

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Dević Doroteja

Karača Sara

Kontaminacija hrane za životinje
deoksinivalenolom i zearalenonom
i pripadajuće stope prijenosa istih u mlijeko

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je u Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu i u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Vahčić i doc. dr. sc. Jelke Pleadin i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2015./2016.

POPIS I OBJAŠNENJE KRATICA

- 15-ADON - 15-acetildeoksinivalenol
- 3-ADON - 3-acetildeoksinivalenol
- AFB1 - aflatoksin B1
- DAS - diacetoksiscripenol
- Deepoksi-DON - deepoksi-deoksinivalenol
- DOM-1 - deoksinivalenol metabolit 1
- DON - deoksinivalenol
- ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* (imunoasorpcijska enzimatska analiza)
- FB1 - fumonizin B1
- NEO - neosolaniol
- NIV - nivalenol
- OPG - obiteljsko poljoprivredno gospodarstvo
- OTA - okratoksin A
- TDI - *eng. Tolerable Daily Intake* (prihvatljivi dnevni unos)
- ZAN - zearalanon
- ZEL - zearalenol
- ZEN - zearalenon
- α -ZEA - α -zearalenol
- β -ZEA - β -zearalenol

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	4
3. TEORIJSKI DIO	6
3.1. MIKOTOKSINI	7
3.1.1. <i>Fusarium</i> mikotoksini i njihova toksičnost	8
3.1.2. Kontaminacija žitarica i stočne hrane <i>Fusarium</i> mikotoksinima	9
3.2. DEOKSONIVALENOL	9
3.2.1. Metabolizam DON-a	10
3.3. ZEARALENON.....	11
3.3.1. Metabolizam ZEN-a	11
3.4. PRODUKCIJA DON-a I ZEN-a NA USJEVIMA	13
3.5. KLINIČKI ZNAČAJ DON-a I ZEN-a ZA LJUDE	16
3.6. KONTROLA I ANALIZA MIKOTOKSINA U HRANI I HRANI ZA ŽIVOTINJE	16
3.6.1. ELISA metoda	17
3.7. LEGISLATIVA I NAJVEĆE DOPUŠTENE RAZINE DON-a I ZEN-a U HRANI I HRANI ZA ŽIVOTINJE	20
3.8. STOPA PRIJENOSA („CARRY-OVER“ EFEKT) MIKOTOKSINA U HRANU ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA	22
3.8.1. Pregled istraživanja stopa prijenosa („carry-over“ efekt) mikotoksina u mlijeko	23
4. MATERIJALI I METODE	24
4.1. MATERIJAL	25
4.2. METODE RADA	25
4.2.1. Validacija ELISA metode korištene u radu	25
4.2.2. Određivanje DON-a ELISA metodom u uzorcima žitarica, stočne hrane i mlijeka	26
4.2.2.1. <i>Određivanje DON-a ELISA metodom u uzorcima</i> <i>žitarica i stočne hrane</i>	27

4.2.2.2. <i>Određivanje ZEN-a ELISA metodom u uzorcima</i> <i>žitarica i stočne hrane</i>	29
4.2.2.3. <i>Određivanje DON-a i ZEN-a ELISA metodom</i> <i>u uzorcima mlijeka</i>	31
4.2.3. Statistička obrada podataka	33
5. REZULTATI	34
5.1. REZULTATI VALIDACIJE ELISA METODE	35
5.2. REZULTATI DOBIVENI ELISA METODOM	37
5.2.1. Količine DON-a u kukuruзу, kupovnoj i domaćoj stočnoj hrani te mlijeku određene ELISA metodom	37
5.2.2. Količine ZEN-a u kukuruзу, kupovnoj i domaćoj stočnoj hrani te mlijeku određene ELISA metodom	40
5.3. REZULTATI STATISTIČKE OBRAD E PODATAKA	43
5.3.1. Rezultati deskriptivne statističke obrade podataka na temelju određenih količina DON-a u uzorcima.....	43
5.3.2. Rezultati deskriptivne statističke obrade podataka na temelju određenih količina ZEN-a u uzorcima.....	45
5.3.3. Rezultati t-testova provedenih na temelju određenih količina DON-a u različitim izvorima stočne hrane i na temelju različitog podrijetla	47
5.3.4. Rezultati t-testova provedenih na temelju određenih količina ZEN-a u različitim izvorima stočne hrane i na temelju različitog podrijetla	48
5.3.5. Stopa prijenosa („carry-over“ efekt) ZEN-a iz hrane za životinje u mlijeko	49
5.3.6. Korelacija između određenih količina ZEN-a u mlijeku i ukupnih količina u hrani za životinje.....	52
6. RASPRAVA	53
6.1. KOLIČINA DON-a U UZORCIMA KUKURUZA, KUPOVNE I DOMAĆE STOČNE HRANE TE MLJEKA	54
6.2. KOLIČINA ZEN-a U UZORCIMA KUKURUZA, KUPOVNE I DOMAĆE STOČNE HRANE TE MLJEKA	57
6.3. ZNAČAJNOST RAZLIKA U ODREĐENIM KOLIČINAMA DON-a I ZEN-a.....	60

6.4. STOPA PRIJENOSA ZEN-a IZ STOČNE HRANE (KUKURUZA TE DOMAĆE I KUPOVNE STOČNE HRANE) U MLIJEKO („CARRY-OVER“ EFEKT)	61
6.5. KORELACIJA IZMEĐU ODREĐENIH KOLIČINA ZEN-a U MLIJEKU I UKUPNIH KOLIČINA U HRANI ZA ŽIVOTINJE	62
7. ZAKLJUČCI	63
8. ZAHVALE	65
9. POPIS LITERATURE	67
10. SAŽETAK	79
11. SUMMARY	81
12. ŽIVOTOPISI AUTORA	83

1. UVOD

Gljive u svom razvojnem ciklusu produciraju primarne metabolite koji su im neopohodni za rast i razvoj, a neke od njih mogu sintetizirati i sekundarne metabolite – mikotoksine. Jedni od najznačajnijih sekundarnih metabolita gljiva su fuzarijski mikotoksini (Kanižai Šarić i sur., 2011). Među njima su najzastupljeniji zearalenon (ZEN), deoksinivalenol (DON), fumonizini i T-2 toksin, koji su česti onečišćivači hrane i hrane za životinje, primarno žitarica i njihovih proizvoda (Hussein i Brasel, 2001), budući da plijesni koje produciraju ove onečišćivače rastu na njima kao patogeni ili saprofiti (Schothorst i van Egmond, 2004).

Kontaminacija usjeva *Fusarium* vrstama može nastati prije žetve (na polju), ali i poslije žetve (u skladištima i silosima). Osim o fazi uzgoja, razina onečišćenja mikotoksinima ovisi i o načinima i uvjetima skladištenja te varira s obzirom na geografsko područje i klimatske uvjete (Glenn, 2007). Čimbenici koji utječu na nastanak plijesni i tvorbu fuzarijskih mikotoksina odnose se na prisutnost plijesni, razinu vlage, temperaturu, aeraciju, prisutnost insekata i mehaničkih oštećenja zrna (CAST, 2003; Sforza i sur., 2006). Istraživanja su pokazala da je problem fuzarijskih mikotoksina posebno izražen tijekom kišovitih godina s izraženim temperaturnim promjenama (Pleadin i sur., 2012a; Pleadin i sur., 2012b).

Onečišćenje hrane fuzarijskim mikotoksinima može uzrokovati brojne kronične i akutne toksične učinke u ljudi i životinja. Istraživanja su pokazala da fuzarijski mikotoksini uzrokuju bolesti mikotoksikoze te da imaju genotoksično, nefrotoksično, citotoksično, estrogeno i teratogeno djelovanje (Binder i sur., 2007). Preživači su u pravilu otporniji na negativne učinke mikotoksina od monogastričnih životinja (npr. svinja), budući da mikroorganizmi u buragu imaju sposobnost njihove razgradnje do manje toksičnih spojeva.

U određenoj mjeri, prisutnost manjih količina fuzarijskih mikotoksina u žitaricama za prehranu ljudi i životinja te srodnim prehrambenim proizvodima je neizbježna te je od velikog značaja za zaštitu javnog zdravlja uspostava smjernica i odredbi zakonodavstva i procjena rizika na nivou svake zemlje (Pleadin i sur., 2015). Razvoj plijesni i sintezu mikotoksina potrebno je prevenirati kroz identificiranje ključnih kritičnih kontrolnih točaka koje uključuju proces proizvodnje, prerade i skladištenja stočne hrane (Kabak i sur., 2006). Ukoliko ipak dođe do značajnijeg onečišćenja, potrebna je primjena učinkovitih metoda redukcije, odnosno dekontaminacije, uz sustavnu kontrolu razine fuzarijskih mikotoksina i primjenu suvremenih analitičkih metoda u njihovoj detekciji (Pleadin i sur., 2015).

Svrha ovog rada je korištenjem ELISA metode odrediti količinu (koncentraciju) fuzarijskih mikotoksina DON-a i ZEN-a u kukuruzu, domaćoj i kupovnoj stočnoj hrani te mlijeku iz tri županije Republike Hrvatske: Varaždinske, Koprivničko-križevačke i Zagrebačke. Nadalje, usporediti te razine s obzirom na podrijetlo hrane za životinje i mlijeka s prihvatljivim

dnevnim unosom (TDI – „*Tolerable Daily Intake*“) prema Europskoj komisiji i najvećim preporučenim količinama mikotoksina u hrani za životinje prema Uredbi Komisije (EZ) o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina u hrani za životinje (Commission Recommendation 2006/576/EC) u neprerađenim žitaricama te izračunati stopu prijenosa („carry-over“ efekt) DON-a i ZEN-a iz hrane za goveda u mlijeko koje proizvode.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći ciljevi ovog rada su:

- 1) ELISA metodom detektirati razinu kontaminacije hrane za životinje (kukuruz, kupovna i domaća stočna hrana) fuzarijskim mikotoksinima DON-om i ZEN-om;
- 2) ELISA metodom detektirati razinu kontaminacije pripadajućih uzoraka mlijeka goveda (koja su hranjena analiziranim uzorcima hrane za životinje) fuzarijskim mikotoksinima DON-om i ZEN-om;
- 3) Utvrditi koja vrsta hrane za životinje predstavlja najveći izvor kontaminacije fuzarijskim mikotoksinima DON-om i ZEN-om u goveda

Specifični ciljevi ovog rada su:

- 1) Na temelju određenih količina fuzarijskih mikotoksina DON-a i ZEN-a u hrani za životinje i pripadajućim uzorcima mlijeka goveda izračunati stopu prijenosa istih u mlijeko

3. TEORIJSKI DIO

3.1. MIKOTOKSINI

Mikotoksini su sekundarni metaboliti gljiva koji u ovisnosti o stupnju izloženosti (Pepeljnjak i sur., 2008) mogu biti štetni za ljude i životinje prilikom njihove ingestije, inhalacije ili kontakta s kožom (Rice i Ross, 1994). Mikotoksini se mogu pojaviti u hranidbenom lancu zbog gljivične infekcije usjeva, bilo da se konzumiraju izravno od strane ljudi ili se koriste kao stočna hrana. Metabolizam oralno unesenih mikotoksina može rezultirati kumulacijom mikotoksina u različitim organima ili tkivima, a oni i njihovi metaboliti ulaze u hranidbeni lanac preko mesa, mlijeka ili jaja (Marin i sur., 2013), tzv. „carry-over“ efektom. Ostale namirnice kao što su orasi, začini, voće i njihovi proizvodi, također mogu biti kontaminirane mikotoksinima. Ipak, najbitnije u prijenosu mikotoksina su žitarice, jer ih konzumiraju i ljudi i životinje (Pittet, 1998). Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) Ujedinjenih Naroda (UN) procjenjuje da je približno 25% žitarica diljem svijeta kontaminirano mikotoksinima (Rice i Ross, 1994).

Najčešći način izloženosti mikotoksinima je putem oralnog unosa kontaminirane hrane ili hrane za životinje (Dvorackova, 1976). Osim toga, mogu uzrokovati velike materijalne gubitke i nanositi štetu poljoprivrednim proizvodima (Shane, 1994; Vasanthi i Bhat, 1998). Proizvodnja mikotoksina u poljoprivrednim kulturama može se pojaviti u hranidbenom lancu u različitim fazama: prije žetve, tijekom berbe i sušenja te tijekom skladištenja. Neprikladna poljoprivredna i žetvena praksa, nepravilno sušenje, rukovanje, pakiranje, skladištenje ili transport žitarica promiču gljivični rast, povećavajući pritom rizik od proizvodnje mikotoksina. Do naknadne produkcije mikotoksina uglavnom ne dolazi nakon što je hrana procesirana, ukoliko se skladišti u uvjetima koji sprječavaju gljivičnu kontaminaciju i bioproizvodnju mikotoksina (Marin i sur., 2013).

Mikotoksini su, dakle, proizvodi različitih gljivica, primarno *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* i *Claviceps* roda. Najvažniji mikotoksini pronađeni u hrani su proizvodi sljedećih pet gljivičnih rodova: aflatoksini, koje proizvode *Aspergillus* vrste; okratoksin A (OTA), produkt *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta; trihoteceni (tip A: HT-2 i T-2 toksin i tip B: DON, ZEN, fumonizini B1 i B2 te relativno novi mikotoksini (fuzaproliferin, moniliformin, beauvericin i eniatin)) proizvedeni uglavnom od *Fusarium* vrsta; ergot alkaloidi koje proizvodi *Claviceps* te altenuen, alternariol, alternariol metil eter, alvertoksin i tenuazonična kiselina koje proizvode *Alternaria* vrste (Barkai-Golan, 2008). Najopasnije plijesni pripadaju vrstama *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Obje pripadaju u skladišne plijesni i mogu se

pronaći u žitaricama i proizvodima od uljarica u toplim i vlažnim područjima (Smith i sur., 1997).

3.1.1. *Fusarium* mikotoksini i njihova toksičnost

Poznato je da su mikotoksini *Fusarium* vrsta među najčešćima koji se javljaju u žitaricama koje rastu u područjima umjerene klime. *Fusarium* vrste sintetiziraju široki spektar mikotoksina raznolike strukture i kemijskih svojstava (Flannigan, 1991). Najvažniji, koji utječu na zdravlje i produktivnost životinja, su trihoteceni - ZEN, moniliformin i fumonizini (D'Mello i sur., 1997).

Trihoteceni su podijeljeni u četiri osnovne skupine, gdje A i B predstavljaju najvažnije članove. U trihotecene tipa A spadaju T-2 toksin, HT-2 toksin, neosolaniol (NEO) i diacetoksiscirpenol (DAS), a u tip B trihotecena spadaju DON i njegovi derivati: 3-acetil-deoksinivalenol (3-ADON) i 15-acetil-deoksinivalenol (15-ADON), nivalenol (NIV) i fuzarenon-X.

Zajednička značajka mnogih *Fusarium* vrsta je njihova sposobnost sinteze ZEN-a, a njegova aditivnost i sinergizam s drugim trihotecenima ima važnu ulogu u etiologiji mikotoksikoza u životinja. Kao i kod drugih bioaktivnih spojeva, *Fusarium* mikotoksini mogu uzrokovati akutne i kronične simptome toksičnosti. U životinja su odbijanje hrane, reproduktivni poremećaji te imunosupresija najčešće posljedice kroničnog unosa mikotoksina, što uzrokuje velike gubitke u animalnoj proizvodnji (Pepeljnjak i sur., 2008).

Među trihotecenima, članovi tipa A su otrovniji od onih tipa B. Zanimanje za *Fusarium* mikotoksine i njihove učinke na domaće životinje je neprestano prisutno diljem svijeta, ponajviše zbog simptoma koji se javljaju uslijed kronične izloženosti. Osim toga, nedavno povezivanje fumonizina B1 (FB1) s kancerogenim učinkom u ljudi povećava opću zabrinutost, jer postoji mogućnost prijenosa fuzarijskih mikotoksina iz životinjskog tkiva u mlijeko, jaja i meso.

Studije na svinjama ukazuju da je DON značajan inhibitor unosa hrane i rasta, a budući da uzrokuje smanjenje unosa hrane i djeluje kao emetik, alternativno se naziva vomitoksinom. S druge strane, preživači su znatno tolerantniji na DON, budući da u tolikoj mjeri ne utječe na unos hrane i proizvodnju mlijeka u mliječnim krava (Charmley i sur., 1993).

Akutni testovi pokazuju da ZEN ima relativno nisku toksičnost u laboratorijskih miševa (Flannigan, 1991), dok istraživanja kronične izloženosti pokazuju da njegovo estrogeno svojstvo ima značajan učinak na sisavce već pri razinama od 1,5-3 mg/kg hrane (Prelusky i sur., 1994). To svojstvo očituje se u vezanju za estrogene receptore, uzrokujući hormonsku neravnotežu, što

dovodi do hipersetrogenizma, prolapsusa vagine i rektuma, resorpcije fetusa i pobačaja (Kosalec i Pepeljnjak, 2004). U krava su neplodnost, smanjena proizvodnja mlijeka i hiperestrogenizam povezane sa ZEN-om ili *Fusarium* vrstama koje ga proizvode. Hranjenje kukuruzom kontaminiranim *F. moniliforme* često se povezuje s indukcijom leukoencefalomalacije i akutne neurotoksičnosti u kopitara i sa sindromom plućnog edema u svinja (Prelusky i sur., 1994). Osim toga, izloženost velikim dozama ZEN-a u hrani dovodi se u vezu s preuranjenim pubertetom u ljudi (Peraica i Domijan, 2001).

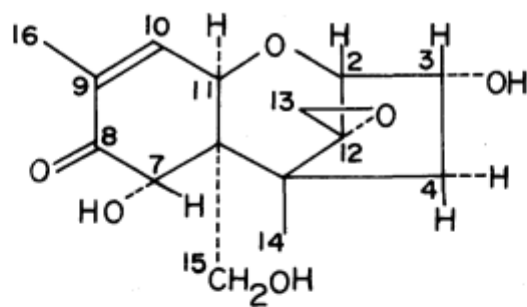
Zajedničko pojavljivanje *Fusarium* mikotoksina u žitaricama i stočnoj hrani se nerijetko javlja te se stoga postavlja pitanje njihovih interakcija u manifestaciji toksičnosti. Primjerice, iako su male razine otkrivene u prirodi, fuzarična kiselina može povećati aktivnost drugih *Fusarium* mikotoksina. Harvey i sur. (1996) dokazali su da pojedinačno djelovanje DON-a i FB1 izaziva ograničeno smanjenje prirasta svinja, a sinergistički učinak tih dvaju mikotoksina značajno utječe na smanjenje rasta. Veći praktični značaj ima zajednička pojava različitih *Fusarium* mikotoksina s aflatoksinom B1 (AFB1), a toksične interakcije između aflatoksina i fumonizina još je potrebno razjasniti (Placinta i sur., 1999).

