

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA
GYVULININKYSTĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS
MAISTO SAUGOS IR GYVŪNŲ HIGIENOS KATEDRA

Erika Lebedevaitė

**MIKOTOKSINŲ KAUPIMOSI KONCENTRUOTUOSE
PAŠARUOSE TYRIMŲ ANALIZĖ**

Magistro darbas

Darbo vadovas:

e. prof. p. dr. Bronius Bakutis

Kaunas, 2005 m.

(2- asis titulinis lapas)

Magistro darbas atliktas 2003- 2004 metais Lietuvos veterinarijos akademijos Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedroje, Mikotoksikologijos laboratorijoje.

Magistro darbą paruošė: Erika Lebedevaitė

(parašas)

Magistro darbo vadovas: e. prof. p. dr. Bronius Bakutis
(LVA Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedra)

(parašas)

Recenzentas: doc. dr. Zita Bartkevičiūtė
(LVA Gyvūnų mitybos katedra)

(parašas)

TURINYS

	Psl.
ĮVADAS	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1 Trumpa mikotoksikozijų tyrimo istorija	6
1.2 Grūdų mikrobiologinis užterštumas	8
1.2.1 Mikroskopiniai grybai- mikotoksinų producentai	8
1.2.2 Veiksniai, sąlygojantys mikroskopinių grybų augimą ir mikotoksinų produkavimą	9
1.2.3 Mikroskopinių grybų išskyrimas ir identifikavimas	14
1.2.4 Svarbiausios mikotoksinų grupės, jų charakteristika, paplitimas	15
1.2.4.1 Mikotoksinų poveikis organizmui	19
1.2.5 Leistinos mikotoksinų normos pašaruose	22
1.3 Būdai ir priemonės pašarams nuo mikotoksinų apsaugoti	24
1.3.1 Mikotoksinų produkavimo prevencija lauko sąlygomis ir sandėliuose	24
1.3.2 Pašarų detoksikavimo būdai ir priemonės	25
1.3.2.1 Pašarų detoksikavimo būdai prieš šeriant gyvulius	26
1.3.2.2 Pašarų detoksikavimo būdai gyvulių šėrimo metu	27
1.3.2.3 Kiti būdai ir priemonės, mažinančios mikotoksinų poveikį	28
1.4 Mikotoksinų nustatymo metodai	29
1.5 Mikrobiologinio ir mikotoksikologinio grūdų užterštumo profilaktika	31
2. DARBO ATLIKIMO VIETA IR METODIKA	32
3. TYRIMŲ REZULTATAI	36
4. IŠVADOS IR PASIŪLYMAI	48
5. LITERATŪROS SĄRAŠAS	49

ĮVADAS

Gyvulių sveikatai įtaką daro daugelis veiksnių. Svarbiausi jų - laikymo sąlygos, priežiūra ir pašarai. Pastaruoju metu, pasikeitus ūkininkavimo sąlygoms, suaktyvėjo mikroskopiniai grybai, kurie produkuoja, parazituojuant ant augalų, toksiškus gyvuliams ir žmonėms junginius- mikotoksinus. Jie labai neigiamai veikia organizmą: hepatotoksiškai, nefrotoksiškai, imunosupresyviai, citotoksiškai, estrogeniškai, kancerogeniškai, tad vis didesnis dėmesys skiriamas pakenktiems mikroorganizmų grūdams ir pašarams. Ypač susirūpinta gyvulių pašarų kokybe. Sandėliuojant pašarus būtina laikytis sanitarinių veterinarijos reikalavimų, kadangi grūduose gausu įvairių maisto medžiagų, sudarančių palankias sąlygas daugeliui mikroorganizmų plisti. Pavyzdžiui, dėl mikroskopinių grybų poveikio grūdai gali pradėti gesti. Ypatingai tai aktualu sandėliuojant pašarinius grūdus.

