0,307	4	3	24.maj	30.maj	7	5	13,2
2012	Jable	INGENIO	R	4,94	0,703	32	30	21.maj	27.maj	7	6	38,9
2012	Jable	KATARINA	G	0,49	0,227	9	0	21.maj	26.maj	6	6	38,9
2012	Jable	KETCHUM	G	2,1	2,498	24	23	31.maj	5.jun	6	2	39,2
2012	Jable	LORD	G	8,76	3,55	27	24	26.maj	1.jun	7	3	1,5
2012	Jable	LUCIJA	G	0,99	0,308	9	6	16.maj	24.maj	9	5	31,3
2012	Jable	LUKULLUS	R	5,43	0,814	16	12	26.maj	31.maj	6	3	1,5
2012	Jable	MIHELCA	R	0,74	0,222	10	2	20.maj	25.maj	6	5	38,8
2012	Jable	NINA	G	3,21	0,862	5	1	21.maj	26.maj	6	6	38,9
2012	Jable	NS 40S	R	0,74	0,576	5	4	24.maj	30.maj	7	5	13,2
2012	Jable	SIMONIDA	G	0,49	0,138	6	6	18.maj	25.maj	8	5	38,8
2012	Jable	SRPANJKA	G	1,48	0,229	10	7	19.maj	25.maj	7	5	38,8
2012	Jable	SY MOISSON	R	3,46	0,946	18	18	24.maj	30.maj	7	5	13,2
2012	Jable	ZDENKA	G	6,67	0,396	9	8	23.maj	29.maj	7	6	16,8
2012	Jable	ŽITARKA	G	0,12	0,118	13	7	22.maj	27.maj	6	5	34,7
		Σ		60,73	13,565	231	178			131	96	503,7
		povprečje		3,20	0,71	12,16	9,37			6,9	5,1	26,5

**Priloga 6:** Zbirna preglednica po posameznih sortah pšenice; tipu: G-golica, R-resnica; okuženosti klasov (%); vsebnosti DON (mg/kg); skupna okuženost s fuzariozami (%); Okuženost z glivama *F. culmorum* (FC) in *F. graminearum* (FG); datum začetka (ZC) in konca cvetenja (KC); trajanje cvetenja (dni); število padavinskih dni med cvetenjem; skupna količina padavin med cvetenjem (mm) za lokacijo Jable v letu 2012.

Leto	Lokacija	Sorta	Tip	povp ok klas	DON	ΣFusarium	FC_FG	ZC	KC	dni cvetenja	padavin (dni)	kol. pad. (mm)
2013	Rakičan	ALIXAN	G	3,33	0,136	5	2	22.maj	28.maj	7	3	16,3
2013	Rakičan	BC RENATA	G	0,37	0,095	3	3	22.maj	26.maj	5	2	15,9
2013	Rakičan	BOLOGNA	R	2,34	0,017	2	0	18.maj	23.maj	6	1	4,9
2013	Rakičan	GARCIA	G	0,49	0,057	2	1	19.maj	23.maj	5	0	0
2013	Rakičan	ILLICO	G	0,49	0,077	2	2	19.maj	25.maj	7	1	0,2
2013	Rakičan	INGENIO	R	0,86	0,117	5	3	18.maj	25.maj	8	2	5,1
2013	Rakičan	KATARINA	G	1,48	0,086	2	1	18.maj	24.maj	7	1	4,9
2013	Rakičan	KETCHUM	G	2,1	1,033	19	11	3.jun	6.jun	4	4	6
2013	Rakičan	LORD	G	2,71	0,14	3	3	22.maj	26.maj	5	2	15,9
2013	Rakičan	LUCIJA	G	0,74	0,015	6	6	15.maj	20.maj	6	2	5,6
2013	Rakičan	LUKULLUS	R	0,49	0,093	3	1	25.maj	30.maj	6	4	16,5
2013	Rakičan	MIHELCA	R	1,73	0,071	6	2	16.maj	21.maj	6	2	5,6
2013	Rakičan	NINA	G	0,12	0,071	10	2	18.maj	24.maj	7	1	4,9
2013	Rakičan	NS 40S	R	0	0,114	4	3	19.maj	24.maj	6	0	0
2013	Rakičan	SIMONIDA	G	1,23	0,008	2	2	15.maj	21.maj	7	2	5,6
2013	Rakičan	SRPANJKA	G	4,56	0,003	6	4	15.maj	21.maj	7	2	5,6
2013	Rakičan	SY MOISSON	R	0	0,040	5	1	21.maj	25.maj	5	1	0,2
2013	Rakičan	ZDENKA	G	0,86	0,061	6	2	20.maj	24.maj	5	0	0
2013	Rakičan	ŽITARKA	G	2,59	0,053	6	1	18.maj	24.maj	7	1	4,9
		Σ		26,49	2,287	97	50			116	31	118,1
		povprečje		1,39	0,120	5,11	2,63			6,1	1,6	6,2

**Priloga 7:** Zbirna preglednica po posameznih sortah pšenice; tipu: G-golica, R-resnica; okuženosti klasov (%); vsebnosti DON (mg/kg); skupna okuženost s fuzariozami (%); Okuženost z glivama *F. culmorum* (FC) in *F. graminearum* (FG); datum začetka (ZC) in konca cvetenja (KC); trajanje cvetenja (dni); število padavinskih dni med cvetenjem; skupna količina padavin med cvetenjem (mm) za lokacijo Rakičan v letu 2013.

Leto	Lokacija	Sorta	Tip	povp ok klas	DON	ΣFusarium	FC_FG	ZC	KC	dni cvetenja	padavin (dni)	kol. pad. (mm)
2013	Jable	ALIXAN	G	0,25	1,385	15	8	3.jun	19.jun	17	5	46,2
2013	Jable	BC RENATA	G	0,86	0,246	14	3	31.maj	14.jun	15	8	72,1
2013	Jable	BOLOGNA	R	0,12	0,128	11	2	31.maj	11.jun	12	8	72,1
2013	Jable	GARCIA	G	0,37	0,585	11	3	31.maj	13.jun	14	8	72,1
2013	Jable	ILLICO	G	0,12	0,136	4	1	2.jun	14.jun	13	6	52,1
2013	Jable	INGENIO	R	0,12	1,04	18	7	28.maj	12.jun	16	9	77,2
2013	Jable	KATARINA	G	1,73	0,486	17	8	23.maj	14.jun	22	14	114,9
2013	Jable	KETCHUM	G	1,6	2,905	17	14	4.jun	20.jun	17	5	46,2
2013	Jable	LORD	G	0	0,793	20	5	4.jun	15.jun	12	5	46,2
2013	Jable	LUCIJA	G	6,17	0,595	18	7	22.maj	9.jun	19	13	110,7
2013	Jable	LUKULLUS	R	0,25	1,135	10	4	7.jun	20.jun	14	4	44
2013	Jable	MIHELCA	R	1,36	0,339	2	2	23.maj	7.jun	16	11	73,7
2013	Jable	NINA	G	2,59	0,533	13	3	27.maj	12.jun	17	10	78,4
2013	Jable	NS 40S	R	0	0,382	24	2	31.maj	12.jun	13	8	72,1
2013	Jable	SIMONIDA	G	7,28	0,543	22	9	23.maj	10.jun	19	14	114,9
2013	Jable	SRPANJKA	G	0,86	0,231	13	5	22.maj	10.jun	20	14	114,9
2013	Jable	SY MOISSON	R	1,73	1,176	15	7	2.jun	15.jun	14	6	52,1
2013	Jable	ZDENKA	G	1,85	0,224	5	1	29.maj	14.jun	17	9	77,2
2013	Jable	ŽITARKA	G	4,69	0,14	8	0	23.maj	9.jun	18	13	110,7
		Σ		31,95	13,002	257	91			305	170	1447,8
		povprečje		1,68	0,684	13,53	4,79			16,1	8,9	76,2

**Priloga 8:** Zbirna preglednica po posameznih sortah pšenice; tipu: G-golica, R-resnica; okuženosti klasov (%); vsebnosti DON (mg/kg); skupna okuženost s fuzariozami (%); Okuženost z glivama *F. culmorum* (FC) in *F. graminearum* (FG); datum začetka (ZC) in konca cvetenja (KC); trajanje cvetenja (dni); število padavinskih dni med cvetenjem; skupna količina padavin med cvetenjem (mm) za lokacijo Jable v letu 2013.