3.1.2. Kontaminacija žitarica i stočne hrane *Fusarium* mikotoksinima

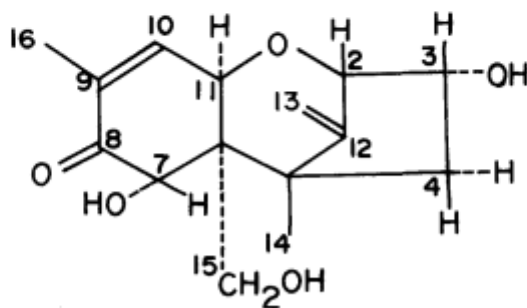
Zrnje žitarica i proizvodi od njih predstavljaju važan izvor energije i proteina za sve vrste stoke i ostalih životinja na farmama (D'Mello i sur, 1997). Žitarice se mogu kontaminirati mikotoksinima tijekom rasta plijesni na biljci u polju ili u skladištu. Onečišćenje biljaka i proizvodnja mikotoksina izrazito ovise o uvjetima okoliša (Adams i sur., 1993). Prije svega, to su zdravlje biljke prije košnje, meteorološki uvjeti, način košnje i iskorištavanja biljke, zastoji u procesu proizvodnje i hidrotermalni uvjeti (Ožegović i Pepeljnjak, 1995).

3.2. DEOKSINIVALENOL

DON pripada tipu B trihotecenskih mikotoksina, a prvi put je izoliran 1972. godine iz oštećenog zrna ječma. Glavni producenti ovog mikotoksina su plijesni *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, a javlja se češće kod žitarica kao što su kukuruz, pšenica i ječam, nego li kod zobi, raži i riže (Doohan i sur., 2003). Može biti prisutan i u proizvodima životinjskog podrijetla, kao što su meso i mlijeko (Cavret i Lecouer, 2006). Optimalna temperatura rasta plijesni koje produciraju DON je od 25° C do 28° C, uz aktivitet vode od 0,97 (Whitlow i sur., 2006). Na Slici 1 prikazana je kemijska struktura DON-a i njegovog metabolita DOM-1.



DON



DOM-1

Slika 1. Kemijska struktura DON-a i njegovog metabolita DOM-1 (Yoshizawa i sur., 1983)

Unos DON-a putem kontaminirane hrane za životinje uzrokuje anorektičke i imunomodulatorne promjene koje su najizraženije u svinja. Na primjer, procijenjeno je srednje smanjenje dobrovoljnog unosa hrane od 5% prilikom povećanja koncentracije DON-a u prehrani od 1 mg (Döll i Dänicke, 2011; Dänicke i Brezina, 2013).

Tablica 1 prikazuje pregled istraživanja kontaminacije žitarica i krmiva DON-om u Hrvatskoj, u razdoblju od 1999. do 2012. godine.

3.2.1. Metabolizam DON-a

U buragu preživača DON se metabolizira u mikrobn metaboliziranu deepoksidiziranu formu - de-epoksi-DON, tj. DOM-1 (DON metabolit 1) (Slika 2) ili jednostavno de-DON i

njihove konjugirane oblike kao rezultat metabolizma faze II (Danicke i Brezina, 2013). DOM-1 je znatno manje toksičan od izvornog oblika (Whitlow i sur., 2006). U usporedbi s drugim trihotecenima DON se smatra jednim od manje toksičnih (Whitlow i sur., 2006).

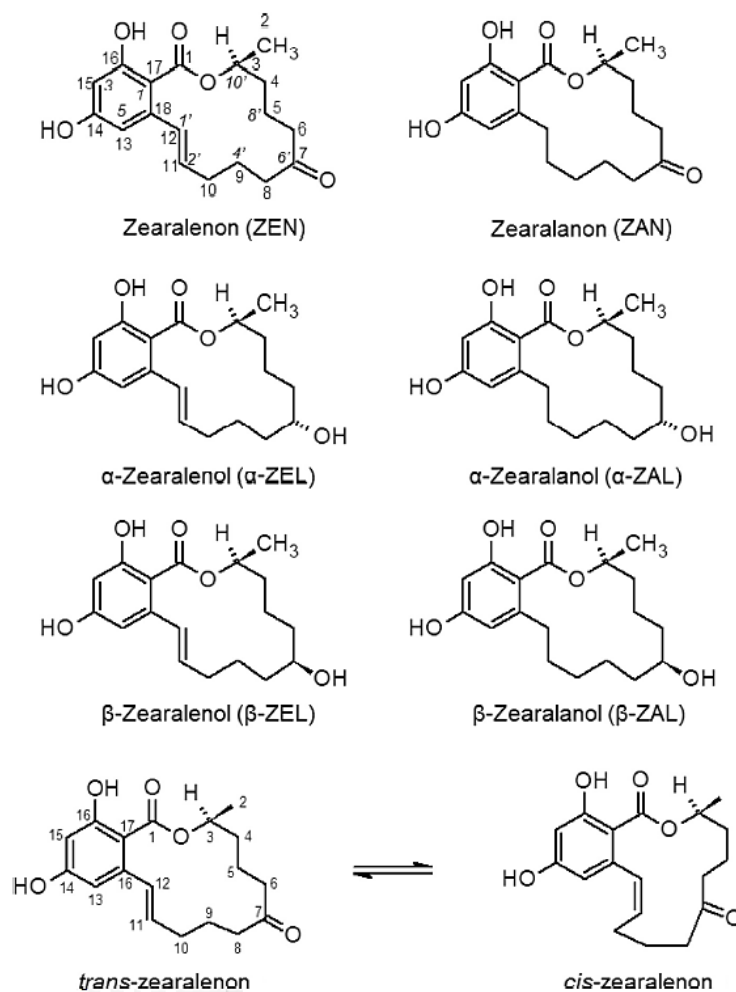
3.3. ZEARALENON

ZEN, kemijskog naziva 3,4,5,6,9,10-heksahidro-14,16-dihidroksi-3-metil-1 H-2 benzoksiciklotetradecin-1,7 (8H)-dion, je nesteroidni mikotoksin, metabolit različitih vrsta iz roda *Fusarium*, uključujući: *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* i *F. moniliforme* (Chelkowski, 1998). Kemijsku strukturu (Slika 2) ZEN-a utvrdili su Urry i sur. (1966). ZEN se ponajviše nalazi u žitaricama, posebice u kukuružu, ječmu, zobi, pšenici, riži, sirku te u njihovim proizvodima (Kuiper-Goodman i sur., 1987). U prirodi se ovaj mikotoksin najčešće nalazi u zrnju kukuruza s visokim sadržajem vode, onečišćenim ponajprije s *Fusarium roseum* u kasnu jesen i zimu. Ipak, one vrste koje su sposobne proizvoditi ZEN mogu preživjeti i u umjerenim temperaturama i tropskim područjima (Alldrick i Hajšelová, 2004).

3.3.1. Metabolizam ZEN-a

ZEN, a vjerojatno i male količine njegovih metabolita, oralno unesene s kontaminiranom hranom mogu proći kroz strukturne promjene prije apsorpcije (ingestivna razina), na apsorpcijskoj razini (sluznice, mukoze) i nakon apsorpcije (metabolička razina). Preapsorpcijske modifikacije posredovane gastrointestinalnim mikrobima rezultiraju uglavnom redukcijom metabolita ZEN-a. Redukcija ZEN-a odvija se na razini apsorpcije i nakon apsorpcije. Daljnje izmjene rezultiraju oksidativnim i konjugiranim oblicima njegovih metabolita (Danicke i Winkler, 2015). Prema Olsen i sur. (1981), dva glavna biotransformacijska puta ZEN-a u životinja su: hidroksilacija koja rezultira formiranjem α -zearalenola (α -ZEA) i β -zearalenola (β -ZEA), katalizirana 3α - i 3β -hidroksisteroid dehidrogenazom te konjugacija ZEN-a i njegovih reduciranih metabolita s glukuronskom kiselinom, koju katalizira uridindifosfat glukuronil transferaza. Mehanizam djelovanja ZEN-a i njegovih metabolita temelji se na strukturnoj sličnosti estrogenu. Primjerice, zearalenol (ZEL) je strukturni analog estrogena, odnosno djeluje kao β -estradiol (Hagler i sur., 1979). ZEN i njegovi metaboliti se ponašaju kao umjetni estrogen-agonisti konkurentni za vezanje na receptor (Miksicek, 1994) te se vežu na te receptore manje učinkovito od estradiola. Također, postoje razlike u učinkovitosti vezanja između ZEN-a

i njegovih metabolita (Alldrick i Hajšelová, 2004). Na Slici 2 prikazane su kemijske strukture ZEN-a i nekih njegovih metabolita.



Slika 2. Kemijska struktura ZEN-a i nekih njegovih metabolita
(prilagođeno iz Dänicke i Winkler, 2015)

Nakon oralnog unosa, ZEN se brzo apsorbira. Glavni organ metabolizma ZEN-a je jetra, gdje se prevodi u dva različita izomera - ZEL (α i β) i ZAN (zearalanon) (Alldrick i Hajšelová, 2004). Koncentracija ZEN-a se smanjuje u jetri i ovisno o životinjskoj vrsti razlikuje se mjesto biotransformacije ovog spoja u organizmu (Hagler i sur., 1979; Ožegović i Pepeljnjak, 1995). Ipak, većina (>90%) mikotoksina se izluči iz organizma životinje (Alldrick i Hajšelová, 2004).

3.4. PRODUKCIJA DON-a I ZEN-a NA USJEVIMA

Glavni mehanizmi infekcije *Fusarium* spp. uključuju raspršivanje infektivne tvari iz tla kišom tijekom dozrijevanja (kod pšenice i ječma) ili svilanja (kod kukuruza), kao i prijenos onečišćenog materijala vjetrom. Fizičko oštećenje kukuruznih usjeva posredovano pticama ili kukcima također pospješuje gljivične infekcije (Sutton i sur., 1980).

Iako se smatra da su DON i ZEN "poljski" mikotoksini, moguće je da nastanu u već ubranim žitaricama. To je osobito slučaj u zemljama u kojima se bere mokro zrno, a sušenje je vremenski razdvojeno. Orsi i sur. (2000) izvijestili su da visok broj *Fusarium* spp. preživljava u kukuruza i nakon pet mjeseci skladištenja. Skladištenje pri visokoj vlažnosti smatra se značajanim rizikom za razvoj plijesni kod kukuruza (Christensen i sur., 1992). U slučajevima kad je klip kukuruza pohranjen na dulje vrijeme (npr. ako se koristi za stočnu hranu), incidencija bolesti povezanih s intoksikacijama fuzarijskim mikotoksinima je više vjerojatna zbog nepravilnog skladištenja, nego zbog njegovog razvoja prije žetve (Wilson i Abramson, 1992).

Tablica 2 prikazuje 30-godišnji pregled istraživanja kontaminacije žitarica i krmiva ZEN-om u Hrvatskoj. U vlažnim godinama, odnosno za vrijeme produljenih zima i temperaturnih oscilacija utvrđeni su znatno veći udjeli ovog mikotoksina. Tako je tijekom izuzetno vlažne 1978. najveća razina iznosila 275000,8 µg/kg ZEN-a, dok je u izrazito hladnoj i vlažnoj 2004. ZEN dokazan u količini od 29000,43 µg/kg. Inače su *Fusarium* i *Penicillium* vrste učestalije u umjerenom klimatskom području. Optimalni uvjeti rasta i tvorbe mikotoksina kod ovih plijesni su temperatura veća od 20 °C i aktivitet vode 0,87 (Pitt i sur., 2000). Osim toga, veće koncentracije su zabilježene i za vrijeme Domovinskog rata (19000,9 µg ZEN/kg). Tijekom ostalih godina koncentracije ZEN-a kretale su se od 0,39 do 3000 µg/kg (Pepeljnjak i sur., 2008).

Tablica 1. Pregled nalaza DON-a u kukuruzu, žitaricama i krmivu na području Hrvatske

Godina	Uzorak (N=broj uzoraka)	Učestalost / raspon količine DON-a ili srednja vrijednost koncentracije DON-a (µg/kg)	Referenca
1999	kukuruz (N=28)	64% / 150-2000	Mitak i sur., 2002
2001	žitarice (N=2)	NP*	Sokolović i Šimpraga (2006)
2001	krmivo (N=5)	NP	Sokolović i Šimpraga (2006)
2002	krmivo (N=7)	NP	Sokolović i Šimpraga (2006)
2003	žitarice (N=7)	14% / 100	Sokolović i Šimpraga (2006)
2003	krmivo (N=6)	33% / 50-630	Sokolović i Šimpraga (2006)
2004	žitarice (N=5)	60% / 1500-3440	Sokolović i Šimpraga (2006)
2004	krmivo (N=21)	71% / 100-1050	Sokolović i Šimpraga (2006)
2010	kukuruz (N=40)	85% / 15-17920	Pleadin i sur., 2012b
2011	kukuruz (N=63)	71% / 215-2942	Pleadin i sur., 2013
2011	kukuruz (N=181)	27% / 55-500	HAH, 2012
2011	krmivo (N=29)	7% / 1140	Pleadin i sur., 2012c
2012	kukuruz (NP*)	NP* / 3560	Srećec i sur., 2013

*NP - nije poznato (nije navedeno u literaturi)

Tablica 2. Pregled nalaza ZEN-a u kukuruzu žitaricama i krmivu na području Hrvatske
(prilagođeno iz Pepeljnjak i sur., 2008 i Pleadin i sur., 2013)

Godina	Uzorak (N=broj uzoraka)	Učestalost / raspon količine ZEN-a (µg/kg)	Referenca
1975/76	kukuruz (N=191)	2,6% / 43-10000	Balzer i sur. (1977)
1976/77	žitarice (272)	6,0% / 51-4200	Pepeljnjak i Čturić (1978)
1977	kukuruz (N=267)	16% / 100-4000	Pepeljnjak i sur. (1979)
1978/79	žitarice (N=116)	46,5% / 10-275800	Pepeljnjak i Balzer (1982)
1984/85	žitarice (N=46)	15,2% / 560-3000	Pepeljnjak i Cvetnić (1986)
1984/85	krmivo (N=32)	25% / 100-1200	Pepeljnjak i Cvetnić (1986)
1985	krmivo (N=369)	29% / 100-6880	Nemanić i sur. (1986)
1988- 1997	krmivo (N=156); kukuruz (N=378)	10% / 150-1200	Pepeljnjak i sur. (1999)
1990- 1999	krmivo (N=156)	21,9% / 50-1200	Mitak i sur. (2001)
1991	žitarice (N=111)	43,2% / 1-19900	Pepeljnjak i sur. (1992)
1992- 1995	žitarice (N=234)	10% / 23-10700	Pepeljnjak i sur. (1999)

1998-2001	kukuruz (N=136)	10% / 200-2700	Pepeljnjak i sur. (2002)
2002/03	kukuruz (N=49)	83% / 0,43-39	Domijan i sur. (2005)
2004/05	Kukuruz	26% / 6030-29430	Šegvić Klarić i sur. (2007)
2006/07	Žitarice	91% / 27,7-1182	Pepeljnjak i sur. (2008)
2006/07	Krmivo	100% / 49,7-1168	Pepeljnjak i sur. (2008)
2011	kukuruz (N=63)	78% / 10-611	Pleadin i sur. (2013)
2011	pšenica (N=51)	69% / 7-107	Pleadin i sur. (2013)
2011	ječam (N=34)	9% / 5-68	Pleadin i sur. (2013)
2011	zob (N=34)	6% / 4-43	Pleadin i sur. (2013)

U Tablici 3 nalazi se prikaz rezultata studija različitih zemalja o učestalosti i koncentraciji fuzarijskih mikotoksina DON-a i ZEN-a u zrnu kukuruza.

Tablica 3. Prikaz određenih količina DON-a i ZEN-a u kukuruzu ($\mu\text{g}/\text{kg}$) u različitim državama

Država	određena količina DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Izmjerena količina ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Referenca
Poljska	4000-320000 9000-927000	-	Grabarkiewicz-Szczesna i sur. (1996)
Južna Afrika	>1830	-	Rheeder i sur. (1995)
Filipini	-	59-505	Yamashita i sur. (1995)
Tajland	-	923	Yamashita i sur. (1995)
Koreja	145*	-	Ryu i sur. (1996)
Kina	490-3100 78,9*	-	Wang i sur. (1995) Han i sur. (2014)
Novi Zeland (1993.) (1992.)	<3400 <8500	<2700 <10500	Lauren i sur. (1996)
Kanada	20-4090	-	Scott (1997)
Hrvatska	1565*	187*	Pleadin i sur. (2013)

*srednja vrijednost uzoraka

3.5. KLINIČKI ZNAČAJ DON-a I ZEN-a ZA LJUDE

DON u ljudi uzrokuje akutnu mučninu, povraćanje, proljev, bol u trbuhu, glavobolju, vrtoglavicu i groznicu. DON je poznat kao inhibitor sinteze proteina, što za posljedicu ima povećanje koncentracije aminokiseline triptofana i sinteze serotonina. Smatra se da je povećana koncentracija serotonina uzrok smanjenom unosu hrane.

Smatra se da je ZEN odgovoran za preuranjeni pubertet u djece te da ima učinak na reproduktivni sustav žena, a iako nema epidemioloških studija koje ukazuju na karcinogenost ZEN-a za ljude, smatra se da bi ovaj mikotoksin mogao imati učinka u razvoju karcinoma dojke u žena (Pepeljnjak i sur., 2008).

Znanstveno povjerenstvo za hranu (Scientific Committee on Food) Europske komisije je 2002. godine uspostavilo TDI vrijednost za DON, koja iznosi 1 µg/kg tjelesne mase (EC, 2002), a EFSA-in panel za kontaminante u prehrambenom lancu (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) je uspostavio TDI vrijednost za ZEN, koja iznosi 0,25 µg/kg tjelesne mase čovjeka (EFSA, 2011). EFSA-ino znanstveno povjerenstvo (EFSA Scientific Committee) je 2012. godine izdalo smjernice za odabrane zadane vrijednosti parametara koje koriste Znanstveno povjerenstvo i EFSA-ini znanstveni paneli u svojim istraživanjima, a prema kojima prosječna tjelesna masa odraslog stanovnika EU iznosi 70 kg (EFSA, 2012).

3.6. KONTROLA I ANALIZA MIKOTOKSINA U HRANI I HRANI ZA ŽIVOTINJE

Izbor analitičkog postupka ovisi o mnogo različitih čimbenika, a osnovni zahtjevi za bilo koju metodu su selektivnost, točnost, preciznost i ponovljivost (Runje i Cvrtila, 2006). Među najvažnijim čimbenicima su vrsta uzorka (fizikalna i kemijska svojstva) te priroda informacija koje se traže kao rezultat analize. U analitici mikotoksina razlikujemo „screening” metode i potvrđne službeno verificirane i propisane metode. “Screening” metode su tzv. „grube metode” koje ne omogućavaju definitivan rezultat, nego samo osiguravaju indicaciju da je analit ili više njih prisutan u uzorku iznad određene razine. Od dobrog “screening” testa očekuje se da neće davati lažno negativne rezultate.