Subrendę varpinių javų grūdai neturi tvirto viršutinio sluoksnio ar tokių cheminių junginių, kurie apsaugotų grūdą nuo pažeidimo. Be to, dėl specifinių savybių ir savitos morfologinės sandaros grūdai labai greitai absorbuoja aplinkos drėgmę. Šie grūdų ypatumai sudaro palankias sąlygas mikroorganizmams santykinai greitai plisti.

Spartų mikroorganizmų dauginimąsi veikia ir palanki aplinkos temperatūra bei drėgmė. Šie abu veiksniai lemia ir grūdų pažeidimo mastą.

Kai kurie grūdus pažeidžiantys mikroskopiniai grybai gamina ir išskiria nuodingąsias medžiagas- mikotoksinus, kurių net mažas kiekis yra labai nuodingas. Mikotoksinų sintezė susijusi su mikroskopinių grybų gebėjimu adaptuotis prie įvairių aplinkos sąlygų ir mitybinių substratų. Plisdami šie grybai naudojami grūduose esančiomis maisto medžiagomis, o jų išskiriami mikotoksinai trikdo virškinamojo trakto funkcijas. Dėl to pablogėja maisto medžiagų pasisavinimas. Mikotoksinai taip pat gali sukelti žmonių ir gyvulių ligas- mikotoksikozes ar tapti vėžio priežastimi. Šiuo metu yra žinoma daugiau kaip 400 įvairių mikotoksinų, kurie įvairioms žinduolių rūšims turi toksišką poveikį. Dėl jų visuotinio išplitimo jie laikomi vienu iš svarbiausių žmogaus ir gyvulių sveikatos rizikos veiksnių.

Ne visuomet mikroskopiniais grybais užteršti grūdai yra toksiški. Tačiau mikotoksinai išlieka ilgam, nes yra stabilūs, net jei sunaikinamas grybas- producentas. Vienintelis patikimas būdas išvengti maistinių ir pašarinių grūdų užterštumo mikotoksinais- užkirsti kelią

mikroskopiniams grybams grūduose daugintis. Šiam tikslui taikomi skirtingi pašarų užterštumo mikroskopiniais grybais ir mikotoksinų kiekio bei toksiškumo nustatymo metodai.

Turi būti taikomos kompleksinės profilaktikos priemonės: tinkamas javų nuėmimo ir grūdų sandėliavimo sąlygos, fizikiniai bei cheminiai grūdų apdorojimo būdai (konservantai, detoksikuojantys preparatai). Tokios higieninės priemonės kaip fungistatiniai ir fungicidiniai preparatai gali veiksmingai nutraukti mikroskopinių grybų invaziją, tačiau jie neturi įtakos mikotoksinų koncentracijai, kuri būna susidariusi dar prieš vartojant fungistatinės ar fungicidinės priemonės.

Apžvelgiant mikroskopinių grybų ir mikotoksinų biologiją, akivaizdu, kad kasdienėje žemės ūkio praktikoje nėra vieningos strategijos, kuri perspėtų apie mikroskopinių grybų invaziją ir jų produkuojamus toksinus.

Darbo tikslas. Atlikti dviejų metų koncentruotųjų pašarų mikotoksikologinių tyrimų analizę, įvertinti cheminio konservanto CALPRONA NC panaudojimo galimybes.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti aflatoksino B₁, zearalenono, T-2 toksino ir deoksinivalenolo mikotoksinų kiekius pašaruose, panaudojant imunofermentinės analizės (IFA) ir plonasluoksnės chromatografijos metodus.
2. Nustatyti minimalius, maksimalius ir vidutinius lygius ištirtuose koncentruotuose pašaruose ir palyginti su normatyvais.
3. Palyginti dviejų metų mikotoksinų vertes koncentruotuose pašaruose.
4. Ištirti konservanto CALPRONA NC mikostatinį poveikį grūduose po derliaus nuėmimo.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 TRUMPA MIKOTOKSIKOZIŲ TYRIMO ISTORIJA

Terminas *mikotoksinas* yra kilęs iš graikų kalbos žodžių *mykes*- grybas ir *toxikon*- nuodai. Kol nežinota apie mikotoksinius kaip medžiagas, buvo manyta, kad susirgimus sukelia mikroorganizmai, nuodingi augalai.