## **Cilj 5: Poskusi v mlinsko predelovalni industriji za zmanjšanje pojavljanja ostankov v izdelkih, namenjenih potrošniku**

### **IZVLEČEK**

Popolna odstranitev mikotoksinov iz prehranske verige ni mogoča, zato je njihovo prisotnost v surovinah, krmi in hrani potrebno kontrolirati. Zagotavljanje varne hrane vključuje aktivnosti in kontrole, ki so potrebne za obvladovanje proizvodnega procesa od razvoja, nabave surovin, izdelave izdelka do njegove prodaje. Vemo, da so v vsakem segmentu proizvodnega procesa še potrebne izboljšave. Problematika je aktualna in pomembna.

Kemijska onesnaževala, ki izvirajo iz slabe kmetijske prakse, z nadaljnjimi postopki v predelavi živil zelo težko odstranimo in predstavljajo resno tveganje. Žitno predelovalna industrija ukrepa z ažurnim spremljanjem prisotnosti onesnaževal ter različnimi postopki čiščenja, sortiranja in luščenja. Zato smo preverili učinek postopkov priprave žita in mletja na vsebnost toksinov, učinke pogojev neoptimalnega skladiščenja zrnja, razporeditve toksinov v različnih frakcijah mletja ter učinek postopkov priprave polnozrnatega testa na vsebnost toksinov v končnem proizvodu. Ugotovili smo da je mogoče z uporabo atmosfere dušika in ogljikovega dioksida zaustaviti napredovanje kontaminacije z DON med čakanjem neoptimalno suhega žita (koruze) na sušenje. Z optičnimi sistemi čiščenja koruze pred mletjem je mogoče znatno zmanjšati koncentracijo toksinov. S frakcionirnim mletje pšenice je mogoče dobiti izdelke z zmanjšano količino DON.

### **ABSTRACT**

Complete elimination of mycotoxins from the food chain is not possible therefore, their presence in raw materials, feed and food should be monitored. Ensuring safe food includes activities and controls that are necessary to manage the production process from development, purchase of raw materials, the manufacturing of the product to its sales. It is known that in each segment of the production improvements of a process are still needed. The issue is very important.

Chemical pollutants arising from poor agricultural practices are very difficult to be removed with further operations in food processing and therefore they pose a serious risk. Grain processing industry performs constant monitoring of pollutants and applies different methods of cleaning, sorting and peeling. Therefore, the effect of the preparation procedures and grinding on the content of toxins, the effects of suboptimal storage conditions of grains, distribution of toxins in different milling fractions and the effect of the methods of preparation of wholegrain dough on the content of toxins in the final product. It was found out that it is possible to use nitrogen and carbon dioxide atmosphere to stop the progression of contamination by DON when sub-optimal dry cereals (maize) are kept before drying. With optical cleaning before grinding, the concentration of toxins in corn can be significantly reduced. The fractionated milling of wheat can result in products with a reduced amount of DON.

## 1 UVOD

Popolna odstranitev mikotoksinov iz prehranske verige ni mogoča, zato je njihovo prisotnost v surovinah, krmi in hrani potrebno kontrolirati. Zagotavljanje varne hrane vključuje aktivnosti in kontrole, ki so potrebne za obvladovanje proizvodnega procesa od razvoja, nabave surovin, izdelave izdelka do njegove prodaje (Siegel in Babuscio, 2011). Vemo, da so v vsakem segmentu proizvodnega procesa še potrebne izboljšave, kar nam dokazujejo tudi raziskave, ki se na to temo trenutno opravljajo v okviru evropskih projektov. Problematika je aktualna in pomembna.

Kemijska onesnaževala, ki izvirajo iz slabe kmetijske prakse, z nadaljnjimi postopki v predelavi živil zelo težko odstranimo in predstavljajo resno tveganje. Žitno predelovalna industrija ukrepa z ažurnim spremljanjem prisotnosti onesnaževal ter različnimi postopki čiščenja, sortiranja in luščenja.

Za dolgotrajno skladiščenje žit so potrebni optimalni pogoji (kontaminacija z glivami). Najpomembnejši pogoj za uspešno skladiščenje je optimalna vlažnost zrnja. Ta mora biti čim nižja, v nobenem primeru ne sme presegati 15 %. Zlasti pri koruzi je ta odstotek presežen ob žetvi, zato jo je potrebno dosušiti. Odločilno je, da jo posušimo dovolj hitro, sicer tvegamo rast gliv in tvorbo mikotoksinov.

Klasični mlini pred mletjem opravijo tako imenovano mlinsko "čiščenje", namen je v čim večji meri izločiti primesi, ki so po naravi kontaminanti ali pa slabšajo tehnološko kvaliteto končnih izdelkov. S preizkušanjem različnih načinov čiščenja žitne mešanice pred mletjem želimo najti najugodnejši postopek, ki bi lahko optimalno ločil hibna zrna, ki potencialno predstavljajo visoko vsebnost kontaminantov. Gliva namreč lahko med kontaminacijo v času vegetacije povzroči morfološke spremembe in spremembo obarvanosti na zrnju, kar bi lahko bil ključni faktor pri pripravi mešanice zrnja na mletje.

Znano je, da je koncentracija mikotoksinov v perifernih delih zrnja in kalčku večja. Sistem mletja v sodobnem mlinu je stopenjski. To pomeni, da zrno stopenjsko drobimo, tako da ločimo kalček, ovojnico in notranje dele endosperma. S sejanjem, drobljenjem in ponovnim sestavljanjem dobimo različne tipe mok, pri pšenici so to tipi 400, 500, 850, 1100 in 1600, polnozrnata moka in otrobi. Naši predposkusi kažejo, da toksini po mletju niso enakomerno porazdeljeni v vseh frakcijah. To podaja možnost izbrati tak način frakcioniranja, da dobimo frakcije z reducirano in frakcije s povečano vsebnostjo toksinov. Pričakovati je, da bodo frakcije iz notranjosti zrnja vsebovale manj toksinov, frakcije zunanjih delov in kalčka pa več.

Polnozrnate moke so s prehranskega stališča zelo primerne in zaželene v vsakodnevni uravnoteženi prehrani. Izhajajoč iz prejšnjega odstavka je problem polnozrnatih mok kontaminiranih žit v tem, da niso frakcionirane, ampak je sestava enaka kot je sestava zrnja. Iz literature je že dolgo poznano, da so mikotoksini termostabilni tako pri suhi kot tudi mokri toplotni obdelavi. Posebno pomemben je mikotoksin DON. Po literaturnih podatkih se v pečenem kruhu količina DON-a glede na vhodno surovino zmanjša le neznatno (Lancova in sod. 2008) medtem, ko rezultati nekaterih avtorjev navajajo, da je mogoče koncentracijo DON-a zmanjšati tudi za 38–44% (Neira in sod. 1996). Raziskave tudi kažejo, da kemijski adsorbenti za nižanje koncentracije mikotoksinov, ki so učinkoviti *in vitro*, niso nujno enako učinkoviti *in vivo*. Še več, na živilih jih je brez negativnih vplivov skoraj nemogoče aplicirati.