Komercijalne imunološke tehnike za analizu mikotoksina temelje se na specifičnim monoklonskim i poliklonskim antitijelima proizvedenima od toksina, a podijeljene su uglavnom na imunoafinitetne (IAC) analize temeljene na kolonama i imunoasorpcijske enzimatske analize (ELISA - engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Patel, 2004). ELISA metoda je vrlo

zastupljena u analizama mikotoksina, a potom kromatografske i imunološke metode (Runje i Cvrtila, 2006).

Temelj kromatografskih metoda je odjeljivljanje i određivanje sastojaka smjese na temelju različitosti njihove raspodjele između dviju faza, stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze (Sforza i sur., 2006; Köppen i sur., 2010). Klasične analitičke metode za identifikaciju mikotoksina su tankoslojna kromatografija (TLC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC) i masena spektrometrija (MS).

3.6.1. ELISA metoda

Od orijentacijskih metoda najznačajnija je ELISA kao imunološka metoda razvijena šezdesetih godina 20. stoljeća na osnovu zapažanja da se antitijelo, kao i analit (antigen), može vezati na krutu površinu i doprinositi specifičnom jakom afinitetu vezivanja (Deshpande, 1996).

ELISA metoda je vrlo osjetljiva, daje brze i pouzdane rezultate, a zahtijeva utrošak malih količina antigena i protutijela. Pri izvođenju takvih reakcija treba imati na umu da se u uzorku nalaze tvari koje daju “lažno negativnu” ili “lažno pozitivnu” reakciju. Iz tog je razloga u istraživanje uvijek potrebno uključiti kontrolne uzorke koji daju sigurno pozitivnu (pozitivna kontrola) i sigurno negativnu (negativna kontrola) reakciju. Uvođenju ELISA-e u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske ploče četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica. U testu su antigen ili protutijela označeni nekim enzimom, najčešće peroksidazom. Reakcija se očitava prema promjeni boje supstrata što ga enzim razgrađuje, a mjerenje apsorbancije provodi se spektrofotometrijski. Kao i ostale slične reakcije, ELISA se može provoditi na nekoliko načina (Runje i Cvrtila, 2006).

ELISA testovi se obično temelje na konkurentnim testovima koji koriste konjugate enzimski vezanih mikotoksina ili primarna protutijela specifično za toksin analita (Patel, 2004). ELISA tehnika se koristi u obliku raznih komercijalnih ELISA set kitova. Svaki set kitova u osnovi sadrži: čvrstu površinu (mikrotitracijska ploča), antigen ili antitijelo vezano za čvrstu površinu (dno mikrotitracijske ploče obloženo protutijelima/antigenom), standarde, tj. uzorke pozitivne i negativne kontrole, enzimski konjugat, supstrat/kromogen, pufer za ispiranje te stopotopinu za zaustavljanje enzimske reakcije (Đurišić i sur., 2003).

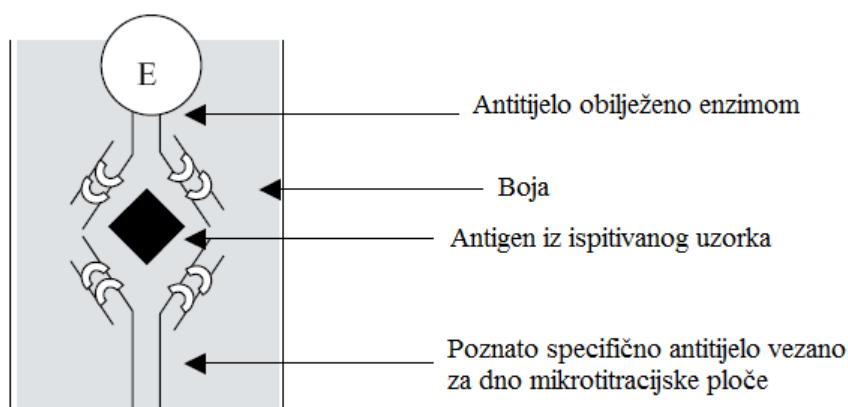
U osnovi se ELISA tehnika sastoji od dvije reakcije: imunološke i kemijske. Imunološku reakciju predstavlja reakcija antigena i antitijela i ona je nevidljiva, a reakcija enzima i supstrata

predstavlja kemijsku reakciju, pri čemu se bezbojni supstrat oboji i reakciju učini vidljivom (Engvall i Perlman, 1971).

Prema Đurišić i sur. (2003), ELISA metoda se po načinu izvođenja dijeli na direktnu („sendvič“) tehniku koja dva puta koristi antitijelo, kompetitivnu ili blokirajuću ELISA tehniku te inhibicijsku ELISA tehniku.

1) Direktna ili „sendvič“ ELISA tehnika

Kod ovog oblika ELISA tehnike, poznato specifično antitijelo vezano je za dno mikrotitracijske ploče. Za njega se vezuje antigen iz materijala koji se ispituje, ukoliko je prisutan. Poslije ispiranja dodaje se konjugat kojega čine antitijela, specifična za ispitivani antigen, vezana enzimom. Ova antitijela se vežu za antigen, ukoliko se u prethodnoj fazi vezao za ploču i nije ispran. Enzim tada stupa u reakciju sa supstratom i pojavljuje se obojenje koje označava pozitivan test, a intenzitet boje je proporcionalan količini prisutnog antigena u materijalu koji se ispituje (Đurišić i sur., 2003). Na Slici 3 shematski je prikazana direktna ELISA metoda.

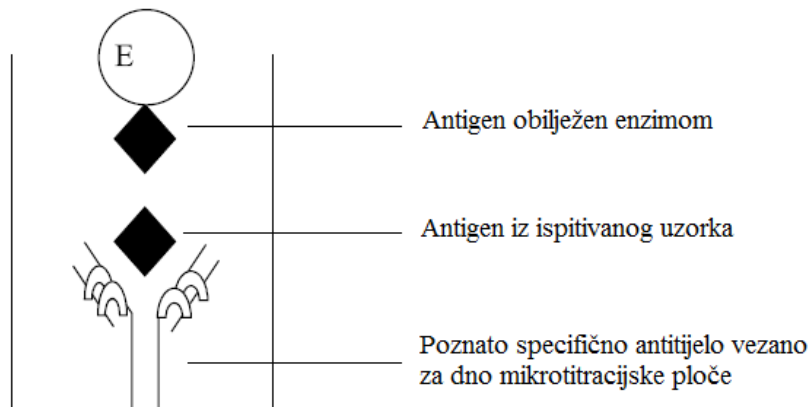


Slika 3. Shematski prikaz direktne („sendvič“) ELISA metode
(preuzeto i prilagođeno iz Đurišić i sur., 2003)

2) Kompetitivna ili blokirajuća ELISA tehnika

Poznato specifično antitijelo vezano je na dno mikrotitracijske ploče. U jažice ploče se dodaje materijal koji se ispituje, a zatim konjugat kojeg čini poznati antigen spojen sa enzimom. Provodi se kompeticija između antigena iz materijala koji se ispituje i antigena sa enzimom za specifično antitijelo vezano u mikrotitracijsku ploču. Prednost ima antigen iz materijala koji se ispituje, ukoliko ga ima, budući da je prvi dodan. Vezanje antigena iz materijala onemogućava

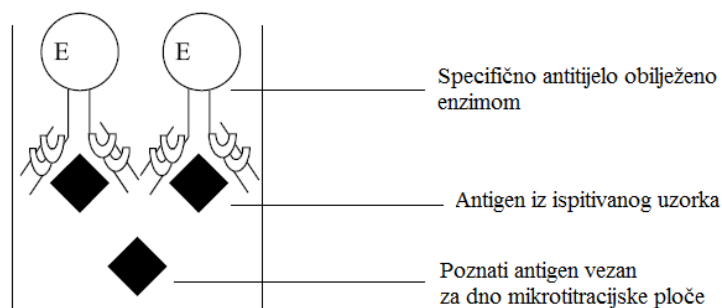
vezanje antigena „obloženog“ enzimom koji će se ispiranjem ukloniti (Slika 4). Ispiranjem konjugata, odnosno antigena „obloženog“ enzimom, supstrat će ostati nepromijenjen, odnosno bezbojan, stoga je ovdje intenzitet nastale boje obrnuto proporcionalan koncentraciji analita - što je intenzivnija boja, to je niža koncentracija mikotoksina u uzorku (Đurišić i sur., 2003). Na Slici 4 shematski je prikazana kompetitivna ELISA metoda.



Slika 4. Shematski prikaz kompetitivne ELISA metode
(preuzeto i prilagođeno iz Đurišić i sur., 2003)

3) Inhibicijska ELISA tehnika

Poznati antigen je vezan za dno mikrotitracijske ploče. Prilikom izvođenja reakcije prvo se dodaje materijal koji se ispituje, a zatim konjugat kojega čine specifična antitijela spojena sa enzimom. Ova antitijela „obložena“ enzimom se prije vezuju s antigenom iz materijala koji se ispituje, ukoliko ga ima, jer s njim dolaze u kontakt prije nego s antigenom vezanim u jažici mikrotitracijske ploče (Đurišić i sur., 2003). Na Slici 5 shematski je prikazana inhibicijska ELISA metoda.



Slika 5. Shematski prikaz inhibicijske ELISA metode
(preuzeto i prilagođeno iz Đurišić i sur., 2003)

U ovom radu korištena je analitička metoda ELISA (kompetitivna ELISA tehnika), a analizirani su mikotoksini DON i ZEN u uzorcima hrane za životinje i mlijeka.

3.7. LEGISLATIVA I NAJVEĆE DOPUŠTENE KOLIČINE DON-a I ZEN-a U HRANI ZA ŽIVOTINJE

U Tablici 4 nalazi se pregled najvećih dopuštenih količina DON-a i ZEN-a u neprerađenim žitaricama koje se koriste kao hrana (prema Uredbi Komisije (EZ) o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani 1881/2006) te najvećih preporučenih količina ovih mikotoksina u žitaricama koje se koriste kao hrana za životinje (prema Commission Recommendation 2006/576/EC).

U Tablici 5 nalazi se pregled najvećih dopuštenih količina DON-a i ZEN-a u gotovim krmnim smjesama namijenjenima kao hrani za životinje (Commission Recommendation 2006/576/EC).

Tablica 4. Najveće dopuštene i najveće preporučene količine DON-a i ZEN-a u neprerađenim žitaricama namijenjenima za hranu i hranu za životinje

Mikotoksin	Žitarica ^a	Najveća dopuštena količina za hranu (µg/kg)	Najveća preporučena količina za hranu za životinje (µg/kg)
DON	Kukuruz	1750 ^b	12000 ^c
	Pšenica i zob	1750 ^b	8000 ^c
	Ječam	1250 ^b	
ZEN	Kukuruz	200 ^b	3000 ^c
	Pšenica, ječam, zob	100 ^b	2000 ^c

^a neprerađene žitarice; ^b Uredba Komisije (EZ) o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani 1881/2006; ^c Commission Recommendation 2006

Tablica 5. Najveće preporučene količine DON-a i ZEN-a u gotovim krmnim smjesama namijenjenima za ishranu mliječnih krava i teladi (<4 mjeseca)

Mikotoksin	Najveća preporučena količina u gotovim krmnim smjesama (µg/kg)
DON	2000 ^c
ZEN	500 ^c

^anepreporučene žitarice; ^b Uredba Komisije (EZ) o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani 1881/2006; ^c Commission Recommendation 2006/576/EC

3.8. STOPA PRIJENOSA („CARRY-OVER“ EFEKT) MIKOTOKSINA U HRANU ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA

Izraz "carry-over" efekt (faktor prijenosa, faktor biokoncentracije) označava prijenos mikotoksina iz stočne hrane u jestiva životinjska tkiva životinja hranjenih tom hranom. Služi procjeni rizika za potrošača, koji proizlazi iz hrane za životinje kontaminirane mikotoksinima koji mogu prijeći u životinjske proizvode. „Carry-over“ mikotoksina je definiran kao omjer njegove koncentracije u hrani i u hrani za životinje, gdje se stopa prijenosa mikotoksina odnosi na njegovu razinu u određenoj količini hrane životinjskog porijekla (npr. prinos mlijeka po jedinici vremena pomnožen s razinom mikotoksina u mlijeku) za unos mikotoksina po životinji (Dänicke i Brezina, 2013). No, treba uzeti u obzir da izvještaji o prijenosu ne moraju uvijek uzimati u obzir prijenos svih metabolita mikotoksina. U idealnom slučaju, određivanje bi bilo najprikladnije pod stacionarnim uvjetima koji pretpostavljaju da je unos određenog mikotoksina jednak njegovom izlučivanju. Ovi uvjeti često nisu ispunjeni, uglavnom zbog povećanja tijela tijekom rasta ili zbog određenih fizioloških stanja (npr. trudnoće, dojenja itd.) (Fries, 1996).

U mliječnih krava, u mlijeku je određen uglavnom deepoksi-deoksinivalenol (deepoksi-DON) (Keese i sur., 2009). Zaključeno je da je kod zdravih krava DON otkriven u krvi i mlijeku uglavnom kao deepoksi-DON, a profil metabolita nije pod utjecajem količine unesene hrane. Apsolutna razina prijenosa značajno se povećava s prinosom mlijeka (Seeling i sur., 2006). Hipoteza da postoji pasivna propusnost, ovisna o koncentraciji DON-a i deepoksi-DON-a iz krvi u alveolarne stanice mliječnih žlijezda, može biti eventualno objašnjenje za činjenicu da je stopa prijenosa u mlijeko veća s povećanjem prinosa mlijeka (Dänicke i Brezina, 2013).

3.8.1. Pregled istraživanja stope prijenosa („carry-over“ efekta) mikotoksina u mlijeko

U Tablici 6 dan je pregled ranijih istraživanja stopa prijenosa DON-a i ZEN-a u mlijeko (uz pripadajuće reference).

Tablica 6. Stope prijenosa DON-a i ZEN-a u kravlje mlijeko (prilagođeno i dopunjeno iz Coffey i sur., 2009)

Mikotoksin	„Carry over“ efekt (%)	Referenca
DON	0,22	Galtier (1998)
	0,01-0,02	Seeling i sur. (2006)
ZEN	0,00625	Galtier (1998)
	0,008	Yiannikouris and Jouany (2002)
	0,016	Yiannikouris and Jouany (2002)
	1,924	Galtier (1998)
	0,05	Mirocha i sur. (1981)

Temeljem literaturnih navoda o prijenosu ZEN-a u mlijeko, utvrđeno je da hrana životinjskog podrijetla ne predstavlja značajan rizik za potrošača (Dänicke i Winkler, 2015).

Slično je s DON-om, za kojega se procjenjuje da je stopa njegovog prijenosa u kravlje mlijeko mala. Međutim, smatra se da je to područje još uvijek nedovoljno istraženo.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJAL

U ovom su radu ELISA metodom određivane koncentracije DON-a i ZEN-a u uzorcima kukuruza, domaće stočne hrane, kupovne stočne hrane i mlijeka. Uzorci su podrijetlom s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava (OPG-a) s područja središnje Hrvatske (sjeveroistočno od Zagreba i jugozapadno od Zagreba), a prikupljeni su tijekom prosinca 2015. i siječnja 2016. godine.

Područje sjeveroistočno od Zagreba obuhvaća Varaždinsku i Koprivničko-križevačku županiju (okolica Ludbrega i Koprivnice), a područje jugozapadno od Zagreba Zagrebačku županiju (Jastrebarsko i okolica).

Ukupno je prikupljen i analiziran 71 uzorak kukuruza, 16 uzoraka kupovne stočne hrane (krmiva), 44 uzoraka domaće stočne hrane i 75 uzoraka mlijeka.

Prikupljeni uzorci kukuruza su rod 2014. i 2015. godine.

Domaća stočna hrana pripremljena je miješanjem različitih kombinacija žitarica roda 2014. i 2015. godine (kukuruz, pšenica, ječam, zob, raž), otpadnih produkata u proizvodnji ulja (sačma suncokreta) te silaže i sijena.

Svi uzorci mlijeka su prikupljeni potpuno svježi, bez ikakve prethodne obrade.

Sa svakog OPG-a prikupljeni su uzorci uobičajene ishrane jednog goveda te mlijeko istog, kako bi mogao utvrditi prijenos DON-a i ZEN-a iz stočne hrane u mlijeko goveda.

Do analize, uzorci kukuruza te domaće i kupovne stočne hrane skladišteni su u plastičnim vrećicama na hladnome mjestu, a uzorci mlijeka su zamrznuti (-18° C) u plastičnim epruvetama netom nakon prikupljanja.

4.2. METODE RADA

4.2.1. Validacija ELISA metode korištene u radu

Određivanje validacijskih parametara

Validacija ELISA metoda određivanja koncentracije DON-a i ZEN-a u žitaricama analiziranim u ovome radu uključivala je određivanje limita detekcije (LOD) i limita kvantifikacije (LOQ), istinitosti, iskorištenja i ponovljivosti korištenih analitičkih metoda.

Određivanje **limita detekcije** (LOD) metoda provedeno je na način da je u uzorcima u kojima je prethodno dokazano da ovi mikotoksini nisu prisutni (kontrolni materijal; posebno kukuruz, pšenica i mlijeko) utvrđena koncentracija analita DON-a i ZEN-a kroz 10

određivanja. Nakon provedenog analitičkog postupka, određena je srednja vrijednost koncentracija ovih mikotoksina te standardna devijacija. LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) je jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti tri standardne devijacije istih određivanja za svaki pojedini mikotoksin.

Određivanje **limita kvantifikacije** (LOQ) metoda provedeno je na isti način kao i određivanje LOD (10 određivanja mikotoksina u kontrolnom materijalu), samo što je LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) jednak sumi srednje vrijednosti koncentracija i vrijednosti šest standardnih devijacija istih određivanja za svaki pojedini mikotoksin.

Određivanje **istinitosti** provedeno je ispitivanjem certificiranog referentnog materijala (CRM) sa određenom količinom DON-a i ZEN-a u kukuruzu (proizvođač QC materijala), na način da je provedeno po šest analiza CRM za svaki analit. Nakon određivanja koncentracije DON-a i ZEN-a u svakom pojedinom uzorku kroz šest određivanja za svaki mikotoksin, određeno je podudaranje dobivenih rezultata sa vrijednostima definiranim od strane proizvođača kontrolnog materijala.

Iskorištenje analitičkih postupaka utvrđeno je obogaćivanjem uzoraka kukuruza standardnim otopinama analita na tri razine obogaćenja. Vrijednost iskorištenja (%) izračunata je kao odnos dobivenog iskorištenja i teoretskog iskorištenja i pomnožena sa 100.

Za određivanje **ponovljivosti** svi koraci kao kod određivanja iskorištenja su ponovljeni još dva puta od strane istog analitičara uz minimalno variranje uvjeta i u što kraćem vremenskom razdoblju te je izračunata i ukupna srednja koncentracija i koeficijent varijacije za obogaćene uzorke.