Istoriniai šaltiniai byloja, kad viduramžiais nuo apsinuodijimo mikroorganizmais, augalų išskiriamomis medžiagomis mirdavo šimtai tūkstančių žmonių. Pirmoji atpažinta ir aprašyta mikotoksikozė buvo ergotizmas, kurį sukelia skalsių alkaloidai. Susirgimas charakterizuojamas kaip nekrotinis, sukeliantis gangreną. Masinis šios ligos protrūkis aprašytas 934 metais Limože (Prancūzija).

Fusarium genties grybai, kaip nežinomos ligos sukėlėjai, taip pat aprašomi viduramžiais.

Kita aprašyta masinė mikotoksikozė, pasireiškusi aktyviau negu ergotizmas, buvo alimentinė toksinė aleukija. Aprašyta daugybė jos simptomų: leukopenija, burnos ertmės, ryklės ir žarnyno pažeidimai, sepsis, hemoraginė diatezė, pakitimai kaulų čiulpuose. Masinis šio susirgimo pasireiškimas užfiksuotas Rusijoje, Antrojo pasaulinio karo metais, vartojant supelijusius grūdus. Apie 60 procentų susirgusiųjų mirdavo. Nustatyta, kad pagrindiniai ligos sukėlėjai buvo *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae* ir *Cladosporium epiphyllum*.

Po Antrojo pasaulinio karo Japonijoje buvo labai paplitusi intoksikacija, kurią sukėlė supeliję geltonos spalvos ryžiai. Pastebėta, kad valgant “geltonuosius ryžius”, žmonės ištikdavo vėmimo ir traukulių priepuoliai, vėliau- paralyžius. Žmonės mirdavo praėjus 1- 3 dienoms po pirmųjų ligos požymių. Toksinius pokyčius sukėlė *Penicillium* genties mikroskopinių grybų, dar vadinamų mikromicetų, gaminami toksinai.

Iki šio amžiaus šeštojo dešimtmečio buvo ir daugiau mikotoksikozių pasireiškimo atvejų, dažnai priskiriamų neaiškios kilmės susirgimams. Požiūris į šią problemą labai pasikeitė prasidėjus “kalakutų X susirgimui” Didžiojoje Britanijoje, kai per keletą mėnesių nugaišo daugiau kaip 100 tūkstančių kalakutų ir ančiukų. Buvo pradėta ieškoti ryšio tarp ligos sukėlėjo ir padarinių. Iki tol mikotoksikozės buvo laikomos neaiškios etiologijos infekcinėmis arba medžiagų apykaitos ligomis. Kalti buvo žemės riešutų miltai, kuriuos vartojo kaip baltymų šaltinį, atvežtą į Angliją iš Brazilijos. Iš jų išskirtas mikromicetas *Aspergillus flavus* ir buvo

įrodyta, kad kalakučiukų ir ančiukų gaisimo priežastis buvo mikotoksikozė, vėliau pavadinta aflatoksikoze.

Tyrinėjant aflatoksikozes, nustatyta daugelis kitų mikotoksikozių sukėlėjų. Mikotoksinai sukelia skirtingus pakitimus gyvūnų organizme: ūmų toksiškumą, mutageninius, kancerogeninius, estrogeninius efektus, pakeičia kraujo savybes (Bakutis, 2004).

1.2 GRŪDŲ MIKROBIOLOGINIS UŽTERŠTUMAS

1.2.1 Mikroskopiniai grybai- mikotoksinų producentai

Dėl gyvybinės mikroskopinių grybų veiklos gali susidaryti metabolitai, toksiški žmonėms ir gyvuliams (mikotoksinai), taip pat toksiškos mikroorganizmams medžiagos (antibiotikai). Žinoma apie 250 grybų rūšių, galinčių gaminti mikotoksinus (Bakutis, 2004).