V delu projekta, ki smo ga namenili tehnološkemu postopkom v predelavi žit, smo na osnovi empiričnih testov poiskali možne načine ukrepanja za zmanjšanje verjetnosti pojavljanja mikotoksinov v izdelkih, namenjenih potrošniku. Osredotočili smo se na

DON, ki je v žitih zelo razširjen in predstavlja pomemben prehranski dejavnik tveganja tako za živali kot tudi za ljudi. Ker je DON zelo stabilen ter odporen na mletje in procese predelave, kontaminacije izdelkov iz žit z DON pogosto ne moremo preprečiti. Preverili smo učinek postopkov priprave žita na mletje na vsebnost toksinov, učinke pogojev neoptimalnega skladiščenja zrnja, razporeditve toksinov v različnih frakcijah mletja ter učinek postopkov priprave polnozrnatega testa na vsebnost toksinov v končnem proizvodu.

Poskuse smo izvajali na laboratorijskih napravah in v realnem industrijskem okolju v pogojih, ki so povprečni za to branžo na dejanskih industrijskih napravah (skladišče žit, mlinska čistilnica, mlin, pekarna). Testni žiti sta bili pšenica in koruza. Kemijske, fizikalne in organoleptične analize smo izvajali v lastnih ustrezno opremljenih laboratorijih. Preliminarne teste vsebnosti toksinov smo izvajali s pomočjo ELISA metode, preostale analize so bile opravljene na VF.

Poskušali smo ugotoviti, ali so pogoji blizu zgornje še dopustne vsebnosti vode v zrnju še optimalni za večletno skladiščenje kontaminiranih žit. V ta namen smo izvedli poskus skladiščenja koruze v atmosferi  $N_2$  in  $CO_2$ . S poskusom s frakcioniranjem plasti pšenice med postopkom mletja smo želeli ugotoviti porazdeljenost toksinov v posameznih slojih (frakcijah) mletja. S poskusom čiščenja žitne mešanice pred mletjem smo želeli pokazati, da je z optičnimi napravami mogoče zmanjšati vsebnost kontaminiranih zrn in toksinov. Možnosti za zniževanje vsebnosti toksinov v izdelkih, pripravljenih iz surovin, ki so vsebovale znatno količino toksinov, smo preverili s pripravo izdelkov s postopkom zamesa z uporabo klasičnih tehnologij, kislih mikrobnih bakterijskih starterjev in drugih morebitnih naravnih adsorbentov.

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

Poskus enoletnega skladiščenja koruze, kontaminirane z DON, v atmosferi  $N_2$  in  $CO_2$ , smo izvedli v treh desetlitrskih plastičnih vedrih s plastičnim pokrovom. Pred pričetkom skladiščenja smo po ugotovitvi stopnje vlažnosti zrnja s hitrim analizatorjem zrnja (FOSS) z enakomernim prhanjem in homogenizacijo dodali potrebno količino vode, tako da je končna vlažnost znašala 15 %, kar je nekoliko nad optimalno vlažnostjo za dolgotrajno skladiščenje. V prvem poskusu smo iz vedra izpodrinili zrak z uvajanjem dušika iz jeklenke s pomočjo cevke na dnu vedra, v drugem poskusu smo uporabili ogljikov dioksid, tretji poskus je služil kot primerjava. Odsotnost kisika smo preverjali s pomočjo elektronskega analizatorja kisika Oxibaby Casetechnic (Witt). Določanje mikotoksina DON je bilo izvedeno z metodo ELISA (Veratox® HS testi) z avtomatskim mikrotitratorjem in spektrofotometrom Veratox. Preiskovani vzorec je bil ekstahiran z raztopino metanola. Po filtraciji izvedemo v mikrotitrski napravi inkubacijo s kitom reagentov in vrednost odčitamo spektrofotometrično.

Izvedli smo poskus s frakcioniranjem plasti pšenice – stopenjskim mletjem z izločanjem zunanjih plasti na industrijskem mlinu proizvajalca Sangati. Moka je bila mleta po običajnem diagramu na naslednje frakcije; zdrob tipa 400 (5 %), polbele in bele moke (60 %), črna moka tipa 1600 (10 %) in otrobi (25 %). Poskus čiščenja žitne mešanice pred mletjem je bil izveden na industrijskem elektronskem optičnem separatorju Sortex (Buhler). Napravo je potrebno predhodno kalibrirati tako, da se določi tipičen videz neoporečne in oporečne frakcije. To se izvede tako, da se skozi napravo najprej spusti zrnja, ki so slabo razvita (puhla fuzariozna zrna in zrna, na katerih smo zaznali rast gliv).

Napravo nastavimo tako, da so to (škart) zrnja, ki jih mora naprava izločati iz glavnega vzorca.

Raziskali smo možnosti za zniževanje vsebnosti toksinov v izdelkih pripravljenih iz surovin, ki so vsebovale znatno količino toksinov. Testni izdelek je bil kruh, uporabili smo različne postopke podaljšane fermentacije testa z uporabo kisljih mikrobnih bakterijskih starterjev: naravnega kislega testa, kislega testa pripravljenega s pomočjo mikrobne kulture *Lactobacillus plantarum* Danisco Lp 115, ter testa z dodatkom posušenih kvasnih celic *Saccharomyces cerevisiae* in testa, pripravljenega z običajno kulturo *Saccharomyces cerevisiae*. Za pripravo mešanega koruznega kruha smo uporabili pšenično moko, ki smo ji dodali kontaminirano koruzno moko, tako da je vsebnost DON znašala 500 ppb. Za test smo pripravili štiri različna predtesta, ki smo jih inkubirali (24-urna fermentacija) v hladilniku pri temperaturi 6 °C in na sobni temperaturi pri 26 °C. Predtesto smo uporabili v glavnem zamesu v razmerju 50:50.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Predvidevali smo, da nepravčasno dosuševanje koruze (pri pšenici se sicer to redko dogaja) in slabo skladiščenje močno poslabšata kvaliteto zrnja. Za poskus enoletnega skladiščenja koruze, kontaminirane z DON, v atmosferi N<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>, smo določili količino DON-a pred in po koncu skladiščenja. Začetna koncentracija je znašala 3,4 mg/kg, končna koncentracija pa 3,7 mg/kg pri poskusu v navadni atmosferi in 3,3 mg/kg pri poskusih v atmosferi dušika in ogljikovega dioksida. Ugotovili smo, da sprememba količine DON-a (pri 15 % vlažnosti zrnja) ni povezana z načinom skladiščenja in ni statistično značilna.

V poskusu, pri katerem smo imitirali skladiščenje neposušene koruze, smo ugotovili, da skladiščenje v atmosferi N<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> odločilno vpliva na končno vsebnost toksinov po enotedenski inkubaciji v testnih posodah pri 26 °C. Koruzo smo navlažili na 18 % vlažnost, kolikor bi vlažnost lahko realno znašala pred pričetkom sušenja. Začetna koncentracija DON-a je znašala 3,4 mg/kg, končna koncentracija pa 30,5 mg/kg pri poskusu v navadni atmosferi ter 4,3 mg/kg pri poskusih v atmosferi dušika in 4,0 mg/kg v atmosferi ogljikovega dioksida.