4.2.2. Određivanje DON-a i ZEN-a u uzorcima žitarica, stočne hrane i mlijeka

Oprema i pribor koji su korišteni u radu:

- kemijski analizator, *ChemWell 2910, Awareness Technology Inc.*
- digitalna vaga, *AND GF 2000*
- tresilica, *IKA HS 260 Control*
- centrifuga, *Universal 120R, Hettich*
- mlin, *TECATOR Cylotec 1093 Sample Mill, Höganäs*
- hladnjak 2-8°C, *LTH*
- jednokanalne mikropipete 10-100 μL i 100-1000 μL , *Eppendorf Research*
- Erlenmeyer tikvice sa ubrušenim čepom
- stakleni lijevci

- filter papir (Whatman No. 1)
- računalo sa printerom

Priprema enzimskog konjugata koji je korišten u radu: enzimski konjugat razrijeđen je u omjeru 1:11 (1+10) puferom za razrjeđivanje (npr. 200 µL koncentrata + 2 mL pufera za razrjeđivanje).

4.2.2.1. Određivanje DON-a ELISA metodom u uzorcima žitarica i stočne hrane

Princip metode:

DON je ekstrahiran iz uzorka vodom te je dobiveni ekstrakt filtriran. Tako dobiveni filtrat korišten je za ELISA metodu. Određivanje DON-a temelji se na kompetitivnom (inhibicijskom) vezivanju.

Sadržaj kita DON

Kemikalije za ovu metodu sadržane su u kitu DON, R-Biopharm, Njemačka:

- mikrotitracijska ploča sa 96 jažica (12 redova sa po 8 jažica)
- 5 standardnih otopina DON-a u vodi (1,3 mL) koncentracije: 0 µg/L, 3,7 µg/L, 11,1 µg/L, 33,3 µg/L, 100 µg/L
- enzimski konjugat (6 mL)
- anti-DON antitijelo (6 mL)
- supstrat/ kromogen (10 mL)
- stop otopina – 1N H₂SO₄ (14 mL)
- pufer za ispiranje (sol) za pripremu 10 mM fosfatnog pufera (pH 7.4), sadrži 0,05% Tween 20

Priprema reagenasa:

Pufer za ispiranje

Pufer je sadržan u kitu u obliku soli. Manja količina pripremljena je za svaku pojedinu analizu otapanjem 1 g soli u 100 mL destilirane vode, pH je podešen na 7,4 te je pufer pohranjen na +4° C do početka analize.

Provedba metode

Priprema uzoraka kukuruza i hrane za životinje:

- uzorci (koje je prethodno potrebno čuvati na hladnom mjestu zaštićenom od svjetla) su usitnjeni pomoću mlina
- 5 g uzorka pomiješano je s 25 mL destilirane vode
- otopina je energično miješana tri minute pomoću tresilice
- ekstrakt je profiltriran kroz Whatman filter br. 1
- 50 μ L filtrata ukapavano je u jažice

Napomena: kada je koncentracija DON-a u uzorku bila veća od 4,050 μ g/kg, pristupljeno je daljnjem razrjeđivanju te je u konačnici uzet u obzir korišteni faktor razrjeđenja.

Test procedura:

- mikrotitracijska ploča sa dovoljnim brojem jažica pripremljena je na način da su standardi i uzorci postavljeni u duplikatima te je određen položaj svakog od njih;
- dodano je 50 μ L otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redosljedu u duplikatima u jažice;
- dodano je 50 μ L enzimskog konjugata u svaku jažicu;
- dodano je 50 μ L anti-DON antitijela u svaku jažicu, otopina je lagano promiješana i inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi (20-25° C);
- cjelokupni sadržaj tekućine je uklonjen iz jažica; u sve jažice dodano je 250 μ L pufera za ispiranje i ponovno je uklonjena tekućina iz jažica; ispiranje je ponovljeno 3 puta;
- dodano je 100 μ L supstrat/kromogena u svaku jažicu, otopina je lagano promiješana i inkubirana 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi (20-25 °C);
- dodano je 100 μ L stop otopine u svaku jažicu, ploča je lagano protrešena te je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm; očitavanje je izvršeno unutar 10 minuta nakon dodatka stop otopine

Izračunavanje:

Nakon analize izvršeno je određivanje koncentracije DON-a u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbancija dobivenih za standarde i uzorke podijeljene su s apsorbancijom

prvog, odnosno nultog standarda (0 µg/kg) i pomnožene sa 100 te su dobiveni %-tci apsorbancije B/B₀. Prema tome, za nulti standard dobivena je vrijednost jednaka 100%.

$$\frac{\text{apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{apsorbancija nultog standarda}} \times 100 = \% \text{ apsorbancije}$$

Koncentracija DON-a u uzorcima očitana je iz baždarne semi-logaritamske krivulje nacrtane uporabom programa uređaja Chemwell. Na ordinatu su naneseone vrijednosti %-taka apsorbancije za standardne koncentracije DON-a, a na apscisu koncentracije DON-a (µg/kg). Koncentracija DON-a očitana s krivulje pomnožena je s odgovarajućim faktorom razrjeđenja (faktor razrjeđenja = 5).

4.2.2.2. Određivanje ZEN-a ELISA metodom u uzorcima žitarica i stočne hrane

Princip metode:

ZEN je ekstrahiran iz uzorka otopinom metanola te je dobiveni ekstrakt filtriran. Tako dobiveni filtrat korišten je za ELISA metodu. Određivanje ZEN-a temelji se na kompetitivnom (inhibicijskom) vezivanju.

Sadržaj kita ZEN

Kemikalije za ovu metodu sadržane su u kitu ZEN, R-Biopharm, Njemačka:

- mikrotitracijska ploča sa 96 jažica (12 redova sa po 8 jažica)
- šest standardnih otopina zearalenona (1,3 mL) koncentracije: 0 µg/kg, 0,05 µg/kg, 0,15 µg/kg, 0,45 µg/kg, 1,35 µg/kg i 4,05 µg/kg
- enzimski konjugat (0,7 mL) - koncentrat
- supstrat (7 mL)
- kromogen (7 mL)
- stop otopina – 1N H₂SO₄ (14 mL)
- pufer za razrjeđivanje (50 mL)

Dodatni reagens: metanol, >99,8%

Priprema reagenasa:

- 1) **70%-tna otopina metanola:** 70 mL metanola razrijeđeno je s 30 mL destilirane vode.

Za svaku novu analizu pripremljena je svježa 70%-tna metanolna otopina.

- 2) **Metanolni PBS za razrjeđivanje uzoraka, pH= 7,2:** ukoliko količina pufera iz kita nije bila dostatna, pripremljen je novi pufer prema uputi T-2 toksin R-Biopharm: 0,055 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ + 0,285 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,9 g NaCl je otopljeno u 100 mL otopine metanol/voda (10 mL metanola + 90 mL vode)

Provedba metode

Priprema uzoraka kukuruza i hrane za životinje:

- uzorci (koje je prethodno potrebno čuvati na hladnom mjestu zaštićenom od svjetla) su usitnjeni pomoću mlina
- 5 g uzorka pomiješano je s 25 mL 70%-tne otopine metanola
- otopina je energično miješana tri minute pomoću tresilice (<400 o/min)
- uzorak je ostavljen da odstoji 2-3 minute
- ekstrakt je profiltriran kroz Whatman filter br.1 ili centrifugiran 10 minuta na 3500 okretaja u minuti, pri 20-25 °C (u slučaju kada se radilo s uzorkom pšenice)
- ekstrakt je razrijeđen u omjeru 1:7 (1+6) puferom za razrjeđivanje

Napomena: kada je koncentracija ZEN-a u uzorku bila veća od 4,050 µg/kg, pristupljeno je daljnjem razrjeđivanju te je u konačnici uzet u obzir korišteni faktor razrjeđenja.

Test procedura:

- mikrotitracijska ploča sa dovoljnim brojem jažica pripremljena je na način da su standardi i uzorci postavljeni u duplikatima te je određen položaj svakog od njih;
- dodano je 50 µL otopine standarda i pripremljenih uzoraka po određenom redosljedju u jažice;
- dodano je 50 µL enzimskog konjugata u svaku jažicu, koristeći multikanalne pipete;
- otopine su inkubirane 2 sata u mraku na sobnoj temperaturi (20-25 °C)
- cjelokupni sadržaj tekućine je uklonjen iz jažica; u sve jažice dodano je 250 µL destilirane vode i ponovno je uklonjena tekućina iz jažica te je lupkano o sloj papira; ispiranje je ponovljeno 3 puta;
- dodano je 50 µL supstrata i 50 µL kromogena u svaku jažicu, otopina je lagano promiješana i inkubirana 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi (20-25 °C);

- dodano je 100 μL stop otopine u svaku jažicu, ploča je lagano protrešena te je izmjerena apsorbanacija pri valnoj duljini od 450 nm; očitavanje je izvršeno unutar 30 minuta nakon dodatka stop otopine.

Izračunavanje:

Nakon analize je izvršeno određivanje koncentracije ZEN-a u uzorku. Srednje vrijednosti apsorbanacija dobivenih za standarde i uzorke podijeljene su s apsorbancijom prvog, odnosno nultog standarda (0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i pomnožene sa 100 te su dobiveni %-tci apsorbanacije B/B_0 . Prema tome, za nulti standard dobivena je vrijednost jednaka 100%.

$$\frac{\text{Apsorbancija standarda (ili uzorka)}}{\text{Apsorbancija nultog standarda}} \times 100 = \% \text{ apsorbanacije}$$

Koncentracija ZEN-a u uzorcima očitana je iz baždarne semi-logaritamske krivulje nacrtane uporabom programa uređaja Chemwell. Na ordinatu su nanesene vrijednosti %-taka apsorbanacije za standardne koncentracije ZEN-a, a na apscisu koncentracije ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Koncentracija ZEN-a očitana s krivulje pomnožena je s odgovarajućim faktorom razrjeđenja (faktor razrjeđenja = 35).

4.2.2.3. Određivanje DON-a i ZEN-a ELISA metodom u uzorcima mlijeka

Nakon provedbe enzimatske reakcije, određivani mikotoksini (DON i ZEN) ekstrahirani su iz uzoraka otopinom metanola te je tako dobivena otopina korištena za analizu ELISA metodom. Određivanje oba mikotoksina temelji se na kompetitivnom (inhibicijskom) vezivanju.

Sadržaj kita DON isti je kao onaj korišten kod određivanja DON-a ELISA metodom u uzorcima žitarica i stočne hrane.

Sadržaj kita ZEN isti je kao onaj korišten kod određivanja ZEN-a ELISA metodom u uzorcima žitarica i stočne hrane.

Priprema uzoraka:

Prethodno odmrznuti uzorci mlijeka (3,000 g) centrifugirani su 15 minuta. Gornji masni sloj uklonjen je pomoću Pasteurove pipete. Dodano je 20 μL enzima glukuronidaze/arilsufataze *Helix pomatia* (Merck, Art. No.: 4114) u 1,0 mL uzorka te je

otopina inkubirana 3 sata na 37° C. Zatim je 0,1 mL metanola dodano u 0,9 mL hidroliziranog i odmašćenog mlijeka te je 50 µL dobivene otopine nanoseno u jažice za analizu.

Napomene:

Standardi su pripremljeni u obranom mlijeku s 10% metanola.

Standardi su pripremljeni prema sljedećem protokolu:

- 1 g obranog mlijeka u prahu otopljeno je u 8 mL destilirane vode + 1 mL metanola (100%) uz miješanje
- dodano je 100 µL standardne otopine ZEN-a/DON-a (40,5 ng/ml) u 900 µL prethodno pripremljene otopine obranog mlijeka u prahu i metanola, što je rezultiralo mliječnim standardom 6 (4050 µg/mL)
- 200 µL mliječnog standarda 6 razrijeđeno je s 400 µL prethodno pripremljene otopine obranog mlijeka u prahu i metanola, što je rezultiralo mliječnim standardom 5 (1350 µg/mL)
- mliječni standard 5 razrijeđen je na isti način, kako bi se dobio mliječni standard 4 (450 µg/mL)
- mliječni standard 4 razrijeđen je za dobivanje mliječnog standarda 3 (150 µg/mL) te je nakon toga razrijeđen mliječni standard 3 za dobivanje mliječnog standarda 2 (50 µg/mL)
- čista otopina obranog mlijeka i metanola korištena je kao standard 1 (0 µg/mL)

Otopine obranog mlijeka pripremljene su svježe na dan analize.

Test procedura provodi se isto kao i kod određivanja DON-a i ZEN-a ELISA metodom u uzorcima žitarica i stočne hrane.

Izračunavanje nakon analize izvršeno je isto kao i kod određivanja DON-a i ZEN-a ELISA metodom u uzorcima žitarica i stočne hrane, osim što je u ovom slučaju faktor razrjeđenja iznosio 1,1.

Čuvanje uzoraka: ekstrakti uzoraka čuvani su na 2-8° C do 2 dana.

4.2.3. Statistička obrada podataka

Nakon provedbe metoda i dobivanja rezultata, provedena je statistička obrada dobivenih podataka o količini DON-a i ZEN-a u prikupljenim uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka.

Pomoću aplikacije Excel Windows operativnog sustava izračunate su srednje vrijednosti (\bar{x}), standardne devijacije (s) i koeficijenti varijabilnosti (CV) te su određene najmanje (min) i najveće (max) vrijednosti koncentracija DON-a i ZEN-a u analiziranim uzorcima.

Pomoću aplikacije Excel Windows operativnog sustava provedeni su i t-testovi. Izračunate p-vrijednosti uspoređene su s α vrijednošću te su iz odnosa $p > \alpha$ ili $p < \alpha$ izvedeni zaključci koji se odnose na (ne)postojanje statistički značajnih razlika između promatranih skupina podataka. Ukoliko je izračunata p-vrijednost manja od $\alpha=0,05$, postoji statistički značajna razlika između promatranih skupova podataka, a ako je p-vrijednost veća od $\alpha=0,05$, zaključujemo da statistički značajna razlika između odabranih skupova podataka ne postoji.

Pomoću iste aplikacije izrađen je dijagram ovisnosti količine ZEN-a u mlijeku o količini ZEN-a u svim prikupljenim uzorcima hrane za goveda (kukuruz, kupovna i domaća stočna hrana), u svrhu određivanja postojanja korelacije između navedena dva parametra.

5. REZULTATI

5.1. REZULTATI VALIDACIJE ELISA METODE

U Tablici 7 prikazani su dobiveni rezultati ispitivanja limita detekcije i limita kvantifikacije primijenjenih ELISA metoda, u Tablici 8 rezultati određivanja parametra istinitosti, a u Tablici 9 rezultati iskorištenja i ponovljivosti.

Tablica 7. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) ELISA metoda

Vrsta žitarice	ZEN		DON	
	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
Kukuruz	2,0	3,2	17,9	23,3
Pšenica	2,4	3,5	18,4	25,6
Mlijeko	0,7	1,1	3,9	5,1

Tablica 8. Istinitost ELISA metoda

Broj određivanja	Dobivene koncentracije ZEN-a* ($\mu\text{g/kg}$)	Dobivene koncentracije DON-a** ($\mu\text{g/kg}$)
1.	352	1650
2.	348	1611
3.	345	1721
4.	360	1689
5.	402	1714
6.	391	1763

Označena vrijednost CRM (FAPAS TO4209QC): *ZEN = 344 $\mu\text{g/kg}$ (raspon konc. 214-473 $\mu\text{g/kg}$); **DON = 1779 $\mu\text{g/kg}$ (raspon konc. 1257-2301 $\mu\text{g/kg}$)

Tablica 9. Iskorištenje i ponovljivost analitičkih metoda određeni na uzorcima kukuruza

Analit	Razina obogaćenja (µg/kg)	Iskorištenje (%)	CV (%)	Ponovljivost (%)	CV (%)
ZEN	50	88,2	6,8	84,6	11,3
	100	90,4	5,4	87,9	9,6
	200	92,7	5,9	90,7	10,1
DON	50	94,6	5,3	92,3	10,4
	100	96,8	5,8	95,4	9,6
	200	99,3	6,1	97,7	8,2

5.2. REZULTATI DOBIVENI ELISA METODOM

Neispunjene ćelije u sljedećim tablicama podrazumijevaju da nije prikupljen uzorak navedenog izvora.

5.2.1. Količine DON-a u kukuruзу, kupovnoj i domaćoj stočnoj hrani te mlijeku određene ELISA metodom

U Tablici 10 nalaze se podaci o količinama DON-a u prikupljenim uzorcima kukuruза, kupovne i domaće stočne hrane ($\mu\text{g}/\text{kg}$) određenima ELISA metodom ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Uzorci označeni pojedinim brojem (prvi stupac) upisani u zelenom polju prikupljeni su s područja Varaždinske županije, u plavom polju s područja Koprivničko-križevačke, a u narančastom s područja Zagrebačke županije.

Tablica 10. Količine DON-a u hrani za životinje i mlijeku određene ELISA metodom ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Uzorak broj	Količina DON-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
1	ND*	961	170	
2	ND	2721		
3	ND	3429	3401	
4		2418	2221	
5	ND	583	923	
6	ND	525		65
7	ND			2312
8	ND	658	455	
9	ND	3904		
10	ND	42	214	
11	ND	70		
26	ND	21		117
27	ND	185		55
28	ND	74		49
29	ND	3712		84
30	ND	785		279
31	ND	ND		292
32	ND	489		846
33	ND	3575		3744
34	ND	345		165
35	ND	40		2612
36	ND	28		342

Tablica 10. Količine DON-a u hrani za životinje i mlijeku određene ELISA metodom (µg/kg) - nastavak

Uzorak broj	Količina DON-a (µg/kg)			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
37	ND	604		689
38	ND	ND		113
39	ND	ND		816
40	ND	40		3744
41	ND	404		
42	ND	59		43
43	ND	316		129
44	ND	114		0
45	ND	3443		3823
46	ND	20		734
47	ND	35	151	
48	ND	734		3143
49	ND	3276		
50	ND	3605		75
51	ND	22		344
52	ND			152
53	ND	743		1045
54	ND	83		118
55	ND	43		613
56	ND	57		160
57	ND			472
58	ND	74		538
59	ND	3143		
60	ND	132		813
61	ND			105
62	ND	26		723
63	ND	2369		65
64	ND	ND		3235
65	ND	146		114
66	ND	439		698
67	ND	863		3222
68	ND	51		376
69	ND	3003		597
70	ND	29		202
71	ND	2655	2602	
72	ND	3954		

Tablica 10. Količine DON-a u hrani za životinje i mlijeku određene ELISA metodom (µg/kg) - nastavak

Uzorak broj	Količina DON-a (µg/kg)			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
73	ND	3744		
74	ND	40	4358	
75	ND	4267	734	
76	ND	ND	2539	
77	ND	1037	770	
78	ND	3331	853	
79	ND			60
80	ND	2457	737	
81	ND	2954		
82	ND	41	533	
83	ND	3169		
84	ND	3415	2755	
85	ND	3728		
86	ND	4285		
87	ND	4249		
88	ND	4267		
89	ND	343		
90	ND	3904		

*ND-nije detektirano

5.2.2. Količine ZEN-a u kukuruzu, kupovnoj i domaćoj stočnoj hrani te mlijeku određene ELISA metodom

U Tablici 11 nalaze se podaci o količinama ZEN-a u prikupljenim uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane ($\mu\text{g}/\text{kg}$) određenima ELISA metodom ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Uzorci označeni pojedinim brojem (prvi stupac) upisani u zelenom polju prikupljeni su s područja Varaždinske županije, u plavom polju s područja Koprivničko-križevačke, a u narančastom s područja Zagrebačke županije.