Šiuo metu žinoma apie 400 grybų metabolitų, pasižyminčių toksiniu poveikiu organizmui. Mikotoksikozės- gyvulių, paukščių ir žuvų ligos, kuriomis susergama apsinuodijus pašaru, užterštu toksiškų grybų antriniais medžiagų apykaitos produktais- mikotoksinais. 1 lentelėje surašytos labiausiai paplitusios mikroskopinių grybų rūšys, gaminančios mikotoksinus.

1 lentelė. Svarbiausios mikotoksinų grupės ir jų producentai

MIKOTOKSINAI	PAGRINDINIAI PRODUCENTAI
Aflatoksinai	<i>Aspergillus flavus</i>
(B ₁ , B ₂ , G ₁ , M ₁ , M ₂)	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Ochratoksinai	<i>Penicillium verrucosum</i>
(A, B, C, D)	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Fuzariotoksinai	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Trichotecenai	<i>F. poae</i> , <i>F. avenaceum</i>
Zearalenonai	<i>F. equiseti</i> , <i>F. moniliformine</i>
Fuzarinai	<i>F. roseum</i> , <i>F. graminearum</i> ir kt.
Fumonizinais	<i>F. moniliformine</i>
Butenolidai	
Skalsių alkaloidai	<i>Claviceps purpurea</i>
> negu 40 alkaloidų	

Pastaruoju metu Lietuvoje paplitusių mikroskopinių grybų rūšių įvairovė pastebimai prasiplėtė, nes padažnėjo žmonių migracija, pagausėjo maisto, pašarų ir žemės ūkio produktų bei prekių importas.

Mikroskopinių grybų augimo charakteristikos gali ne visai koreliuoti su mikotoksinų gamyba. Kitaip tariant, kolonijų kiekis tam tikrame maisto produkte ar pašare yra patikimas rodiklis higienos kokybei įvertinti, tačiau jis neturi didelės reikšmės vertinant realų užterštumo mikotoksinais mastą (Bakutis, 2004).

1.2.2 Veiksniai, sąlygojantys mikroskopinių grybų augimą ir mikotoksinų gamybą

Jau lauko sąlygomis varpinių javų grūdai yra pažeidžiami mikroorganizmų. Užterštumo lygis tiesiogiai priklauso nuo oro sąlygų brendimo metu. Javai dažniausiai užkrečiami *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus* ir *Penicillium* mikroskopinių grybų gentimis (Harazim ir kt., 1998). Augalai yra jautresni mikroskopinių grybų invazijai. Veiksniai, didinantys augalų jautrumą yra stresas, kurį sukelia skersvėjai, pernelyg intensyvus laistymas, vabzdžių ir pesticidų poveikis. Gamtoje grybus- patogenus gali išplatinti vėjas, vanduo, vabzdžiai ir paukščiai. Kai kurie mikroskopiniai grybai savo sporas skleidžia didesniais kiekiais dienos metu, kai vėjas yra stipresnis ir oro temperatūra aukštesnė (Fitt ir kt., 1989). Antras svarbus patogeninių grybų išplitimo būdas yra vanduo. Mikroskopiniai grybai plinta vėjo nešamais lietaus lašeliais. Sporos vėjuotą lietingą dieną gali būti nuneštos apytikriai 7 metrus (Pedersen ir kt., 1994). Didžiuliai vandens lašai sujungia daug sporų ir tokiu būdu sąlygoja mikroskopinių grybų išplitimą. Kai lietaus lašai krenta ant žemės, jie suskyla į mažus lašelius ir jų judėjimo greitis tiesiogiai proporcingas jų dydžiui, kuriuose sporų skaičius lyginamas su santykinu aukščio ir atstumo nuotoliu nuo natūralaus vandens šaltinio (Jenkinson ir kt., 1994; Pedersen ir kt., 1994). *Fusarium* rūšys yra tipiškas pavyzdys grybų patogenų, plintančių vandeniui (Fitt ir kt., 1989).