Znano je, da je koncentracija mikotoksinov v perifernih delih zrnja in kalčku večja. V realnih industrijskih razmerah smo poskušali ugotoviti, koliko je mogoče zmanjšati koncentracijo mikotoksinov v frakcijah mletja za humano uporabo. S poskusi v realnem sistemu mletja na industrijskem mlinu Sangati je bilo ugotovljeno, da se koncentracija DON-a v frakciji moke zmanjša za povprečno 17 %, če izločimo 25 % zunanjih delov zrnja (otrobov) in za 24 %, če izločimo 35 % zunanjih delov zrnja, to je otrobov in mok višjega tipa meljave. Sorazmerno se v obeh frakcijah zunanjih delov zrnja koncentracija DON-a poveča. Najmanjša koncentracijo DON-a je bila dosežena v frakciji iz sredine zrnja, to je zdrobu tipa 400.

Poskus čiščenja žitne mešanice pred mletjem je bil izveden na industrijskem elektronskem optičnem separatorju. Naprava deluje na osnovi prepoznavanja z glivo poškodovanih zrn. Tako prepoznavanje je relativno zahtevno, naprava ni sposobna povsem ločiti zdravih od nezdravih zrn. V poskusih se je pokazalo, da naprava izloči preveč zrn, v izmetu hibnih zrn najdemo tudi zdrava in obratno. Kljub vsemu tako čiščenje ocenjujemo za uspešno. Z določanjem vsebnosti DON-a v mešanici pred čiščenjem in po čiščenju s hitrimi testom je bilo ugotovljeno, da je vsebnost DON-a mogoče zmanjšati za 80 %.



V poskusu priprave kislega predtesta, inkubiranega 24 ur pri sobni temperaturi je bilo ugotovljeno, da je mogoče vsebnost toksinov v končnem izdelku, pripravljenem iz kontaminirane moke zmanjšati. V končnem izdelku je bila koncentracija DON-a zmanjšana za  $20\pm 9\%$ . Sipanje rezultatov je relativno veliko, vendar zmanjšanja koncentracije DON-a glede na literaturne podatke ne bi mogli pripisati le temperaturni obdelavi pri peki izdelka. Po drugi strani pa tudi nekaj deset odstotno zmanjšanje koncentracije toksina v primeru, ko je koncentracija toksina v vhodnem materialu zelo presežena, ne bi pomenila znatnega napredka. Problematični so tudi morebitni razgradni produkti toksina, zagotovo bi bilo potrebno v tej smeri poglobiti raziskovalno delo.

Postavljeni cilj, da bodo na osnovi empiričnih testov v tehnoloških postopkih v mlinsko predelovalni industriji podani možni načini ukrepanja za doseganje manjše verjetnosti pojavljanja ostankov v izdelkih, namenjenih potrošniku je bil dosežen.

#### **4 ZAKLJUČKI**

Poskus enoletnega skladiščenja koruze, kontaminirane z DON, v atmosferi  $N_2$  in  $CO_2$  je pokazal, da sprememba količine DON-a (pri 15 % vlažnosti zrnja) ni povezana z načinom skladiščenja in ni statistično značilna. Nasprotno pa je poskus s skladiščenjem nesušene koruze z 19 % izhodiščno vlažnostjo pokazal, da skladiščenje v atmosferi  $N_2$  in  $CO_2$  znatno zmanjša dvig koncentracije toksina DON. S poskusi čiščenja žitne mešanice pred mletjem je bilo ugotovljeno, da mora biti naprava precizno umerjena na hibna zrnja s prepoznavnimi vidnimi zunanjimi znaki, ki so posledica kontaminacije z glivami. Ugotovljeno je bilo, da je vsebnost DON z tako napravo mogoče zmanjšati za 80%. S poskusi v realnem sistemu mletja na industrijskem mlinu je bilo ugotovljeno, da se koncentracija DON-a v frakciji moke zmanjša za povprečno 17 %, če izločimo 25 % zunanjih delov zrnja (otrobov) in za 24 %, če izločimo 35 % zunanjih delov zrnja, to je otrobov in mok višjega tipa meljave. Sorazmerno se v obeh frakcijah zunanjih delov zrnja koncentracija DON-a poveča. Najmanjša koncentracija DON-a je bila dosežena v frakciji iz sredine zrnja, to je zdrobu tipa 400. Poskus priprave kruha s 24-urno predfermentacijo z uporabo kislih mikrobnih bakterijskih starterjev kažejo, da bi bilo mogoče relativno majhno zmanjšanje koncentracije DON-a doseči tudi z vodenjem tehnološkega postopka priprave kruha. Vendar je zmanjšanje koncentracije premajhno, da bi bil postopek uspešen pri znatno kontaminiranih surovinah.

#### **5 PRIPOROČILA**

Priporoča se takojšnje sušenje ne dovolj suhega žita (korusa), sicer se vsebnost toksinov lahko znatno poveča.

Med čakanjem neoptimalno suhega žita (korusa) na sušenje bi bilo mogoče z uporabo atmosfere dušika in ogljikovega dioksida zaustaviti napredovanje kontaminacije z DON.

Z optičnimi sistemi čiščenja žitne mešanice (korusa) pred mletjem je mogoče znatno zmanjšati koncentracijo toksinov.

S frakcionirnim mletjem pšenice je mogoče dobiti izdelke z zmanjšano količino DON-a.

## 6 LITERATURA

European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General 1999. Annex VI to the minutes of the 119th Plenary meeting opinion on fusarium toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON). European Commission, Bruxelles, 9 str.

David Siegel, Teresa Babuscio. 2011. Mycotoxin management in the European cereal trading sector, *Food Control*, 22, 1145–1153.

Lancova K., Hajslova J., Kostelanska M., Kohoutkova J., Nedelnik J., Moravcova H., Vanova M. 2008. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: Milling and baking. *Food Additives and Contaminants*, 25(5), 650–659.

Neira M.S., Pacin A.M., Martinez E.J., Molto G., Resnik S. L. 1997. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination, *International Journal of Food Microbiology*, 37, 21–25.

## ZAKLJUČKI IN PRIPOROČILA

Iz poročil, ki se nanašajo na posamezne cilje projekta, je razvidno, da so bili zastavljeni cilji doseženi. V zvezi s posameznimi cilji projekta smo pripravili zaključke in priporočila.