Tablica 11. Količine ZEN-a u hrani za životinje i mlijeku određene ELISA metodom ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Broj uzorka	Količina ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
1	4	ND	ND	
2	4	157		
3	3	1937	765	
4		38	57	
5	3	ND	56	
6	1	39		ND
7	1			8
8	4	ND	2	
9	1	2347		
10	3	ND	ND	
11	3	ND		
26	9	ND		8
27	3	ND		ND
28	3	ND		7
29	3	1980		7
30	3	29		ND
31	3	ND		22
32	2	ND		16
33	1	1256		878
34	3	ND		ND
35	1	ND		221
36	1	ND		6
37	3	ND		12
38	3	ND		5
39	12	ND		150
40	3	ND		859

Tablica 11. Količine ZEN-a u hrani za životinje i mlijeku određene ELISA metodom ($\mu\text{g}/\text{kg}$) - nastavak

Broj uzorka	Količina ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
41	4	204		
42	4	ND		18
43	4	ND		ND
44	4	277		
45	6	1464		854
46	11	ND		37
47	3	ND	ND	
48	ND*	580		151
49	3	908		
50	3	1652		ND
51	1	ND		5
52	2			ND
53	3	ND		ND
54	1	ND		2
55	7	ND		38
56	1	ND		2
57	1			18
58	8	ND		33
59	4	362		
60	4	ND		53
61	1			ND
62	1	ND		854
63	2	ND		ND
64	1	ND		155
65	2	ND		4
66	1	ND		74
67	1	72		55
68	1	ND		4
69	1	4364		21
70	3	ND		36
71	1	39	ND	
72	1	817		
73	4	2173		
74	2	ND	840	
75	4	2088	19	
76	ND	ND	1774	

Tablica 11. Količine ZEN-a u hrani za životinje i mlijeku određene ELISA metodom (µg/kg) - nastavak

Broj uzorka	Količina ZEN-a (µg/kg)			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
77	4	114	ND	
78	1	466	75	
79	2			8
80	2	2058	3	
81	2	70		
82	2	ND	18	
83	4	209		
84	1	742	2115	
85	2	2234		
86	2	4293		
87	4	840		
88	7	2520		
89	2	ND		
90	6	1862		

*ND-nije detektirano

5.3. REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA

5.3.1. Rezultati deskriptivne statističke obrade podataka na temelju određenih količina DON-a u uzorcima

U Tablici 12 prikazani su rezultati deskriptivne statističke analize podataka provedene na temelju određenih količina DON-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka.

U Tablicama 13-15 prikazani su rezultati deskriptivne statističke analize podataka provedene na temelju određenih količina DON-a u kukuruza, kupovnoj i domaćoj stočnoj hrani te mlijeku, ovisno o njihovom podrijetlu, odnosno županijama u kojima su prikupljeni (Varaždinska, Koprivničko-križevačka i Zagrebačka županija).

Tablica 12. Deskriptivna statistička analiza određenih količina DON-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka

Deskriptivni statistički parametar	DON			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	-	1519,21	1463,41	881,77
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	-	1606,35	1313,23	1188,01
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	-	105,74	89,74	134,73
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	-	20	151	43
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	-	4285	4358	3823

Tablica 13. Deskriptivna statistička analiza određenih količina DON-a u uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka prikupljenih na području Varaždinske županije (okolica Ludbrega)

Deskriptivni statistički parametar	Izvor			
	Mlijeko (N=11)	Kukuruz (N=11)	Kupovna stočna hrana (N=0)	Domaća stočna hrana (N=10)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	-	986,09	-	990,71
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	-	1448,62	-	1330,13
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	-	146,91	-	134,26
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	-	20	-	84
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	-	3712	-	3744

Tablica 14. Deskriptivna statistička analiza određenih količina DON-a u uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka prikupljenih na području Koprivničko-križevačke županije (okolica Koprivnice)

Deskriptivni statistički parametar	Izvor			
	Mlijeko (N=34)	Kukuruz (N=31)	Kupovna stočna hrana (N=1)	Domaća stočna hrana (N=31)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	-	836,06	151,00	852,40
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	-	1262,03	-	1171,78
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	-	150,95	-	137,47
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	-	21	151	43
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	-	3605	151	3823

Tablica 15. Deskriptivna statistička analiza određenih količina DON-a u uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka prikupljenih na području Zagrebačke županije (Jastrebarsko i okolica)

Deskriptivni statistički parametar	Izvor			
	Mlijeko (N=30)	Kukuruz (N=29)	Kupovna stočna hrana (N=15)	Domaća stočna hrana (N=3)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	-	2398,11	1550,90	812,30
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	-	1565,44	1265,74	1060,73
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	-	65,28	81,61	130,58
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	-	40	170	60
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	-	4285	4358	2312

5.3.2. Rezultati deskriptivne statističke obrade podataka na temelju određenih količina ZEN-a u uzorcima

U Tablici 16 nalaze se rezultati deskriptivne statističke analize podataka provedene na temelju određenih količina ZEN-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka.

U Tablicama 17-19 nalaze se rezultati deskriptivne statističke analize podataka provedene na temelju određenih količina ZEN-a u kukuruza, kupovnoj i domaćoj stočnoj hrani te mlijeku, ovisno o njihovom podrijetlu, odnosno županijama u kojima su prikupljeni (Varaždinska, Koprivničko-križevačka i Zagrebačka županija).

Tablica 16. Deskriptivna statistička analiza određenih količina ZEN-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka

Deskriptivni statistički parametar	ZEN			
	Izvor			
	Mlijeko (N=75)	Kukuruz (N=71)	Kupovna stočna hrana (N=16)	Domaća stočna hrana (N=44)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	3,08	1193,43	520,35	140,02
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	2,26	1181,84	771,09	277,01
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	0,73	99,03	148,19	197,83
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	1	29	2	2
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	12	4364	2115	878

Tablica 17. Deskriptivna statistička analiza određenih količina ZEN-a u uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka prikupljenih na području Varaždinske županije (okolica Ludbrega)

Deskriptivni statistički parametar	Izvor			
	Mlijeko (N=11)	Kukuruz (N=11)	Kupovna stočna hrana (N=0)	Domaća stočna hrana (N=10)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	4,59	1155,97	-	136,80
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	3,76	732,24	-	277,38
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	81,93	63,34	-	202,76
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	1	580	-	4
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	12	1980	-	859

Tablica 18. Deskriptivna statistička analiza određenih količina ZEN-a u uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka prikupljenih na području Koprivničko-križevačke županije (okolica Koprivnice)

Deskriptivni statistički parametar	Izvor			
	Mlijeko (N=34)	Kukuruz (N=31)	Kupovna stočna hrana (N=1)	Domaća stočna hrana (N=31)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	2,85	1075,58	-	153,36
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	2,10	1384,59	-	292,84
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	73,77	128,73	-	190,95
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	1	29	-	2
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	9	4364	-	878

Tablica 19. Deskriptivna statistička analiza određenih količina ZEN-a u uzorcima kukuruza, kupovne i domaće stočne hrane te mlijeka prikupljenih na području Zagrebačke županije (Jastrebarsko i okolica)

Deskriptivni statistički parametar	Izvor			
	Mlijeko (N=30)	Kukuruz (N=29)	Kupovna stočna hrana (N=15)	Domaća stočna hrana (N=3)
Srednja vrijednost (\bar{x}) ($\mu\text{g/kg}$)	2,82	1252,08	520,35	7,77
Standardna devijacija (s) ($\mu\text{g/kg}$)	1,52	1155,25	735,21	0,19
Koeficijent varijacije ($CV=s/\bar{x}$) (%)	0,54	0,92	1,41	0,02
Najmanja određena koncentracija (min) ($\mu\text{g/kg}$)	1	38	2	8
Najveća određena koncentracija (max) ($\mu\text{g/kg}$)	7	4293	2115	8

5.3.3. Rezultati t-testova provedenih na temelju određenih količina DON-a u različitim izvorima stočne hrane i na temelju različitog podrijetla

Tablica 20 sadrži rezultate (p - vrijednosti) t-testova provedenih na temelju različitosti u količinama DON-a u pojedinim vrstama hrane za životinje (kukuruz, kupovna i domaća stočna hrana) i geografskom podrijetlu (područje sjeveroistočno i jugozapadno od Grada Zagreba te prema županijama u kojima su prikupljeni uzorci)

Tablica 20. Značajnost razlika u količini DON-a s obzirom na vrstu hrane i geografsko podrijetlo

DON		
Vrsta hrane	Geografsko podrijetlo	p - vrijednost
Kukuruz - kupovna stočna hrana	središnja Hrvatska (svi uzorci)	0,89790
Kukuruz - domaća stočna hrana	središnja Hrvatska (svi uzorci)	0,21871
Kupovna stočna hrana - domaća stočna hrana	središnja Hrvatska (svi uzorci)	0,09573
Kukuruz	sjeveroistočno i jugozapadno od Zagreba	0,00006
Kukuruz - domaća stočna hrana	sjeveroistočno od Zagreba	0,98219
Kukuruz - kupovna stočna hrana	jugozapadno od Zagreba (Zagrebačka županija)	0,08563
Kukuruz - domaća stočna hrana	jugozapadno od Zagreba (Zagrebačka županija)	0,10834
Kupovna stočna hrana - domaća stočna hrana	jugozapadno od Zagreba (Zagrebačka županija)	0,38546
Kukuruz - domaća stočna hrana	Varaždinska županija	0,99430
Kukuruz - domaća stočna hrana	Koprivničko-križevačka županija	0,97169
Kukuruz	Zagrebačka - Varaždinska županija	0,02403
Domaća stočna hrana	Zagrebačka - Varaždinska županija	0,84161
Kukuruz	Zagrebačka - Koprivničko-križevačka županija	0,00013
Domaća stočna hrana	Zagrebačka - Koprivničko-križevačka županija	0,98592
Kukuruz	Koprivničko-križevačka - Varaždinska županija	0,76506
Domaća stočna hrana	Koprivničko-križevačka - Varaždinska županija	0,70676

5.3.4. Rezultati t-testova provedenih na temelju određenih količina ZEN-a u različitim izvorima stočne hrane i na temelju različitog podrijetla

Tablica 21 sadrži rezultate (p - vrijednosti) t-testova provedenih na temelju različitosti u količinama ZEN-a u pojedinim vrstama hrane za životinje (kukuruz, kupovna i domaća stočna hrana) i geografskom podrijetlu (područje sjeveroistočno i jugozapadno od Grada Zagreba te prema županijama u kojima su prikupljeni uzorci)

Tablica 21. Značajnost razlika u količini ZEN-a s obzirom na vrstu hrane i geografsko podrijetlo

ZEN		
Vrsta hrane	Geografsko podrijetlo	p – vrijednost
Kukuruz - kupovna stočna hrana	središnja Hrvatska (svi uzorci)	0,08635
Kukuruz - domaća stočna hrana	središnja Hrvatska (svi uzorci)	0,00001
Kupovna stočna hrana - domaća stočna hrana	središnja Hrvatska (svi uzorci)	0,01887
Kukuruz	sjeveroistočno i jugozapadno od Zagreba	0,72337
Kukuruz - domaća stočna hrana	sjeveroistočno od Zagreba	0,00019
Kukuruz - kupovna stočna hrana	jugozapadno od Zagreba (Zagrebačka županija)	0,07641
Kukuruz - domaća stočna hrana	jugozapadno od Zagreba (Zagrebačka županija)	0,16191
Kupovna stočna hrana - domaća stočna hrana	jugozapadno od Zagreba (Zagrebačka županija)	0,38387
Kukuruz - domaća stočna hrana	Varaždinska županija	0,00397
Kukuruz - domaća stočna hrana	Koprivničko-križevačka županija	0,00508
Kukuruz	Zagrebačka - Varaždinska županija	0,89389
Domaća stočna hrana	Zagrebačka - Varaždinska županija	0,54365
Kukuruz	Zagrebačka - Koprivničko-križevačka županija	0,72723
Domaća stočna hrana	Zagrebačka - Koprivničko-križevačka županija	0,49803
Kukuruz	Koprivničko-križevačka - Varaždinska županija	0,92686
Domaća stočna hrana	Koprivničko-križevačka - Varaždinska županija	0,88573

5.3.5. Stopa prijenosa („carry-over“ efekt) ZEN-a iz hrane za životinje u mlijeko

Nakon što su određene količine ZEN-a u hrani (kukuruzu, domaćoj i kupovnoj stočnoj hrani), izračunat je ukupni unos ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$) za svaki pojedini uzorak (odnosno, ukupna količina ZEN-a koji je unijelo govedo od kojeg potječe prikupljeno mlijeko i koje se hrani pripadajućom prikupljenom hranom) na način da su zbrojene količine ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$) iz svakog pojedinog izvora hrane. Količina ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{L}$) u mlijeku zatim je podijeljena s ukupnom unesenom količinom ZEN-a ($\mu\text{g}/\text{kg}$) te je dobivena vrijednost pomnožena sa 100 i na taj način izračunata je stopa prijenosa („carry-over“) ZEN-a iz hrane u mlijeko (%). Važno je naglasiti da se dobiveni rezultati odnose na količinu ZEN-a koja se „carry over“-om prenese u jednu litru mlijeka goveda iz jednog kilograma svih navedenih i prikupljenih vrsta hrane (kukuruz te kupovna i domaća stočna hrana) koju ono unosi hranidbom (uz pretpostavku da se govedo od kojeg je uzet uzorak mlijeka hrani navedenim različitim vrstama hrane prikupljenih uzoraka).

U Tablici 22 nalaze se podaci o određenim količinama ZEN-a u uzorcima mlijeka (prikupljenima s pojedinog OPG-a) i ukupnim količinama ZEN-a u svim uzorcima hrane za životinje prikupljenim s istog OPG-a, uz pripadajuće stope prijenosa ZEN-a iz stočne hrane u mlijeko.

Tablica 22. Određene količine ZEN-a u prikupljenim uzorcima mlijeka ($\mu\text{g/L}$) i ukupne količine ZEN-a iz prikupljenih uzoraka stočne hrane ($\mu\text{g/kg}$) te pripadajuća stopa prijenosa

Broj uzorka	Količina ZEN-a u mlijeku ($\mu\text{g/L}$)	Ukupna količina ZEN-a ($\mu\text{g/kg}$) iz svih prikupljenih uzoraka žitarica i hrane za životinje	Stopa prijenosa ZEN-a ("carry-over" efekt) (%)
1	4	..**	-
2	4	157	2,30
3	3	2702	0,12
4		95	-
5	3	56	5,66
6	1	39	3,20
7	1	8	16,62
8	4	2	249,71
9	1	2347	0,05
10	3	-	-
11	3	-	-
26	9	8	112,11
27	3	-	-
28	3	7	49,84
29	3	1987	0,16
30	3	29	11,84
31	3	22	13,29
32	2	16	14,75
33	1	2133	0,03
34	3	-	-
35	1	221	0,25
36	1	6	17,75
37	3	12	26,48
38	3	5	53,63
39	12	150	7,86
40	3	859	0,39
41	4	204	2,06
42	4	18	20,32
43	4	-	-
44	4	277	1,40
45	6	2318	0,27
46	11	37	30,90
47	3	-	-
48	ND*	731	-
49	3	908	0,31
50	3	1652	0,20
51	1	5	18,80
52	2	-	-
53	3	-	-
54	1	2	55,98
55	7	38	17,93

Tablica 22. Određene količine ZEN-a u prikupljenim uzorcima mlijeka ($\mu\text{g/L}$) i ukupne količine ZEN-a iz prikupljenih uzoraka stočne hrane ($\mu\text{g/kg}$) te pripadajuća stopa prijenosa - nastavak

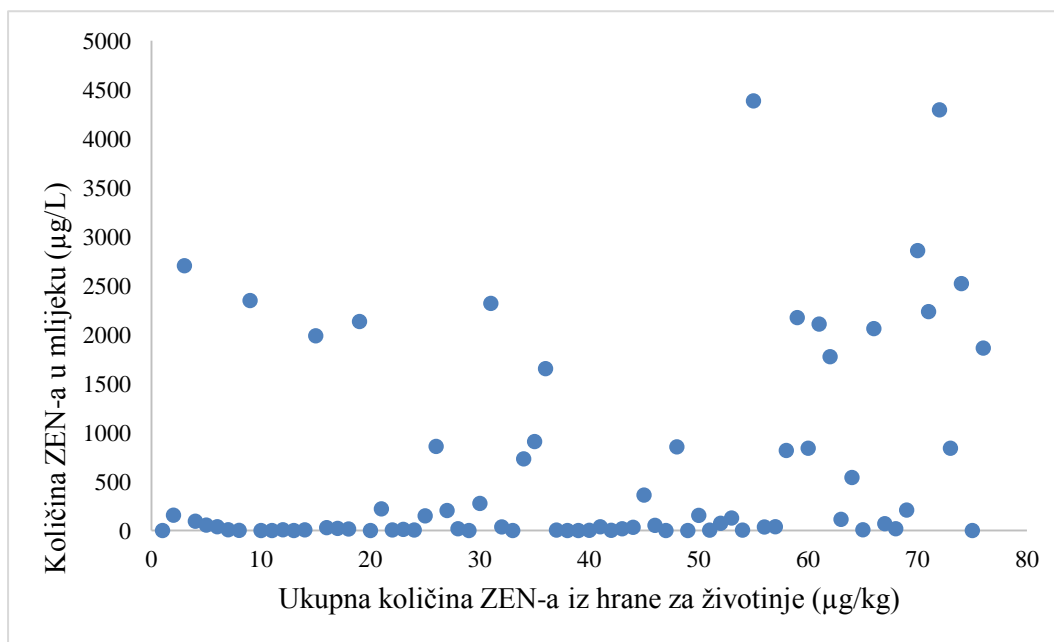
Broj uzorka	Količina ZEN-a u mlijeku ($\mu\text{g/L}$)	Ukupna količina ZEN-a ($\mu\text{g/kg}$) iz svih prikupljenih uzoraka žitarica i hrane za životinje	Stopa prijenosa ZEN-a ("carry-over" efekt) (%)
56	1	2	59,99
57	1	18	7,93
58	8	33	25,12
59	4	362	1,10
60	4	53	7,39
61	1	-	-
62	1	854	0,10
63	2	-	-
64	1	155	0,68
65	2	4	59,64
66	1	74	1,48
67	1	128	0,75
68	1	4	11,60
69	1	4385	0,03
70	3	36	7,53
71	1	39	3,69
72	1	817	0,08
73	4	2173	0,17
74	2	840	0,28
75	4	2107	0,18
76	ND	1774	-
77	4	114	3,59
78	1	541	0,21
79	2	8	26,41
80	2	2061	0,09
81	2	70	2,19
82	2	18	8,64
83	4	209	2,01
84	1	2857	0,05
85	2	2234	0,11
86	2	4293	0,05
87	4	840	0,47
88	7	2520	0,29
89	2	-	-
90	6	1862	0,33

*ND- nije detektirano

** - označava da taj podatak nije moguće izračunati, bilo iz razloga što ZEN nije detektiran niti u jednom uzorku stočne hrane (pripadajućeg broja), ili u mlijeku istog

5.3.6. Korelacija između određenih količina ZEN-a u mlijeku i ukupnih količina u hrani za životinje

Slika 6 prikazuje dijagram ovisnosti količine ZEN-a u prikupljenim uzorcima mlijeka ($\mu\text{g/L}$) o ukupnoj količini ZEN-a iz svih prikupljenih uzoraka hrane za životinje (kukuruz, kupovne i domaće stočne hrane) ($\mu\text{g/kg}$) izrađen pomoću aplikacije Excel Windows operativnog sustava.



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti količine ZEN-a ($\mu\text{g/L}$) u prikupljenim uzorcima mlijeka o ukupnoj količini ZEN-a ($\mu\text{g/kg}$) iz svih prikupljenih uzoraka hrane za životinje

Budući da u ovom istraživanju DON u mlijeku nije detektiran, nije moguće prikazati dijagram ovisnosti količine DON-a u mlijeku o ukupnoj količini DON-a iz svih prikupljenih uzoraka hrane za životinje (kukuruz, domaća i kupovna stočna hrana).

6. RASPRAVA

U ovom radu provedeno je određivanje koncentracije DON-a i ZEN-a ELISA metodom iz četiri različita izvora: mlijeka, kukuruza, domaće stočne hrane te kupovne stočne hrane. Provedena je statistička analiza dobivenih podataka. Određene su najmanja (min) i najveća (max) vrijednost koncentracija DON-a i ZEN-a u uzorcima, izračunate su prosječne vrijednosti (\bar{x}) koncentracija DON-a i ZEN-a te standardna devijacija (s) i koeficijent varijabilnosti (CV). Nakon toga provedeni su t-testovi, kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između određenih skupina podataka. Izračunata je stopa prijenosa („carry over“ efekt) DON-a i ZEN-a iz hrane (kukuruza, domaće i kupovne stočne hrane) u mlijeko te je pomoću aplikacije Microsoft Excel Windows operativnog sustava izrađen dijagram ovisnosti količine ZEN-a u prikupljenim uzorcima mlijeka i ukupne količine ZEN-a iz svih prikupljenih uzoraka hrane za životinje, kako bi se moglo zaključiti postoji li korelacija između navedenih parametara.

6.1. KOLIČINA DON-a U UZORCIMA KUKURUZA, KUPOVNE I DOMAĆE STOČNE HRANE TE MLJEKA

U 80 od 85, odnosno u 94% prikupljenih uzoraka kukuruza za ovo istraživanje detektiran je DON, srodno rezultatima istraživanja Pleadin i sur. (2012b), provedenom u Hrvatskoj, u kojemu je DON detektiran u 85% uzoraka. U drugom istraživanju Pleadin i sur. (2013), u 71% uzoraka kukuruza detektiran je DON, a u istraživanju Mitak i sur. (2002) u 64% uzoraka kukuruza.

U prikupljenim uzorcima kukuruza iz ovog istraživanja detektiran je DON u rasponu od 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 4288 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Slično, Pleadin i sur. (2013) su u istraživanju provedenom u Hrvatskoj detektirali DON u rasponu od 215 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 2942 $\mu\text{g}/\text{kg}$ te od 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 17920 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Pleadin i sur., 2012b). Mitak i sur. (2002) detektirali su DON u uzorcima kukuruza prikupljenima u Hrvatskoj u rasponu od 150-2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U istraživanju provedenom u Španjolskoj (Ruiz de Galarreta i sur., 2015), u uzorcima kukuruza prikupljenima 2010. godine detektiran je DON u rasponu od 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 730 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a u uzorcima kukuruza prikupljenima 2011. godine na istom području u rasponu od 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 820 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Moguće je da se DON u uzorcima kukuruza prikupljenima u Španjolskoj nalazio u manjoj količini nego u uzorcima prikupljenima u ovom istraživanju zbog drugačijih uvjeta okoliša i uzgoja kukuruza, o kojima ovisi onečišćenje biljaka i proizvodnja mikotoksina (Adams i sur., 1993).

Srednja vrijednost količine DON-a u kukuruzu određena ovim istraživanjem iznosi 1519 $\mu\text{g}/\text{kg}$, što je u skladu s istraživanjem koje je također provedeno u Hrvatskoj (Pleadin i sur., 2013), u kojemu se pokazalo da je kukuruz najviše kontaminirana žitarica te su određene vrlo visoke količine DON-a srednje vrijednosti 1565 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Srednja vrijednost količine DON-a određena u ovom istraživanju značajno je manja nego u istraživanju Srećec i sur. (2013), koje je također provedeno u Hrvatskoj, a iznosi 3560 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U uzorcima prikupljenima za ovo istraživanje, u Varaždinskoj županiji je u 82% (9/11) uzoraka detektiran DON u rasponu od 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 3712 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pri čemu srednja vrijednost iznosi 986 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U Koprivničko-križevačkoj županiji DON je detektiran u 94% uzoraka (29/31), u rasponu od 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 3605 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Srednja vrijednost koncentracije DON-a u uzorcima kukuruza prikupljenima u Koprivničko-križevačkoj županiji iznosi 836 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U uzorcima prikupljenima za ovo istraživanje, u Zagrebačkoj županiji utvrđena je nešto veća količina DON-a, nego ona u uzorcima prikupljenima u Koprivničko-križevačkoj i Varaždinskoj županiji. U 97% uzoraka (28/29) kukuruza iz Zagrebačke županije je detektiran DON. Količine DON-a u uzorcima prikupljenima u Zagrebačkoj županiji određene su u rasponu od 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 4285 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pri čemu srednja vrijednost iznosi 2398 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Utvrđene količine DON-a u svim žitaricama, pa tako i u kukuruzu, značajno variraju s obzirom na regije u kojima su uzgojene, jer samo onečišćenje biljaka i proizvodnja mikotoksina od strane plijesni izrazito ovise o uvjetima okoliša i uzgoja (Glenn, 2007). Najveća preporučena količina DON-a u kukuruzu namijenjenom za proizvodnju hrane za životinje iznosi 12000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Commission Recommendation 2006/576/EC), a budući da je u prikupljenim uzorcima najveća količina DON-a 4287 $\mu\text{g}/\text{kg}$, zaključujemo da u niti jednom uzorku kukuruza nije detektirana količina veća od najveće preporučene.

U svim analiziranim uzorcima kupovne stočne hrane (16/16) DON je detektiran. U istraživanju provedenom u Finskoj (Hietaniemi i Kumpulainen, 1991), također je u velikom broju uzoraka industrijske stočne hrane (u njih 97%) DON detektiran. Količine DON-a u kupovnoj stočnoj hrani iz ovog istraživanja određene su u rasponu od 151 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 4358 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a srednja vrijednost iznosi 1463 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U istraživanju Hietaniemi i Kumpulainen (1991), određene su nešto manje, ali slične količine DON-a, i to u rasponu od 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ do 1216 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U istom istraživanju srednja vrijednost količina iznosi 148 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DON-a, što je oko 10 puta manje u odnosu na rezultate iz ovog rada. Razlozi toliko većoj količini DON-a u ovom istraživanju mogu biti brojni, budući da siromašna poljoprivredna i žetvena praksa, nepravilno sušenje, rukovanje, pakiranje, skladištenje ili transport žitarica od kojih je stočna hrana načinjena promiču gljivični rast i tako utječu na proizvodnju mikotoksina (Marin i sur.,

2013). Dakle, bilo koji od navedenih čimbenika može biti uzrokom visokih količina DON-a u stočnoj hrani. S područja Varaždinske županije za ovo istraživanje nije prikupljen niti jedan uzorak gotove stočne hrane, dok je s područja Koprivničko-križevačke županije prikupljen samo jedan uzorak, u kojem je ujedno detektirana i najmanja količina DON-a u ovoj vrsti hrane (151 µg/kg). Ostali uzorci gotove stočne hrane, njih 15/16, prikupljeni su s područja Zagrebačke županije. U 38%, odnosno u 6/16 prikupljenih uzoraka gotovih krmnih smjesa određena je razina DON-a veća od najveće preporučene količine koja u krmnoj smjesi za goveda (<4 mjeseca) iznosi 2000 µg/kg (Commission Recommendation 2006/576/EC). Budući da je u većini uzoraka gotovih krmnih smjesa određena razina DON-a manja od najveće preporučene, a u svim uzorcima kukuruza manja od najveće preporučene, već nakon provedene analize žitarica očekivano je da će razine DON-a određene u mlijeku biti vrlo male ili da ih uopće neće biti.

Mikotoksin DON je u domaćim smjesama za životinje detektiran u svih 42 uzoraka, u rasponu od 43 µg/kg do 3823 µg/kg. Srednja vrijednost količina DON-a u analiziranim uzorcima domaće stočne hrane iznosi 882 µg/kg. U domaće pripremljenoj hrani za životinje detektirano je značajno manje DON-a u odnosu na kupovnu. Većina uzoraka domaće stočne hrane (40/43) prikupljena je s područja Varaždinske i Koprivničko-križevačke županije, a 3 su uzorka prikupljena s područja Zagrebačke županije. Srednja vrijednost po navedenim županijama iznosi 991 µg/kg, 852 µg/kg i 812 µg/kg, redom.

Izloženost ljudi mikotoksinima može proizaći iz kontaminacije mliječne hrane mikotoksinima. Mikotoksini su sekundarni metaboliti gljivica, a proizvedeni su kada žitarice (hranu za životinje) koloniziraju plijesni. Dokumentirano je izlučivanje takvih toksina u kravlje mlijeko (Blüthgen i sur., 2004) pa njihov prijenos u mliječne proizvode predstavlja potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje. TDI vrijednost za DON u ljudi iznosi 1 µg/kg tjelesne mase, a budući da u ovom istraživanju niti u jednom uzorku mlijeka nije detektiran DON, zaključujemo da mlijeko s područja središnje Hrvatske nije značajan izvor DON-a za ljude. Moguć razlog tome što DON nije detektiran niti u jednom uzorku mlijeka je relativno visoki limit detekcije ELISA metode za određivanje DON-a u mlijeku. Dakle, moguće je da se DON i nalazio u mlijeku u vrlo malim količinama koje nije bilo moguće detektirati. Nadalje, moguće je da se većina DON-a u organizmu životinje prevela u svoje metabolite. Poznato je da se u buragu preživača DON metabolizira u DOM-1 (koji je znatno manje toksičan od izvornog oblika) (Whitlow i sur., 2006), a budući da DOM-1 (ili bilo koji drugi metabolit DON-a) nije određivan ELISA metodom (nego samo izvorni mikotoksin, DON) određeni su negativni rezultati za njegovu zastupljenost u uzorcima mlijeka. U prilog ovoj tezi

ide i istraživanje Keese i sur. (2009), u kojemu je uglavnom deepoksi-DON detektiran u mlijeku krava. Također, treba uzeti u obzir da faktori prijenosa ne moraju uvijek uzimati u obzir prijenos svih metabolita DON-a. U idealnom slučaju, određivanje bi bilo najprikladnije pod stacionarnim uvjetima. Stacionarni uvjeti pretpostavljaju da je unos DON-a jednak njegovom izlučivanju. Ovi uvjeti često nisu ispunjeni, uglavnom zbog povećanja tijela tijekom rasta ili zbog određenih fizioloških stanja (npr. trudnoće, dojenja itd.) (Fries, 1996). Literaturni navodi pokazuju i da se većina (> 90%) mikotoksina izluči iz organizma životinja bez prijenosa u njihova tkiva i mlijeko (Alldrick i Hajšelová, 2004).

6.2. KOLIČINA ZEN-a U UZORCIMA KUKURUZA, KUPOVNE I DOMAĆE STOČNE HRANE TE MLIJEKA

U ovom istraživanju, najmanja određena količina ZEN-a u uzorcima iznosi 29 µg/kg, a najveća 4364 µg/kg. Taj raspon količina ZEN-a u uzorcima kukuruza u skladu je (uz našu nešto manju najmanju vrijednost) s istraživanjem Balzera i sur. (1977) (čiji je raspon 43-10000 µg/kg) te Pepeljnaka i sur. (1979) (100-4000 µg/kg). Rezultati se razlikuju od rezultata dobivenih u istraživanjima Pepeljnaka i sur. (1999; 2000) (150-1200 µg/kg; 200-2700 µg/kg) i Šegvić Klarić i sur. (2007) (6030-29430 µg/kg) te Pleadin i sur. (2013) (10-611 µg/kg). Razlika u rezultatima može se objasniti razlikama u relativnoj vlažnosti i prosječnoj temperaturi u pojedinim godinama. U vlažnim godinama, odnosno za vrijeme produljenih zima i temperaturnih oscilacija, koncentracije ZEN-a u uzorcima su veće nego u godinama s manjom vlažnosti. Tako su 2004. i 2005. godina vjerojatno bile nešto vlažnije i hladnije, stoga su vrijednosti koncentracije ZEN-a u kukuruza bile nešto veće, od 6030-29430 µg/kg, kao što je pokazalo istraživanje Šegvić Klarić i suradnika (2007). S druge strane, 2011. godina je bila manje vlažna, stoga su u istraživanju Pleadin i sur. (2013) dobivene nešto manje vrijednosti koncentracije ZEN-a u uzorcima kukuruza (10-611 µg/kg). Srednja vrijednost koncentracije ZEN-a određena u uzorcima kukuruza iz ovog istraživanja iznosi 1193 µg/kg, što je manje od najveće preporučene količine ZEN-a u hrani za životinje, koja iznosi 3000 µg/kg. Od svih prikupljenih uzoraka kukuruza, njih 45% (32/71) sadržavalo je detektibilne koncentracije ZEN-a, što je više od rezultata dobivenih u istraživanjima Balzer i sur. (1977) (2,6%), Pepeljnjak i sur. (1979; 1999; 2002) (16%; 10%; 10%), i Šegvić Klarić i sur. (2007), no daleko manje od rezultata istraživanja Domijan i sur. (2005) (83%) i Pleadin i sur. (2013) (78%). U ovom istraživanju, u uzorcima kukuruza prikupljenima s područja Varaždinske županije ZEN je određen u 27% uzoraka (3/11) u rasponu od 580 µg/kg do 1980 µg/kg, pri

čemu srednja vrijednost iznosi 1156 µg/kg. U Koprivničko-križevačkoj županiji ZEN je detektiran u svega 29% (9/31) uzoraka, i to u rasponu od 29 µg/kg do 4364 µg/kg, pri čemu srednja vrijednost količine ZEN-a iznosi 1076 µg/kg. U uzorcima kukuruza prikupljenima u Zagrebačkoj županiji utvrđena je nešto veća količina ZEN-a, nego ona u uzorcima prikupljenima u Koprivničko-križevačkoj i Varaždinskoj županiji. U 69% uzoraka (20/29) kukuruza prikupljenih na području Zagrebačke županije je detektiran ZEN, i to u rasponu od 38 µg/kg do 4293 µg/kg, uz srednju vrijednost od 1252 µg/kg. Utvrđene količine ZEN-a u svim žitaricama, pa tako i u kukuruzu, uvelike variraju s obzirom na regije u kojima su uzgojene, budući da su samo onečišćenje biljaka i proizvodnja mikotoksina od strane plijesni izrazito ovisni o uvjetima okoliša i uzgoja (Adams i sur., 1993).

Najveća preporučena količina ZEN-a u kukuruzu namijenjenom kao hrani za životinje iznosi 3000 µg/kg (Commission Recommendation 2006/576/EC), a u ovom istraživanju određena je najveća količina ZEN-a od 4364 µg/kg. Količina veća od 3000 µg/kg određena je u 2 od 71 prikupljenih uzoraka kukuruza (3%), od čega je jedan s područja Koprivničko-križevačke, a drugi s područja Zagrebačke županije.

Najmanja koncentracija ZEN-a u kupovnoj stočnoj hrani (krmivu) iznosi 2 µg/kg, a najveća iznosi 2115 µg/kg. Najveća vrijednost manja je od one dobivene istraživanjem Nemaniča i suradnika (1986), koja iznosi 6880 µg/kg. I najmanje i najveće vrijednosti veće su od vrijednosti dobivenih u rezultatima istraživanja Pepeljnjaka i Cvetnića (1986) (100-1200 µg/kg), Pepeljnjaka i sur. (1999; 2008) (150-1200 µg/kg; 49,7-1168 µg/kg), Mitaka i sur. (2001) (50-1200 µg/kg) i Šegvić Klarić i sur. (2009) (49,7-1168 µg/kg). Razliku u rezultatima teško je objasniti, ponajviše zbog nepoznavanja točnog sastava svakog od analiziranih krmiva. No, neka od objašnjenja mogu biti nepravilni načini sušenja, pakiranja ili skladištenja smjesa, različita starost ispitivanih kupovnih smjesa, siromašna poljoprivredna praksa itd. (Marin i sur., 2013). Od ukupno 16 prikupljenih uzoraka kupovne stočne hrane iz ovog istraživanja, njih 11 (69%) sadržavalo je detektibilne koncentracije ZEN-a. Ovakva je zastupljenost uzoraka kupovne stočne hrane kontaminirane ZEN-om manja je od onih navedenih u rezultatima istraživanja Pepeljnjaka i Cvetnić (1986) (25%), Nemaniča i sur. (1986) (29%), Pepeljnjaka i sur. (1999) (10%), Mitaka i sur. (2001) (21,9%), no mnogo manja od navedene zastupljenosti ZEN-om kontaminirane stočne hrane u rezultatima istraživanja Pepeljnjaka i sur. (2008), koja iznosi 100%. Brojni su razlozi zbog kojih je količina ZEN-a u ovom istraživanju toliko veća u usporedbi s rezultatima ranijih istraživanja. Neki od njih su svakako siromašna poljoprivredna i žetvena praksa, nepravilno sušenje, rukovanje, pakiranje, skladištenje ili transport žitarica od kojih je stočna hrana načinjena, budući da svi ovi

čimbenici promiču gljivični rast i tako utječu na proizvodnju mikotoksina (Marin i sur., 2013). U 25%, odnosno u 4/16 prikupljenih uzoraka gotove krmne smjese detektirana je razina ZEN-a veća od najveće preporučene količine koja u krmnoj smjesi za goveda (<4 mjeseca) iznosi 500 µg/kg (Commission Recommendation 2006/576/EC).