### **Uradni nadzor živil in kontaminiranost živil na slovenskem trgu z mikotoksini**

- V prihodnosti bi bilo koristno razširiti/poglobiti raziskovanje prisotnosti mikotoksinov v integriranih in ekoloških žitih ter žitnih izdelkih na slovenskem trgu. Z dovolj velikim številom vzorcev s slovenskega trga bi lahko pridobili statistično značilne rezultate in ugotovili vzroke za potencialno višjo vsebnost mikotoksinov v integriranih in ekoloških izdelkih v primerjavi s konvencionalnimi. Na osnovi izsledkov te raziskave zaradi pomanjkanja števila vzorcev namreč ni moč z gotovostjo trditi, da je glede vsebnosti mikotoksinov katerakoli skupina žitnih izdelkov (konvencionalna, ekološka ali integrirana) za potrošnike ugodnejša od druge. Ugotovitev je videti v neskladju z rezultati tretjega dela raziskave (Ugotavljanje okuženosti različnih sort/hibridov pšenice in koruze s fuzariozami s poljskimi poskusi), kjer je bilo ugotovljeno, da je okuženost pšenice iz ekološke pridelave precej manjša kot okuženost integrirano pridelane pšenice. Neskladje je manjše, če primerjamo ugotovljene koncentracije DON. Te so bile v ekološko pridelanih vzorcih iz okolice Rakičana v povprečju nekoliko višje kot v vzorcih iz integrirane pridelave. V Jablah je bila vsebnost DON v zrnju iz ekološke pridelave izrazito nižja kot pri tistih iz integrirane pridelave. Razliko v rezultatih pa lahko razložimo tudi s tem, da je pri poljskih poskusih šlo za slovensko pšenico, medtem ko je uradni nadzor poleg vzorcev slovenskega porekla zajel tudi vzorce iz drugih držav EU in iz tretjih držav, ki so dostopni na slovenskem trgu. Nadalje se rezultati obeh delov raziskav nanašajo na različna obdobja (uradni nadzor 2008–2012, poskusi na polju 2012–2014) in tudi število vzorcev v obeh raziskavah je bilo različno.
- Nadgradnja raziskave bi lahko bila vzporedno spremljanje prisotnosti pesticidov, zlasti fungicidov, v žitih in žitnih izdelkih v odvisnosti od metode pridelave/predelave.
- Podatke za zgoraj navedeno raziskavo bi bilo možno pridobiti tudi s prilagojenimi letnimi plani vzorčenja v okviru uradnega nadzora. Rezultati tovrstnih nadaljnjih raziskav bi v bodočnosti prispevali k zmanjševanju vsebnosti mikotoksinov v žitih in žitnih izdelkih, kar je pomembno za zaščito vseh potrošnikov.
- Glede na pridobljene rezultate bi bilo zaželeno prilagoditi zakonodajo na področju ekološke in integrirane pridelave/predelave v smislu rednega spremljanja ključnih mikotoksinov v žitih in žitnih izdelkih.
- Priporočilo potrošnikom na osnovi izsledkov te in sorodnih raziskav: Uravnotežena in raznolika prehrana je tudi glede izpostavljenosti mikotoksinom pomembna. Enostransko prehranjevanje s polnozrnatimi žitnimi izdelki oziroma otrobi lahko poveča možnost za večjo izpostavljenost mikotoksinom, ki so za zdravje škodljivi.

## **Analiza vzorcev koruzne in travne silaže s slovenskih kmetij**

- Glede na finančno omejenost raziskav v Sloveniji predlagamo, da se raziskave o vsebnosti mikotoksinov v silažah nadaljujejo. V projektu smo vsako leto analizirali 40 vzorcev, pri čemer smo imeli dve možnosti – ali jih odvzamemo po celi Sloveniji ali pa na posameznem področju. Odločili smo se za drugo možnost, poleg tega pa smo se odločili za odvzem jeseni in spomladi na isti kmetiji, da bi zaznali morebiten vpliv skladiščenja. Ugotovili smo, da razlik ni, zato bi se lahko v naslednjih letih osredotočili na posamezno področje ali pa bi vsako leto odvzeli vzorce po Sloveniji, kar pomeni manj vzorcev s posameznega področja, vendar je zajetih več področij. Najbolj kontaminirani so bili vzorci s Štajerske in iz Prekmurja.
- V raziskavo so bile zajete kmetije, kjer pri živalih ni bilo opaznih kliničnih znamenj bolezni. Mogoče bi bilo smiselno, da se v prihodnosti usmerimo na kmetije, kjer imajo zdravstvene težave.
- Priporočamo, da se uvedena metoda za določanje več mikotoksinov hkrati izkoristi v nadaljnjih raziskavah in za strokovno operativno delo. V metodo bi bilo smiselno dodati še druge toksine (aflatoksine, bovericin, enine, patulin, sterigmatocistin, andrastin, itd.), kajti v člankih že opisujejo določanje več kot 100 mikotoksinov hkrati. Poudarimo naj, da so te metode opisane raziskovalno, zato ne verjamemo, da bi jih lahko uporabljali v vsakdanji praksi. Izvedljivo pa je, da bi lahko naenkrat dokazovali cca. 25 mikotoksinov.

## **Ugotavljanje okuženosti različnih sort/hibridov pšenice in koruze s fuzariozami s poljskimi poskusi in s tem povezane odpornosti ter preučitev arhivskih podatkov in znanstvene literature o pojavljanju fuzarioz na koruzi in žitih v Sloveniji**

Na podlagi rezultatov pridobljenih v treh letih (2012–14) na dveh poskusnih lokacijah (Rakičan, Jable), ki se med seboj razlikujeta tako po vremenskih kot pedoloških razmerah, lahko zaključimo, da na pojavnost fuzarioz v pšenici in posledično mikotoksina DON vpliva predvsem lokacija in ne sorta. Kljub temu, da se v literaturi opozarja o pogosto preseženih vrednostih DON v pšenici in drugih strnih žitih, tega na osnovi pridobljenih podatkov ne moremo potrditi. Od pregledanih 169 vzorcev pšenice, jih je samo 9 presegalo zgornjo dovoljeno mejo vsebnosti DON (1250 µg/kg), tj. 5,3 % vseh analiziranih vzorcev. Vsi vzorci s preseženo vrednostjo DON so bili odvzeti na lokaciji Jable. V Jablah je bila povprečna okuženost zrnja z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, potencialnima tvorkama DON, v letih 2012–13 precej večja kot v Rakičanu, kar se je odrazilo tudi v večji vsebnosti DON. S pomočjo statistične analize pridobljenih podatkov smo ugotovili linearno regresijo med okuženostjo zrnja pšenice z glivama *F. graminearum* in *F. culmorum* ter vsebnostjo mikotoksina DON. Zakaj sta se omenjeni fuzariozi v večjem obsegu pojavljali na lokaciji Jable, je najbrž več razlogov. Bolj humidna klima vsekakor prispeva k optimalnejšim pogojem za okužbo s fuzariozama, hkrati pa skupaj z bolj težkimi oglejenimi tlemi onemogoča optimalno

pripravo tal pred jesensko setvijo. Na poskusnih parcelah, tako v Rakičanu kot Jablah že dolga leta prakticirajo dvopolje koruza - pšenica, kar s fitosanitarnega stališča ni primerno in naj bi pripomoglo k večji okuženosti pšenice s fuzariozami in kontaminiranostjo z mikotoksini. Kljub temu je bila v letih 2012–13 povprečna vsebnost mikotoksina DON v zrnju pšenice iz Rakičana daleč pod zakonsko predpisano zgornjo mejo, le 120 µg/kg, leta 2014 pa celo na meji detekcije. To gre pripisati dobro izvedenemu mulčenju ostankov okužene koruze in optimalnemu zaoravanju le teh na globino okoli 25 cm. Oboje omogoča hitro mikrobiološko razgradnjo okuženih ostankov in s tem zmanjšanje infekcijskega potenciala fuzarioz v naslednjem letu, kar se predvsem kaže v zmanjšanem oblikovanju spolnih trosišč gliv. Na lokaciji Jable so bili te agrotehnični deli slabše izvedeni. Koruznica ni bila fino zmulčena in tudi slabo zaorana, tako da so na površju tal ostali večji kosi okuženih stebel. Na tako velikih ostankih fuzarioze zlahka prezimijo in naslednje leto v spolnih trosiščih oblikujejo ogromno trosov, ki okužujejo pšenico v času cvetenja. Menimo, da je zelo globoko zaoravanje na težkih tleh s stališča mikrobiološke razgradnje ostankov okuženih rastlin neprimerno. V nižjih plasteh tal je ta upočasnjena zaradi pomanjkanja kisika in manjše številčnosti mikroorganizmov.

Podobno kot pri pšenici je okuženost koruze z glivama *F. culmorum* in *F. graminearum*, tvorkama mikotoksina DON, občutno večja v Jablah kot Rakičanu. Izvor kužila je precej verjetno v ostankih okužene koruze, ki je prejšnje leto rastla na sosednjih parcelah. Spolne spore gliv *Fusarium* spp. se namreč brez težav razširjajo z zračnimi tokovi. Na podlagi analize podatkov smo podobno kot pri pšenici ugotovili linearno regresijo med okuženostjo zrnja koruze z glivama *F. graminearum* in *F. culmorum* ter vsebnostjo mikotoksina DON, s tem da je regresijska povezava še močnejša.