Što se tiče domaće stočne hrane (bazirane većinom na samljevenom kukuruzu pomiješanom s drugim žitaricama poput zobi, ječma, pšenice), najmanja vrijednost koncentracije ZEN-a u toj sirovini iznosi 2 µg/kg, a najveća 878 µg/kg. Srednja vrijednost od 140 µg/kg ulazi u raspone vrijednosti koncentracije ZEN-a u domaćoj stočnoj hrani koje su u svoji istraživanjima dobili Pepeljnjak i Čturić (1978) (51-4200 µg/kg), Pepeljnjak i Balzer (1982) (10-275800 µg/kg), Pepeljnjak i Cvetnić (1986) (560-3000 µg/kg) te Pepeljnjak i sur. (1992; 1999; 2008) (1-19900 µg/kg; 23-10700 µg/kg; 28-1182 µg/kg). Iako srednja vrijednost koncentracije ZEN-a u domaćoj stočnoj hrani dobivena ovim istraživanjem ulazi u raspone rezultata prethodno spomenutih istraživanja, i najmanja i najveća vrijednost nešto su manje od onih ranije određenih u domaćim smjesama. Razlog tomu mogu opet biti razlike u relativnoj vlažnosti i prosječnoj temperaturi u pojedinim godinama. U ovom istraživanju, u uzorcima domaće stočne hrane s područja Varaždinske županije ZEN je prisutan u 90% uzoraka (9/10) u rasponu od 4 µg/kg do 859 µg/kg, uz srednju vrijednost od 137 µg/kg. U Koprivničko-križevačkoj županiji ZEN je detektiran udjelu 71% uzoraka, odnosno u njih 22 od 31 prikupljenih, i to u rasponu od 2 µg/kg do 878 µg/kg. Pritom srednja vrijednost ZEN-a u analiziranim uzorcima iznosi 153 µg/kg. U uzorcima domaće stočne hrane prikupljenima u Zagrebačkoj županiji utvrđena je mnogo manja količina ZEN-a (gotovo 20 puta manja) od onih određenih u uzorcima prikupljenima u Koprivničko-križevačkoj i Varaždinskoj županiji. Naime, U 67% uzoraka (2/3) domaće stočne hrane prikupljenih na području Zagrebačke županije detektiran je ZEN, i to u prosječnoj količini od 8 µg/kg. Moguće objašnjenje ovakvih razlika u rezultatima je varijabilnost u načinima i duljini skladištenja, ali i različitim sastavima domaćih krmnih smjesa koje su analizirane. Od ukupno 43 prikupljena uzorka domaće stočne hrane, njih 33 (77%) sadržavalo je detektibilne koncentracije ZEN-a. Veća vrijednost, koja iznosi čak 91%, dobivena je u istraživanju Pepeljnjaka i sur. (2008), dok su mnogo manje vrijednosti određene u istraživanjima Pepeljnjaka i Čturića (1978) (6%), Pepeljnjaka i Balzera (1982) (46,5%), Pepeljnjaka i Cvetnića (1986) (15,2%) te Pepeljnjaka i sur. (1992; 1999) (43,2%; 10%). Mogući razlozi ovakvih razlika u rezultatima su jednaki kao i kod kupovne stočne hrane (nepravilno sušenje, rukovanje, skladištenje i slično (Marin i sur., 2013).

Najmanja određena koncentracija ZEN-a u mlijeku iznosi 1 µg/L, a najveća 12 µg/L (Tablica 16). Ovakvi rezultati razlikuju se od onih dobivenih istraživanjima Škrinjar i sur. (1986) i Ashiq (2014), u kojima nije zabilježena kontaminacija sirovog mlijeka ZEN-om, te Winkler i sur. (2015), gdje je sirovo mlijeko kontaminirano ZEN-om u koncentraciji od 0-0,5 µg/L i Dānickea i Winklera (2015), u čijem je istraživanju zabilježena količina ZEN-a u mlijeku od 0,024 µg/kg. Moguće objašnjenje može biti da nisu prikupljeni svi uzorci hrane kojima je životinja hranjena, odnosno da mljekari nisu dostavili sve vrste hrane kojom hrane životinju čije su uzorke mlijeka dali na analizu (npr. moguće je da mljekar hrani životinju čistim kukuruzom, ali i domaćom stočnom hranom–mješavinom žitarica i kupovnom stočnom hranom, a na analizu je dao samo kukuruz ili kukuruz i samo jednu vrstu stočne hrane, a ne sve vrste hrane kojom hrani životinju i koja moguće sadrži detektabilne razine ZEN-a). ZEN je detektiran u 97% uzoraka mlijeka, i to u prosječnoj koncentraciji od 3 µg/L, što bi odgovaralo svega 18% TDI vrijednosti za ZEN za osobu prosječne tjelesne mase 70 kg (odnosno, osoba prosječne tjelesne mase 70 kg koja bi u danu popila 1 L mlijeka s područja središnje Hrvatske, u organizam bi unijela u prosjeku 18% od prihvatljivog dnevnog unosa ovog mikotoksina). Valja napomenuti da čak niti uzorak u kojemu je detektirana najveća količina ZEN-a (12 µg/L) ne sadrži količinu ZEN-a koja prelazi TDI vrijednost za navedeni mikotoksin.

6.3. Značajnost razlika u određenim količinama DON-a i ZEN-a

Utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između količina DON-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane. Statistički značajna razlika u količinama DON-a između svih prikupljenih uzoraka kukuruza i kupovne stočne hrane te kupovne i domaće stočne hrane utvrđena ($p > 0,05$).

Statistički značajna razlika u količini ZEN-a utvrđena je između svih prikupljenih uzoraka kukuruza i domaće stočne hrane te kupovne i domaće stočne hrane. Količine ZEN-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza i kupovne stočne hrane statistički značajno se ne razlikuju.

Utvrđena je statistički značajna razlika u detektiranim količinama DON-a u uzorcima kukuruza sjeveroistočno i južno od Zagreba, u količinama DON-a u uzorcima prikupljenima s područja Zagrebačke i Koprivničko-križevačke županije te u količinama DON-a u uzorcima domaće stočne hrane prikupljenima s područja Zagrebačke i Koprivničko-križevačke županije, dok statistički značajna razlika nije utvrđena između količina DON-a u uzorcima

kukuruzna i domaće stočne hrane sjeveroistočno od Zagreba, količina DON-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane s područja Varaždinske županije, količina DON-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane s područja Koprivničko-križevačke županije, količina DON-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane jugozapadno od Zagreba, količina DON-a u uzorcima kukuruza i kupovne stočne hrane jugozapadno od Zagreba te količina DON-a u uzorcima kupovne i domaće stočne hrane jugozapadno od Zagreba. Statistički se prema detektiranim količinama DON-a značajno ne razlikuju ni prikupljeni uzorci domaće stočne hrane s područja Zagrebačke i Koprivničko-križevačke županije, uzorci domaće stočne hrane prikupljeni s područja Zagrebačke i Varaždinske županije, uzorci kukuruza prikupljeni s područja Koprivničko-križevačke i Varaždinske županije te uzorci domaće stočne hrane prikupljeni s područja Koprivničko-križevačke i Varaždinske županije.

Temeljem provedenih t-testova, utvrđena je statistički značajna razlika između količina ZEN-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane sjeveroistočno od Zagreba, količina ZEN-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane s područja Varaždinske županije te količina ZEN-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane s područja Koprivničko-križevačke županije. Statistički značajna razlika nije utvrđena između količina ZEN-a u uzorcima kukuruza sjeveroistočno i južno od Zagreba, količina ZEN-a u uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane jugozapadno od Zagreba, količina ZEN-a u uzorcima kukuruza i kupovne stočne hrane jugozapadno od Zagreba, količina ZEN-a u uzorcima kupovne i domaće stočne hrane jugozapadno od Zagreba, količina ZEN-a u uzorcima kukuruza s područja Zagrebačke i Koprivničko-križevačke županije, količina ZEN-a u uzorcima domaće stočne hrane s područja Zagrebačke i Koprivničko-križevačke županije, količina ZEN-a u uzorcima kukuruza s područja Zagrebačke i Varaždinske županije, količina ZEN-a u uzorcima domaće stočne hrane s područja Zagrebačke i Varaždinske županije, količina ZEN-a u uzorcima kukuruza s područja Koprivničko-križevačke i Varaždinske županije te količina ZEN-a u uzorcima domaće stočne hrane s područja Koprivničko-križevačke i Varaždinske županije.

6.4. STOPA PRIJENOSA ZEN-a IZ STOČNE HRANE (KUKURUZA TE KUPOVNE I DOMAĆE STOČNE HRANE) U MLIJEKO („CARRY-OVER“ EFEKT)

Najmanja stopa prijenosa ZEN-a iz stočne hrane u mlijeko goveda iznosi 0,03%, a najveća 249,71%. Od 61 prikupljenog uzorka mlijeka iz kojih je bilo moguće izračunati stopu prijenosa, u njih 25 (41%) je stopa prijenosa manja od 1%, kao što je slučaj u brojnim sličnim

istraživanjima (Mirocha i sur., 1981; Galtier, 1998; Winkler i sur., 2015). Srednja stopa prijenosa ZEN-a iz stočne hrane u mlijeko određena u ovom istraživanju iznosi 15,84%. Mirocha i sur. su 1981. godine odredili stopu prijenosa ZEN-a i njegovih metabolita u mlijeko od 0,05%. Yiannikouris i Jouany (2002) izvijestili su o stopama prijenosa od 0,06%, 0,016% i 0,008%, ovisno o dozi unesenog toksina. Stope od 0,00625% i 1,924% procijenjene su u studijama drugih istraživača (Galtier, 1998). Winkler i suradnici (2015) su procijenili stopu prijenosa ZEN-a i metabolita u mlijeko na 0-0,008%. Čak 33% prikupljenih uzoraka mlijeka iz ovog istraživanja, čija je stopa prijenosa izrazito visoka (>10%) su isti oni uzorci za koje postoji sumnja da nisu prikupljeni svi uzorci hrane kojima je životinja hranjena, odnosno da mljekari nisu dostavili sve vrste hrane kojom hrane životinju čije su uzorke mlijeka dali na analizu.

6.5. KORELACIJA IZMEĐU ODREĐENIH KOLIČINA ZEN-a U MLIJEKU I UKUPNIH KOLIČINA U HRANI ZA ŽIVOTINJE

Iz grafičkog prikaza ovisnosti količine ZEN-a u prikupljenim uzorcima mlijeka i ukupne količine ZEN-a iz svih prikupljenih uzoraka hrane za životinje, odnosno prikaza korelacije između ta dva parametra (Slika 7), vidljivo je da korelacija među njima nije uspostavljena.

Budući da u ovom istraživanju DON u mlijeku nije detektiran, nije moguće prikazati dijagram ovisnosti količine DON-a u mlijeku o ukupnoj količini DON-a iz svih prikupljenih uzoraka hrane za životinje (kukuruz, domaća i kupovna stočna hrana).

7. ZAKLJUČCI

1. U gotovo svim uzorcima kukuruza, odnosno u njih 94% detektiran je DON, a u svega 45% uzoraka kukuruza ZEN. U svim analiziranim uzorcima kukuruza određene su razine DON-a manje od najvećih preporučenih, a 3% prikupljenih uzoraka kukuruza premašuje najveću preporučenu količinu ZEN-a u kukuruzu namijenjenom kao hrani za životinje.
2. U gotovoj stočnoj hrani određene su značajno veće razine DON-a i ZEN-a, nego u domaće pripremljenoj smjesi za životinje. U 38% prikupljenih uzoraka gotove krmne smjese detektirana je količina DON-a veća od najveće preporučene, dok najveću preporučenu količinu ZEN-a u gotovim krmnim smjesama premašuje 25% prikupljenih uzoraka kupovne stočne hrane.
3. U svim prikupljenim uzorcima domaće stočne detektiran je DON, a u 77% prikupljenih uzoraka domaće stočne hrane detektiran je ZEN.
4. Niti u jednom prikupljenom uzorku mlijeka nije detektiran DON, dok je ZEN detektiran u 97% uzoraka mlijeka, i to u rasponu od 1-12 $\mu\text{g/L}$. Srednja vrijednost koncentracije ZEN-a u mlijeku iznosi 3 $\mu\text{g/L}$, što bi odgovaralo svega 18% TDI vrijednosti za ZEN za osobu prosječne tjelesne mase 70 kg.
5. Statistički značajna razlika utvrđena je između količina DON-a u svim prikupljenim uzorcima kukuruza i domaće stočne hrane. Statistički značajna razlika u količini ZEN-a utvrđena je između svih prikupljenih uzoraka kukuruza i domaće stočne hrane te kupovne i domaće stočne hrane.
6. Stopa prijenosa ZEN-a iz stočne hrane u mlijeko određena je u rasponu od 0,03-249,71%, pri čemu je u 41% uzoraka mlijeka u kojima je ZEN detektiran, stopa njegova prijenosa iz stočne hrane manja od 1%. Srednja stopa prijenosa ZEN-a iz stočne hrane u mlijeko određena u ovom istraživanju iznosi 16%.
7. Nije utvrđena korelacija između količine ZEN-a u uzorcima mlijeka i prikupljene stočne hrane koju je životinja primala hranidbom.
8. Budući da DON nije određen niti u jednom prikupljenom uzorku mlijeka, a ZEN je u uzorcima mlijeka određen u prosječnoj količini koja odgovara svega 18% TDI, ovi mikotoksini uneseni mlijekom s područja Varaždinske, Koprivničko-križevačke i Zagrebačke županije ne predstavljaju rizik za zdravlje ljudi.

8. ZAHVALE

Prvenstveno se zahvaljujemo mentoricama doc. dr. sc. Jelki Pleadin i prof. dr. sc. Nadi Vahčić što su nam omogućile izradu i prijavu ovog rada za Rektorovu nagradu te time i stjecanje novih radnih iskustava prilikom njegove izrade.

Najljepše zahvaljujemo tehničarki Sandri Birin na angažmanu i strpljenju te pomoći i pruženim savjetima u provedbi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujemo se svim djelatnicima Laboratorija za analitičku kemiju u Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu na ugodnoj radnoj atmosferi i spremnosti za pomoć.

Zahvaljujemo se svim dragim ljudima koji su nam donirali ili pomogli prikupiti potrebne uzorke mlijeka i hrane za životinje.

Zahvaljujemo se svojim obiteljima i prijateljima na podršci!

9. POPIS LITERATURE

- Adams, R. S., Kephart, K. B., Ishler, V. A., Hutchinson, L. J., Roth, G. W. (1993) Mold and mycotoxin problems in livestock feeding. Department of dairy and animal science. www.das.psu.edu/teamdairy. Pristupljeno 10. veljače 2016.
- Alldrick, A. J., Hajšelová, M. (2004) U: *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. (Magan, N., Olsen, M. ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, England.
- Ashiq, S. (2014) Natural Occurrence of Mycotoxins in Food and Feed: Pakistan Perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **14**, 159-175.
- Balzer, I., Bogdanić, C., Mužić, S. (1977) Natural contamination of corn (*Zea mays*) with mycotoxins in Yugoslavia. *Ann. Nutr. Aliment.* **31**, 425-430.
- Barkai-Golan, R. (2008) *Alternaria* mycotoxins. U: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. (Barkai-Golan, R., Nachman, P., ured.), Academic Press, San Diego, CA, USA, str. 185–203.
- Binder, E.,M., Tan, L.,M., Chin, L.,J., Handl, J., Richard, J. (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Tech.* **137**, 265-282.
- Blüthgen, A., Hammer, P., & Teufel, P. (2004) Mycotoxins in milk production. Occurrence, relevance and possible minimization in the production chain feedsmilk. *Kieler Milchw. Forsch.* **56(4)**, 219–263.
- CAST (2003) Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report No. 139. Ames, IA.
- Cavret, S., Lecoer, S. (2006) Fusariotoxin transfer in animal. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 444-453.
- CEC, 2006. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union L.* **229**, 7–9.
- Charmley, E., Trenholm, H.L., Thompson, B.K. (1993) Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production and its composition. *J. Dairy Sci.* **76**, 3580-3587.

Chelkowski, J. (1998) *Fusarium* and mycotoxins. U: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. (Sinha, K. S. i Bhatnagar, D., ured.), New York, Marcel Dekker, str. 45–64.

Christensen, C. M., Miller, B. S., Johnston, J. A. (1992) Moisture and its measurement. U: *Storage of Cereal Grains and Their Products*. (Sauer, D. B., ured.), American Association of Cereal Chemist, Minnesota, str. 39–54.

Coffey, R., Cummins, E., Ward, S. (2009) Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food Control*. **20**, 239–249.

EC (2006) Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union L*. 234/35.

EC (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf. Pristupljeno 20. travnja 2016.

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* 2011;9(6):2197. [124 pp] doi:10.2903/j.efsa.2011.2197. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.

EFSA Scientific Committee; Guidance of selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 2012;10(3):2579. [32 pp] doi:10.2903/j.efsa.2012.2579. Available online: www.efsa.europa.eu.

Dänicke, S., Brezina, U. (2013) Kinetics and metabolism of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 58–75

Dänicke, S., Winkler J. (2015) Invited review: Diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food Chem. Toxicol.* **84**, 225-249.

Deshpande S.S. (1996) Enzyme immunoassays. From concept to product development. Chapman & Hall, New York.

D'Mello, J. P. F., Porter, J. K., Macdonald, A. M. C., Placinta, C. M. (1997) Fusarium mycotoxins. U: Handbook of Plant and Fungal Toxicants. (D'Mello, J.P.F., ured.), CRC Press, Boca Raton, FL, str. 287-301.

Döll, S., Dänicke, S. (2011) The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Prev. Vet. Med.* **102**, 132-145.

Domijan, A. M., Peraica, M., Jurjević, Ž., Ivić, D., Cvjetković, B. (2005) Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Add. Contam.* **22**, 677-680.

Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M. (2003) Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. *Eur. J. of Plant Pathol.* **109**, 755-768.

Dvorackova I. (1976) Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *Brit. Med. J.* **6011**, 691.

Đurišić, S., Lazić, S., Petrović, T., Savić-Jevđenić S., Lupuović, D. (2003) Immunoenzyme-ELISA diagnostics in veterinary medicine. *Vet. Glasnik.* **57**, 63-72.

EFSA (2004) Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* **39**, 1–27.

EFSA (2004) Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* **73**, 1–42.

EFSA (2005) Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to fumonisins as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* **235**, 1–32.

Engvall, E., Perlman, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* **8**, 871-874.