Tako koruzo kot pšenico okužujejo skoraj identične *Fusarium* vrste, kar omogoča njihovo ohranjanje v ozkem kolobarju koruza-žita in posledično večjo gospodarsko škodo. Slovensko kmetijstvo je živinorejsko usmerjeno, tako da na njivah pretežno gojimo rastline, ki so namenjene živalski krmu (koruza, žita itn.). Ugotovimo lahko, da pri nas v poljedelski pridelavi prevladuje ozek kolobar (koruza, žita) ali v nekaterih primerih celo monokultura (koruza). V nadaljevanju navajamo nekaj kolobarje, ki bi bili s fitosaniarnega stališča primernejši v smislu zmanjševanja potencialnih okužb s fuzariozami, pa tudi drugimi rastlinkimi patogeni ter omejevanja škod zaradi škodljivcev. Predlog kolobarjev sta pripravila dr. Igor Šantavec in dr. Darja Kocjan Ačko. V posameznih kolobarjih so glavne kulture napisane z veliki črkami.

**A) Priporočeni norfolški štiriletni kolobar za poljedelske in živinorejske kmetije v SV in zahodni Sloveniji:**

1. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
2. leto: **JARI OVES** (podsevek črna detelja)
3. leto: **ČRNA DETELJA**
4. leto: **OZIMNA PŠENICA**; oljna redkev

**B) Priporočila za štiriletni kolobar z menjavanjem listank (L) in žit (Ž) (L-Ž-L-Ž) za poljedelske in živinorejske kmetije v SV in zahodni Sloveniji:**

1. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
2. leto: **JARI OVES**; oljna redkev
3. leto: **BOB**
4. leto: **OZIMNI JEČMEN**; mnogocvetna ljuljka

1. leto: **BUČE**
2. leto: **OZIMNA PŠENICA**; krmna ogrščica
3. leto: **GRAH**
4. leto: **TRITIKALA**; facelija

1. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
2. leto: **JARI OVES**; mnogocvetna ljuljka
3. leto: **SOJA** (za silažo)
4. leto: **OZIMNA PŠENICA**; oljna redkev

1. leto: **KORUZA ZA ZRNJE**
2. leto: **JARI OVES**; landsberška mešanica
3. leto: **SILAŽNA KORUZA**
4. leto: **OZIMNA PŠENICA**; krmna ogrščica

**C) Priporočila za štiriletni kolobar z menjavanjem listank (L) in žit (Ž) (L-L-Ž-Ž) za poljedelske in živinorejske kmetije v SV in zahodni Sloveniji:**

1. leto: **KROMPIR**; ržiga
2. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
3. leto: **OVES**
4. leto: **OZIMNA PŠENICA**; repa

**D) Priporočila za star slovenski petletni kolobar (oves-detelja-L-Ž-Ž) za poljedelske in živinorejske kmetije v SV in zahodni Sloveniji:**

1. leto: **OVES** (podsevek DTM)
2. leto: **DETELJNO TRAVNA MEŠANICA** (DTM)
3. leto: **SILAŽNA KORUZA**
4. leto: **OZIMNA PŠENICA**
5. leto: **OZIMNI JEČMEN**; silažna koruza

**E) Priporočila za star slovenski petletni kolobar (oves-detelja-L-Ž-L) za poljedelske in živinorejske kmetije v SV in zahodni Sloveniji:**

1. leto: **OVES** (podsevek DTM)
2. leto: **DETELJNO TRAVNA MEŠANICA** (DTM)
3. leto: **BUČE**
4. leto: **OZIMNA PŠENICA**; krmna ogrščica
5. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)

***F) Priporočila za renski petletni kolobar (L-Ž-Ž-L-Ž) za poljedelske in živinorejske kmetije v SV in zahodni Sloveniji:***

1. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
2. leto: **JARI OVES**
3. leto: **OZIMNA PŠENICA**; landsberška mešanica
4. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
5. leto: **OZIMNI JEČMEN**; sudanska trava

1. leto: **GRAH**
2. leto: **OZIMNA PŠENICA**
3. leto: **OZIMNI JEČMEN**; bela gorjušica
4. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
5. leto: **JARI OVES**; facelija

1. leto: **BOB**
2. leto: **OZIMNA PŠENICA**
3. leto: **TRITIKALA**; bela gorjušica
4. leto: **KORUZA** (za zrnje ali silažo)
5. leto: **JARI OVES**; facelija

1. leto: **OLJNA OGRŠČICA**; silažna koruza
2. leto: **JARI OVES**
3. leto: **OZIMNA PŠENICA**; landsberška mešanica
4. leto: **SILAŽNA KORUZA**
5. leto: **OZIMNI JEČMEN**

**Poskusi v mlinsko predelovalni industriji za zmanjšanje pojavljanja ostankov v izdelkih, namenjenih potrošniku**

- Priporoča se takojšne sušenje ne dovolj suhega žita (koruze), sicer se vsebnost toksinov lahko znatno poveča.
- Med čakanjem neoptimalno suhega žita (koruze) na sušenje bi bilo mogoče z uporabo atmosfere dušika in ogljikovega dioksida zaustaviti napredovanje kontaminacije z DON-om. Potrebno bi bilo evalvirati.
- Z optičnimi sistemi čiščenja žitne mešanice (koruze) pred mletjem je mogoče znatno zmanjšati koncentracijo toksinov.
- S frakcionirnim mletje pšenice je mogoče dobiti izdelke z zmanjšano količino DON.

## Objavljeni prispevki raziskovalcev projektne skupine, ki so nastali v povezavi s tematiko projekta

ŠANTAVEC, Igor, KOCJAN AČKO, Darja. Impact of fungicides and other preparations for seed treatment and different cultivation techniques on seed contamination of winter wheat (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.) = Vpliv fungicidov in drugih pripravkov za razkuževanje semena ter načinov pridelave na okuženost semena ozimne pšenice (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.). *Acta agric. Slov.* [Tiskana izd.], 2011, letn. 97, št. 3, str. 267-273. <http://aas.bf.uni-lj.si/september2011/12santavec.pdf>. [COBISS.SI-ID [6869881](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. A method using gas chromatography - mass spectrometry for the detection of mycotoxins from trichothecene groups A and B in grains. V: SALIH, Bekir (ur.). *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*. Rijeka: Intech, 2012, str. 225-244. <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-in-plant-science-wine-technology-toxicology-and-some-specific-applications/a-method-using-gas-chromatography-mass-spectrometry-for-the-detection-of-mycotoxins-from-trichothecene>. [COBISS.SI-ID [3506298](#)].

POPOVSKI, Sasho, CELAR, Franci Aco. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production - a review = Vpliv okoljskih dejavnikov na okužbo žit z glivami *Fusarium* spp. in tvorbo mikotoksinov - pregledni članek. *Acta agric. Slov.* [Tiskana izd.], 2013, vol. 101, št. 1, str. 105-116. <http://aas.bf.uni-lj.si/marec2013/12Popovski.pdf>. [COBISS.SI-ID [7542393](#)].

PAVŠIČ VRTAČ, Katarina, OJANPERÄ, Suvi, APAJALAHTI, Juha, ŠRIMPF, Karin, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. Analytical procedures for the determination of aflatoxin B1 in eggs of laying hens using immunoaffinity columns and liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection. *Food analytical methods*, ISSN 1936-9751, 2014, vol. 7, no. 9, str. 1-8, doi: [10.1007/s12161-014-9836-4](https://doi.org/10.1007/s12161-014-9836-4). [COBISS.SI-ID [3864186](#)].

KIRINČIČ, Stanislava, ŠKRJANC, Barbara, KOS, Nataša, KOZOLC, Brigita, PIRNAT, Nina, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia - official control of foods in the years 2008-2012. *Food control*, ISSN 0956-7135. [Print ed.], April 2015, vol. 50, str. 157-165, doi: [10.1016/j.foodcont.2014.08.034](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.034). [COBISS.SI-ID [3173349](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda. Novejša spoznanja o učinkih mikotoksinov na perutnino. V: Strokovno izobraževalni seminar Komisije za perutnino, Bokrač, 25. 10. 2011. *Strokovno izobraževalni seminar Komisije za perutnino*. [s. l.]: [Veterinarska zbornica, Komisija za perutnino], 2011, str. 8-12. [COBISS.SI-ID [3426170](#)].

TAVČAR-KALCHER, Gabrijela, PAVŠIČ VRTAČ, Katarina, UJČIČ VRHOVNIK, Igor, JAKOVAC-STRAJN, Breda, VENGUŠT, Anton. Kontaminacija žit v primarni proizvodnji s trihoteceni v Sloveniji. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). 4. slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18. do 19. november 2011. Program in zbornik referatov, (Slovenian veterinary research, Supplement, 13). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011, vol. 48, suppl. 13, str. 106-108. [COBISS.SI-ID [3441530](#)].

UJČIČ VRHOVNIK, Igor, ŠVARA, Tanja, VENGUŠT, Anton, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Ali mikotoksin deoksinivalenol vpliva na sesne pujske. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). 4. slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18. do 19. november 2011. Program in zbornik referatov, (Slovenian veterinary research, Supplement, 13). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011, vol. 48, suppl. 13, str. 112-114. [COBISS.SI-ID [3442042](#)].



JAKOVAC-STRAJN, Breda, VENGUŠT, Anton, MALOVRH, Tadej. Učinki toksinov, ki jih izločajo plesni *Fusarium* na imunski odziv svinj. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). 4. slovenski veterinarski kongres 2011, Portorož, 18. do 19. november 2011. *Program in zbornik referatov*, (Slovenian veterinary research, Supplement, 13). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2011, vol. 48, suppl. 13, str. 87-89. [COBISS.SI-ID [3439738](#)].

KIRINČIČ, Stanislava, ŠKRJANC, Barbara. Kemijsko tveganje v živilih pretežno rastlinskega izvora - uradni nadzor v Republiki Sloveniji 2007-2009. *Sporoč. - Urad Repub. Slov. stand. merosl.*, 2011, let. 21, št. 6, str. 18-20. [COBISS.SI-ID [2535909](#)].

KIRINČIČ, Stanislava, ŠKRJANC, Barbara. Chemical food safety in Slovenia : foods of plant origin predominantly 2007-2009. V: PLAZAR, Nadja (ur.), BABNIK, Katarina (ur.), MEULENBERG, Cécil J. W. (ur.). *Javno zdravje v 21. stoletju : program : mednarodni posvet, [Izola, Slovenia, 15-16 September 2011] : programme : international conference, Izola, Slovenia, 15-16 September 2011*. Izola: Visoka šola za zdravstvo, 2011, str. 47. [COBISS.SI-ID [2548197](#)].

LAPAJNE, Slavko, KIRINČIČ, Stanislava. *Program vzorčenja in laboratorijskih preskusov živil ter materialov in izdelkov, namenjenih za stik z živili, za leto 2010 : poročilo o realizaciji programa*. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011. 27 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [2516453](#)].

KIRINČIČ, Stanislava, LAPAJNE, Venčeslav. Poročilo o izvajanju posameznih nalog, povezanih z uradnim nadzorom, ki ga izvaja inšpektorat za kmetijstvo, gozdarstvo in hrano za leto 2011. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2012. 8 str., ilustr.

<http://www.iko.gov.si/fileadmin/iko.gov.si/pageuploads/IKZ/Porocila/IKZvzorcenje2011.pdf>. [COBISS.SI-ID [3139301](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela, UJČIČ VRHOVNIK, Igor, PAVŠIČ VRTAČ, Katarina, FON TACER, Klementina, VENGUŠT, Anton. Aflatoxins in Slovene milk and feed samples. V: KLINKON, Martina (ur.), JEŽEK, Jožica (ur.), STARIČ, Jože (ur.). *15th Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology [also] 14th Conference of the European Society of Veterinary Clinical Pathology, 3rd-7th July, 2012, Ljubljana, Slovenia*. Ljubljana: Veterinary Faculty, 2012, str. 174. [COBISS.SI-ID [3562618](#)].

KOVAČ, Boris. Razvojna iniciativa 1990: Center za biotehnologijo Mlinotest, V: Konferenca ob 20-letnici Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil: Biotehnologija in mikrobiologija za znanje in napredek. Urednik Peter Raspor in Maja Paš. Biotehniška fakulteta. Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, 27.–28. september 2012, str. 127-135.

KOVAČ, Boris. Izzivi in uspehi na področju biotehnologije v pekarstvu, V: Konferenca ob 20-letnici Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil: Biotehnologija in mikrobiologija za znanje in napredek. Urednik Peter Raspor in Maja Paš. Biotehniška fakulteta. Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, 27.–28. september 2012, str. 295-301.

JAKOVAC-STRAJN, Breda, ŠRIMPF, Karin, ROJKO, Arijana, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. Dokazovanje mikotoksinov v silazah = Detection of mycotoxins in silage. V: ČEH, Tatjana (ur.). *Zbornik predavanj : [being] Zdravec-Erjavec Days 2012, Radenci, November 8th and 9th, 2012*. Murska Sobota: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod, 2012, str. 55-60. [COBISS.SI-ID [3601274](#)].

KOVAČ, Boris. Racionalizacija rabe energije in embalaže z namenom zmanjšanja ogljičnega odtisa skupine izdelkov iz žit, V: Trendi in izzivi v živilstvu, prehrani, gostinstvu in turizmu [Elektronski vir] : zbornik prispevkov 2. mednarodne strokovne konference, 16.–17. november 2012, Ljubljana, Slovenija / [uredniki Jasna Kržin Stepišnik et al.]. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniški izobraževalni center, 2012. str. 100-106.

KOVAČ, Boris, GOLOB, Terezija, BOGATAJ, Janez, MIHALIČ, Tanja, KUŽNIK, Lea, VOMBERGAR, Blanka, KIRINČIČ, Stanislava, KAMNIKAR, Jerneja, PEČOVNIK, Breda. Trendi in izzivi v živilstvu, prehrani, gostinstvu in turizmu [Elektronski vir] : zbornik prispevkov 2. mednarodne strokovne konference, 16.-17. november 2012, Ljubljana, Slovenija / [uredniki Jasna Kržin Stepišnik et al.]. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniški izobraževalni center, 2012.

ROZMAN, Ludvik, CELAR, Franci Aco. Tolerantnost nekaterih novih Lj- križancev koruze na glivo Fusarium subglutinans in njihove kombinacijske sposobnosti = Tolerance of some new Lj-maize hybrids to Fusarium subglutinans and their combining ability. V: ČEH, Barbara (ur.), DOLNIČAR, Peter (ur.), MIHELIČ, Rok (ur.). *Novi izzivi v agronomiji 2013 : zbornik simpozija, Zreče, [24. in 25. januarja] 2013 : proceedings of symposium, Zreče, 2013*. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2013, str. 296-303. [COBISS.SI-ID [7424889](#)].