- Flannigan, B. (1991) Mycotoxins. U: Toxic Substances in Crop Plants. (D'Mello, J.P.F., Duffus, C.M., Duffus, J.H., ured.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, str. 226-257.
- Fries, G.F. (1996) A model to predict concentrations of lipophilic chemicals in growing pigs. *Chemosphere*. **32**, 443–451.
- Galtier, P. (1998) Biological fate of mycotoxins in animals. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*. **149**, 549–554.
- Glenn, A. E. (2007) Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim. Feed Sci. Tech.* **137**, 213-240.
- Grabarkiewicz-Szczesna, J., Foremska, E., Golinski, P. (1996) Distribution of trichothecene mycotoxins in maize ears infected with *F. graminearum* and *F. crookwellense*. *Mycotoxin Res.* **12**, 45-50.
- Hagler, W. M., Mirocha, C. J., Pathere, S. V., Behrens, J. C. (1979) Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* “*Gibosum*” in rice culture. *Appl. and Environ. Microb.* **37**, 849-853.
- HAH (2012) Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje. <http://www.hah.hr/pregled-upisnika/?preuzmi_misljenje=27>. Pristupljeno 19. travnja 2016.
- Han, Z., Nie, D., Ediage, E. N., Yang, X., Jianhua Wang, J., Chen, B., Li, S., On, S. L. W., De Saeger, S., Wu, A. (2014) Cumulative health risk assessment of co-occurring mycotoxins of deoxynivalenol and its acetyl derivatives in wheat and maize: Case study, Shanghai, China. *Food Chem. Toxicol.* **74**, 334–342.
- Harvey, R. B., Edrington, T. S., Kubena, L. F., Elissalde, M. H., Casper, H. H., Rottinghaus, G. E., Turk, J. R. (1996) Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat or their combination on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.* **57**, 1790-1794.
- Hietaniemi, V., Kumpulainen, J. (1991) Contents of *Fusarium* toxins in Finnish and imported grains and feeds. *Food Addit. Contam.* **8(2)**, 171-181.
- Hussein, S. H., Brasel, M. (2001) Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. **167**, 101-134.

Kabak, B., Dobson, A. D. W, Var, I. (2006) Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 593-619.

Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., Krstanović, V. (2011) Toksičnost *Fusarium* toksina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **6**, 112-116.

Keese, C., Meyer, U., Valenta, H., Schollenberger, M., Starke, A., Weber, I. A., Rehage, J., Breves, G., Dänicke, S. (2009) No carry over of unmetabolised deoxynivalenol in milk of dairy cows fed high concentrate proportions. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 1514–1529.

Köppen R., Koch M., Siegel D., Merkel S., Maul R., Nehls, I. (2010) Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1595-1612.

Kosalec, I, Pepeljnjak, S. (2004) Najznačajniji mikotoksini i mikotoksikoze. *Praxis Veterinaria.* **52**, 169-181.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., Watanabe, H. (1987) Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **7**, 253–306.

Lauren, D. R., Jensen, D. J., Smith, W. A., Dow, B. W., Sayer, S. T. (1996) Mycotoxins in New Zealand maize: a study of some factors influencing contamination levels in grain New Zealand. *J. Crop Hortic. Sci.* **24**, 13-20.

Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G. Sanchis, V. (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 218–237.

Miksicek, R. J. (1994) Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**, 153–60.

Mirocha, C. J., Pathre, S. V., Robison, T. S. (1981) Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet. Toxicol.* **19**, 25-30.

Mitak, M., Gojmerac, T., Pavičić, P., Topolko, S. (2001) Contamination of feedstuffs and animal feed mixtures for swine with zearalenon in the period from 1990 till 1999. *Veterinarska stanica.* **32**, 205-209.

Mitak, M., Zdravec, M., Karačić, V. (2002) Prirodna kontaminacija deoksinivalenolom (vomitoksinom) kukuruza roda 1999. godine. *Krmiva*. **2**, 77-79.

Nemanič, A., Brlek, V., Ramljak, D., Matešić, D. (1986) Incidence of mycotoxins in feeds and feed mashes for poultry and other domestic animals. U: Special publications: second symposium on mycotoxins. (Ožegović, L., ured.), Book LXXX, Academy of sciences and arts of Bosnia and Hercegovina, Sarajevo, str. 51-57.

Olsen, M., Pettersson, H., Kiessling, K.H. (1981) Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **48**, 157–161.

Orsi, R. B., Correa, B., Possi, C. R., Schammas, E. A., Nogueira, J. R., Dias, S. M. C., Malozzi, M. A. B. (2000) Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize, *J. Stored Products Res.* **36**, 75–87.

Ožegović, L., Pepeljnjak, S. (1995) Mikotoksikoze. Školska knjiga. Zagreb

Patel, P. (2004) Mycotoxin analysis: current and emerging technologies. U: Mycotoxins in food: Detection and Control. (Magan, N., Olsen, M., ured.), Woodhead publishing Ltd, Cambridge, England, str. 88-106.

Pepeljnjak, S., Balzer, I. (1982) A survey of mycological and mycotoxicological research on seeds in the nephropathic and anephropathic areas of Yugoslavia (Croatia). U: Special publications: symposium on mycotoxins. (Ožegović, L., ured.), Book LX, Academy of sciences and arts of Bosnia and Hercegovina, Sarajevo, str. 75-80.

Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z. (1986) Mycological and mycotoxicological contamination of grains in a wide anephropathic area of SR Croatia. U: Special publications: second symposium on mycotoxins. (Ožegović, L., ured.), Book LXXX, Academy of sciences and arts of Bosnia and Hercegovina, Sarajevo, str. 29-41.

Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Brlek, V. (1999) Storage fungi and mycotoxins in Croatian storages. U: Protection of stored agricultural products. (Korunić, Z., ured.), Korunić Press, Zagreb, str. 51-64.

- Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Šegvić Klarić M. (2008) Okratoksin A i zearalenon: kontaminacija žitarica i krmiva u hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. *Krmiva*. **3**, 147-159.
- Pepeljnjak, S., Čuturić, S. (1978) Review on the investigation of mycotoxins. *Vet. Arh.* **48**, 33-35.
- Pepeljnjak, S., Čuturić, S., Topolko, S., Munk, M. (1979) Factors of mycotoxin contamination of corn. *Krmiva*. **20 (5)**, 109-112.
- Pepeljnjak, S., Šegvić, M., Cvetnić, Z. (2002) Mycotoxicological contamination of stored agricultural products in Croatia (30-year review). U: Disinfection, disinfestation, deratization and protection of stored agricultural products. (Korunić, Z., ured.), Korunić Press, Zagreb, str. 97-110.
- Pepeljnjak, S., Ueno, Y., Tanaka, T. (1992) Mycological situation and occurrence of fusariotoxins in cereals from endemic nephropathy region in Croatia. *Microbiol. Aliment. Nutr.* **10**, 191-197.
- Peraica, M., Domijan, A. (2001) Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **52**, 23-35.
- Pitt, J. I., Basilico, J. C., Abarca, M. L., Lopez, C. (2000) Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med. Mycol.* **38**, 41-46.
- Pittet, A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds—an updated review. *Rev. Med. Vet.* **149**, 479-492.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Tech.* **78**, 21-37.
- Pleadin, J., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2015) Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. *Croat. J. Food Tech. Biotech. Nutr.* **10**, 6-13.
- Pleadin, J., Perši, N., Mitak, M., Zadavec, M., Sokolović, M., Vulić, A., Jaki, V., Brstilo, M. (2012a) The natural occurrence of T-2 toxin and fumonisins in maize samples in Croatia. *B. Environ. Contam. Tox.* **88**, 863-866.

Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., Zadavec, M., Jaki, V., Vulić, A. (2012b) Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*. **28**, 94-98.

Pleadin, J., Vahčić, N., Perši, N., Sevelj, D., Markov, K., Frece, J. (2013) Fusarium mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control*. **32**, 49-54.

Pleadin, J., Perši, N., Vulić, A., Zadavec, M. (2012c) Survey of mycotoxin contamination in Croatia. *Biotechnol. Anim. Husb.* **28** (2), 167-177.

Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2011) *Narodne novine* **78**, Zagreb (NN 78/11).

Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (2012) *Narodne novine* **3162**, Zagreb (NN 3162/12).

Prelusky, D. B., Rotter, B. A., Rotter, R. G. (1994) Toxicology of mycotoxins. U: Mycotoxins in Grain: Compounds Other Than Aflatoxins. (Miller, J. D., Trenholm, H. L., ured.), Eagen Press, St. Paul, str. 359-403.

Rheeder, J. P., Sydenham, E. W., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Shephard, G. S., Schlechter, M., Stockenstrom, S., Cronje, D. W., Viljoen, J. H. (1995) Fungal infestation and mycotoxin contamination of South African commercial maize harvested in 1989 and 1990. *S. Afr. J. Sci.* **91**, 127-131.

Rice, L.G., Ross, F.B. (1994) Methods for detection and quantitation of fumonisins in 1601 corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Protect.* **57**, 36-40.

Ruiz de Galarreta, J. I., Butrón, A. A., Ortiz-Barredo, A., Malvar, R. A., Ordás, A., Landa, A., Revilla, P. (2015) Mycotoxins in maize grains grown in organic and conventional agriculture. *Food Control*. **52**, 98-102.

Runje, M., Cvrtila, Ž. (2006) ELISA u analitici hrane. *Meso*. **7**, 92-94.

Ryu, J. C., Yang, J. S., Song, Y. S., Kwon, O. S., Park, J., Chang, I. M. (1996) Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* **13**, 333-341.

Schothorst, R. C., van Egmond, H. P. (2004) Report from SCOOP task 3.2.10 “Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states”. Subtask: Trichothecenes. *Toxicol. Lett.* **153**, 133-143.

Scientific Committee on Food (2000) Opinion of The Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins – Part 2: Zearalenone (expressed on 22 June 2000), <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf>. Pristupljeno 21. travnja 2016.

Scott, P. M. (1997) Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. *Food Addit. Contam.* **14**, 333-339.

Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., Jekel, A. A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E., Flachowsky, G. (2006) Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Addit. Contam.* **23**, 1008–1020.

Sforza S., Dall’Astra C., Marchelli R. (2006) Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 54-76.

Shane, S. H. (1994) Economic issues associated with aflatoxins. U: The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance. (Eaton, D.L., Groopman, J. D., ured.), Academic Press, San Diego, str. 513–527.

Smith, T. K., McMillan, E. G., Castillo, J. B. (1997) Effects of feeding blends of *Fusarium* Mycotoxin contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *J. Anim. Sci.* **75**, 2184-2191.

Sokolović, M., Šimpraga, B. (2006) Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography. *Food Control.* **17**, 733-740.

Srećec, S., Štefanec, J., Pleadin, J. Bauman, I. (2013) Decreasing deoxynivalenol concentration in maize within the production chain of animal feed. *Agro Food Ind. Hi. Tec.* **24(1)**, 62-64.

Sutton, J. C., Baliko, W., Funnell, H. S. (1980) Relation of weather variables to incidence of zearalenone in corn in Southern Ontario. *Can. J. Plant Sci.* **60**, 149–155.

Šegvić Klarić, M., Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Kosalec, I. (2009) Co-Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, Fumonisin and Zearalenone in Cereals And Feed, Determined by Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Thin-Layer Chromatography. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **60**, 427-434.

Šegvić Klarić, M., Pepeljnjak, S., Domijan, A. M., Petrik, J. (2007) Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **100**, 157–164.

Škrinjar, M., Žakula, R., Stojanović, E. (1986) Plesni i mikotoksini mleka i polutvrdog sira. *Mljekarstvo.* **36** (1), 3-11.

Uredba o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hani (2006) *Komisija EZ 1881*, Bruxelles (EZ 1881/2006).

Urry, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B., Hidy, P. H. (1966) The structure of zearalenone, *Tetrahedron Let.* **27**, 3109–3114.

Vasanthi S., Bhat, R. V. (1998) Mycotoxins in foods occurrence, health & economic significance & food control measures. *Ind. J. Med. Res.* **108**, 212–224.

Wang, D. S., Liang, Y. X., Iijima, K., Sugiura, Y., Tanaka, T., Chen, G., Yu, S. Z., Ueno, Y. (1995) Cocontamination of mycotoxins in corn harvested in Haimen, a high risk area of primary liver cancer in China. *Mycotoxins.* **41**, 67-70.

Whitlow, L. W., Diaz, D. E., Hopkins, B. A., Hagler, W. M. (2006) Mycotoxins and milk safety: the potential to block transfer to milk. <<http://en.engormix.com/MA-mycotoxins/articles/mycotoxins-milk-safety-potential-t199/p0.htm>>. Pristupljeno 13. veljače 2016.

Wilson, D. M, Abramson, D. (1992) Mycotoxins. U: *Storage of Cereal Grains and Their Products* (Sauer, D. B., ured.), St Paul, MN, American Association of Cereal Chemists, 341–391.

Winkler, J., Kersten, S., Valenta, H., Meyer, U., Engelhardt, G., Dänicke, S. (2015) Development of a multi-toxin method for investigating the carry-over of zearalenone,

deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. *Food Addit. Contam.* **32**, 371-380.

Yamashita, A., Yoshizawa, T., Aiura, Y., Sanchez, P. C., Dizon, E. I., Arim, R. H., Sardjono, E. (1995) *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol and zearalenone) and aflatoxins in corn from southeast Asia. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1804-1807.

Yiannikouris, A., Jouany, J. P. (2002) Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Anim. Res.* **51**, 81–89.

Yoshizawa, T., Takeda, H., Ohi, T. (1983) Structure of a Novel Metabolite from Deoxynivalenol, a Tricho-thecane Mycotoxin, in Animals. *Agric. Biol. Chem.* **47(9)**, 2133-2135.

10. SAŽETAK

Kontaminacija hrane za životinje deoksinivalenolom i zearalenonom i pripadajuće stope prijenosa istih u mlijeko

Dević Doroteja

Karača Sara

Fuzarijski mikotoksini predstavljaju jedne od najčešćih onečišćivača hrane i hrane za životinje, primarno žitarica i njihovih proizvoda. Onečišćenje hrane istima može uzrokovati brojne kronične i akutne toksične učinke u ljudi i životinja. U ovom su radu ELISA metodom određene razine fuzarijskih mikotoksina DON-a i ZEN-a u kukuruzu, domaćoj i kupovnoj stočnoj hrani te mlijeku iz tri županije Republike Hrvatske (Varaždinske, Koprivničko-križevačke i Zagrebačke), a zatim su te razine uspoređene s obzirom na podrijetlo hrane za životinje i mlijeka te s TDI vrijednošću i najvećim preporučenim količinama tih mikotoksina u hrani za životinje. Osim toga, izračunata je stopa prijenosa („carry-over“) DON-a i ZEN-a iz hrane za životinje kojom je govedo hranjeno, u mlijeko. Rezultati istraživanja ukazali su na prisutnost DON-a u 94%, a ZEN-a u 45% prikupljenih uzoraka kukuruza. U 38% prikupljenih uzoraka gotove krmne smjese određena je količina DON-a veća od najveće preporučene, dok najveću preporučenu količinu ZEN-a u gotovim krmnim smjesama premašuje 25% prikupljenih uzoraka kupovne stočne hrane. U svim prikupljenim uzorcima domaće stočne određen je DON, dok je ZEN određen u 77% uzoraka. Niti u jednom prikupljenom uzorku mlijeka nije određen DON, dok je ZEN određen u 97% uzoraka mlijeka, i to u srednjoj količini od 3 µg/kg, što bi odgovaralo svega 18% TDI za ZEN za osobu prosječne tjelesne mase 70 kg. Srednja stopa prijenosa ZEN-a iz hrane u mlijeko iznosi 16%, no 41% uzoraka mlijeka ima stopu prijenosa manju od 1%. Nije utvrđena korelacija između razine ZEN-a u mlijeku i prikupljenoj stočnoj hrani koju je govedo konzumiralo. Mogući štetan utjecaj ovih mikotoksina na ljudsko zdravlje prilikom konzumacije mlijeka s područja Varaždinske, Koprivničko-križevačke i Zagrebačke županije može se smatrati zanemarivim, čak i u slučaju njihovih povišenih količina u hrani za životinje (ukoliko se takva kontaminirana hrana koristi u hranidbi goveda za proizvodnju mlijeka).

Ključne riječi: deoksinivalenol, hrana za životinje, mlijeko, stopa prijenosa, zearalenon

11. SUMMARY

Deoxynivalenol and zearalenone contamination of feed and their corresponding transfer rates into the milk

Dević Doroteja

Karača Sara

Fusarium mycotoxins are one of the most common contaminants of food and feed, primarily cereals and their products. The contamination of food with *Fusarium* mycotoxins can cause many chronic and acute toxic effects in humans and animals. The purpose of this research was to determine the level of *Fusarium* mycotoxins zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON) in maize, home-prepared and store-bought feed and in milk from three Croatian counties (Varaždin, Koprivnica-Križevci and Zagreb) using the ELISA method and compare those levels (considering the origin of feed and milk) with the TDI („Tolerable Daily Intake“) value and with the maximum recommended values of those mycotoxines in animal feed. Furthermore, the carry-over rates of DON and ZEN from feed into the milk was calculated. The results of this research indicate the presence of DON in 94% and ZEN in 45% of the collected samples of maize. The level of DON in 38% of store-bought feed surpasses the maximum recommended level, while the level of ZEN is higher than the maximum recommended in 25% of the collected samples. All of the collected samples of home-prepared feed were positive for DON, while 77% of the samples contained detectable levels of ZEN. DON wasn't detected in any of the collected milk samples, while ZEN was found in 97% of the samples in the average concentration of 3 µg/kg, which is approximately 18% of TDI for a person of average body mass of 70 kg. The average carry-over rate of ZEN into the milk was 16%, but 41% of milk samples have the carry-over rate of less than 1%. The correlation between the levels of ZEN in the collected milk and feed samples hasn't been established. Possible adverse effects of these mycotoxins on human health while consuming the milk from three Croatian counties (Varaždin, Koprivnica-Križevci and Zagreb) can be considered negligible, even in the events of their elevated levels in animal feed (if such contaminated feed is used for feeding the cattle that produces the milk).

Key words: carry-over, deoxynivalenol, feed, milk, zearalenone

12. ŽIVOTOPISI AUTORA

Doroteja Dević rođena je 20. siječnja 1993. godine. Od tada živi u mjestu pokraj Koprivnice, Sokolovcu, gdje je 2007. godine završila osnovnu školu. Iste godine upisuje Gimnaziju „Fran Galović“, opći smjer u Koprivnici koju završava 2011. godine. Nakon završene gimnazije, 2011. godine upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, smjer nutricionizam, na kojemu 2014. godine stječe titulu Sveučilišne prvostupnice nutricionizma nakon završenog preddiplomskog studija. Trenutno pohađa 2. godinu diplomskog studija istog fakulteta. U slobodno vrijeme bavi se sportom i glazbom.

Sara Karača rođena je 20. kolovoza 1992. godine. Opću gimnaziju završila je u Jastrebarskom, gdje i živi. Nakon završetka opće gimnazije u Jastrebarskom, 2011. godine, upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer nutricionizam. 2014. godine stječe titulu Sveučilišne prvostupnice nutricionizma, nakon čega upisuje diplomski studij istog smjera. Trenutno pohađa 2. godinu diplomskog studija. U slobodno vrijeme volontira i bavi se sportom.