ŠANTAVEC, Igor. Določitev optimalnega roka setve ozimnega ječmena = Determination of optimum sowing date for winter barley. V: ČEH, Barbara (ur.), DOLNIČAR, Peter (ur.), MIHELIČ, Rok (ur.). *Novi izzivi v agronomiji 2013 : zbornik simpozija, Zreče, [24. in 25. januar] 2013 = New challenges in agronomy 2013 : proceedings of symposium, [Zreče, 2013]*. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2013, str. 148-154. [COBISS.SI-ID [7428473](#)].

ROZMAN, Ludvik, CELAR, Franci Aco. Tolerantnost nekaterih novih Lj- križancev koruze na glivo Fusarium subglutinans in njihove kombinacijske sposobnosti = Tolerance of some new Lj-maize hybrids to Fusarium subglutinans and their combining ability. V: ČEH, Barbara (ur.), DOLNIČAR, Peter (ur.), MIHELIČ, Rok (ur.). *Novi izzivi v agronomiji 2013 : zbornik simpozija, Zreče, [24. in 25. januar] 2013 = New challenges in agronomy 2013 : proceedings of symposium, [Zreče, 2013]*. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2013, str. 296-303. [COBISS.SI-ID [7424889](#)].

STARIČ, Jože, JEŽEK, Jožica, ŠVARA, Tanja, POGAČNIK, Milan, GOMBAČ, Mitja, MIČUNOVIČ, Jasna, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela, MIS, Matija, LIKAR, Matevž, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Tail tip necrosis in fattening bulls. V: GVOZDIČ, Dragan (ur.). 13th Middle European Buiatrics Congress, 5 - 8 June, 2013, Belgrade. *Congress proceedings*. Belgrade: Serbian Buiatric's association, Faculty of Veterinary, 2013, str. 107-111. [COBISS.SI-ID [3691642](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda, ŠRIMPF, Karin, UJČIČ VRHOVNIK, Igor, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. Određivanje mikotoksina u travnoj i kukuruznoj silaži = Determination of mycotoxins in grass and maize silage. V: LULIĆ, Slavko (ur.). XX Međunarodno savetovanje, Opatija, 5.-7. lipnja 2013. *Krmiva 2013 : zbornik sažetaka = book of abstracts*. Zagreb, 2013: Krmiva, str. 31. [COBISS.SI-ID [3687802](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda, MILIČEVIĆ, Dragan, JURŠIČ-CIZERL, Rahela, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela, PAVŠIČ VRTAČ, Katarina, ZORMAN-ROJS, Olga, POGAČNIK, Milan, ŠVARA, Tanja. Evaluation of feed and histopathological lesions of some organs of laying hens-possible implication on meat quality. V: International 57th Meat Industry Conference, Belgrade, 10th-12th June, 2013. LILIĆ, Slobodan (ur.), ĐORĐEVIĆ, Vesna (ur.). *Meat and meat products - perspectives of sustainable production : Proceedings*. Belgrade: Institute of Meat Hygiene and Technology, 2013, str. 184-188. [COBISS.SI-ID [3702906](#)].

DOLENŠEK, Tamara, ŠVARA, Tanja, POGAČNIK, Milan, LUZAR, Boštjan, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Assessment of toxic effects of mycotoxin deoxynivalenol (DON) on the liver of young gilts and their suckling piglets. V: HROVATEK TOMIĆ, Danijela (ur.). The fifth International Congress Veterinary Science and Profession, Zagreb, 2013. *Book of abstracts*. Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2013, str. 93-94. [COBISS.SI-ID [3734906](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda, ŠINIGOJ-GAČNIK, Ksenija, KIRBIŠ, Andrej, TAVČAR-KALCHER, Gabrijela. Aflatoxin M1 in milk samples. V: 4th International Scientific Meeting, 6-8 September 2013, Republic of Macedonia, Struga. MITROV, Dine (ur.), PENDOVSKI, Lazo (ur.). *Days of veterinary medicine 2013 : proceedings*. Skopje: Faculty of veterinary medicine, 2013, str. 37-38. [COBISS.SI-ID [3727738](#)].

DOLENŠEK, Tamara, ŠVARA, Tanja, POGAČNIK, Milan, LUZAR, Boštjan, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Does feed naturally contaminated with Fusarium mycotoxins have an effect on the liver of young gilts?. V: 17th European Society of Veterinary and Comparative Nutrition Congress, 19-21 September, 2013, Ghent, Belgium. *Proceedings*. Zelzate: University Press, 2013, str. 113. [COBISS.SI-ID [3728250](#)].

ROJKO, Arijana, HOJNIK, Nisa, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Mikotoksini in zaviralne substance v travni in koruzni silaži. *Ructus*, 2013, št. 32, str. 17. [COBISS.SI-ID [3701626](#)].

ŠKERLAVAJ, Tinkara. Tehnika LC-MS/MS za sočasno določanje mikotoksinov v koruzi in travni silaži : projektna naloga. Ljubljana: Biotehniški izobraževalni center, Gimnazija in veterinarska šola, 2013. 36 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [3711866](#)].

ROZMAN, Ludvik, KOS, Katarina. Kombinacijske sposobnosti Lj-linij koruze in tolerantnost njihovih križancev na glivo Fusarium subglutinans = Combining ability and tolerance of Lj-maize genotypes to Fusarium subglutinans. V: TRDAN, Stanislav (ur.). *Izvečki referatov = Abstract volume*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia, 2013, str. 61-62. [COBISS.SI-ID [7477881](#)].

DOLENŠEK, Tamara, ŠVARA, Tanja, POGAČNIK, Milan, LUZAR, Boštjan, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Assessment of toxic effects of mycotoxin deoxynivalenol (DON) on the liver of young gilts and their suckling piglets. V: The fifth International Congress Veterinary Science and Profession, Zagreb, 2013. HROVATEK TOMIĆ, Danijela (ur.). *Book of abstracts*. Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 2013, str. 93-94. [COBISS.SI-ID [3734906](#)].

JAKOVAC-STRAJN, Breda. Mikotoksini, s poudarkom na aflatoksinih, v krmi in živilih živalskega izvora. V: *Novosti na področju zagotavljanja varne hrane : seminar št. 32*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Center za podiplomski študij in permanentno izobraževanje, 2013, str. 21-29. [COBISS.SI-ID [3746682](#)].

TAVČAR-KALCHER, Gabrijela, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Determination of mycotoxins in feed. V: 3rd VetLab Conference of Alpe Adria Region, 14th November - 15th November 2013, Ljubljana. ZABAVNIK PIANO, Jelka (ur.). *Strengthening of scientific cooperation among veterinary laboratories and veterinary services of the Alpe Adria Region (Carinthia, Slovenia and Friuli Venezia Giulia)*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2013, str. 49-54. [COBISS.SI-ID [3819898](#)].

KOČILA, Predrag, JAKOVAC-STRAJN, Breda. Mikotoksini u proizvodnji stočne hrane. V: *Zbornik sažetaka 58. seminara biljne zaštite, Opatija, 11.-14. veljače 2014*, (Glasilo biljne zaštite,

ISSN 1332-9545, God. 14, br. 1/2 - dodatak, 2014). Zagreb: Hrvatsko društvo biljne zaštite, 2014, god. 14, br. 1/2, str. 36. [COBISS.SI-ID [3790458](#)].

KIRINČIČ, Stanislava, ŠVAB, Ajda. Škodljivost mikotoksinov v živilih, s poudarkom na žitih in žitnih izdelkih. *Trendi in izzivi v živilstvu*. Ljubljana: BIC, 24. oktober, 2014.