Augalų patogenai gali būti taip pat išnešiojami vabzdžių, erkių. Vabzdžiai gali išnešioti grybų sporas ant augalų, o taip pat nuo vieno augalo ant kito. Dažnai lipnios grybų sporos prilimpa prie vabzdžių, kai jie juda užkrėstu augalu (Agrios, 1997). Kanadiečių mokslininkai aptiko *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. graminearum* ir kitas *Fusarium* rūšių sporas ant vikšrų, rastų dirvožemyje ant augalų šaknų (*Diabotrica* spp.), boružių (*Epilachna* spp.) ir spragių (*Glisochrochlius quadrisignatus*) (Miller ir kt., 1998).

Mikroskopinių grybų plitimo intensyvumas priklauso nuo dirvožemio pH bei sudėties. Labiau *Fusarium* grybais užsikrečiama, kai dirvožemio pH yra 5- 6 ir kai dirvožemyje yra daugiau kalio, rečiau- derlingose žemumose, prie upių (Bakutis, 2004).

Taip pat mikroskopinių grybų išplitimui įtakoja besikeičiančios agrocheminės technologijos: sėjomainų nepaisymas, užsitęsusi sėja, šiaudų smulkinimas ir palikimas laukuose, dirvos įdirbimo pasikeitimas, augimo reguliatorių panaudojimas, padidintas tręšimas azotu ir t. t. (Baterman ir kt., 1998; Dill- Macky ir kt., 2000; Henriksen, 1999; Henriksen, 2000). Kviečių varpų fuzariozės laipsnis yra didesnis lyginant su miežių, jeigu kviečiai yra sėjami po kviečių ir

yra mažesnis, jeigu kviečiai sėjami po sojos pupelių (Dill- Macky ir kt., 2000). Piktžolių kontrolė sumažina javų užterštumą *Fusarium* genties mikroskopiniais grybais. Tai geriausiai pasiekama, nors plačiai paplitusios piktžolės ir dobilai yra kaip alternatyva daugybės *Fusarium* rūšių išplitimui, kuris sukelia javų šaknų puvinį ir varpų fuzariozę (Hörberg ir kt., 2000).

Italų mokslininkai nurodė, kad *Fusarium* konidijų kiekis augalų viduje ir išorėje padidėja, esant didesniai lietingų dienų skaičiui (Rossi ir kt., 2000). Kai javai apdulkinimo metu veikiami drėgmės ar kritulių, dažniausiai padidėja varpų užsikrėtimas *F. culmorum* ir *F. avenaceum* (Parry ir kt., 1995; Henriksen ir kt., 2000).

Ant augalo mikroskopinių grybų rūšių išsidėstymas yra skirtingas: *F. poae* daugiausiai išskiriamas iš varpos ir aukštesniųjų augalų dalių ir tik kelis kartus aptiktas ant stiebo pagrindo ir lapų (Polley ir kt., 1995; Jennings ir kt., 2000). *F. culmorum* ir *F. avenaceum* aptinkamas ant augalų viršūnių, kai anksti pavasarį užkrečiamas stiebo pagrindas, augalams augant, kyla aukštyn ir užkrečia varpą žydėjimo metu (Polley ir kt., 1995; Hall ir kt., 1998; Henriksen ir kt., 2000). Pirmiausiai užsikrečia apatiniai lapai, o vėliau, augalui augant, kyla užkratas aukštyn (Zinkernagel ir kt., 1997).

Viename grame ką tik iškultų grūdų gali būti iki 6000 tūkstančių bakterijų ir iki 80 tūkstančių mikroskopinių grybų sporų. Gamtoje (dirvoje, vandenyje, mėšle) išplitusios įvairios bakterijos. *E. coli*, *Cl. Perfringes*, *Salmonella spp.* randamos ir ant augalų (Bakutis ir kt., 2000).

Sandėliuojant grūdus pradeda vystytis taip vadinama sandėlių mikroflora. Ima vyrėti *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* genčių grybai (Langseth ir kt., 1996). Susidarius palankioms sąlygoms grybai ir bakterijos gali vystytis ir bloginti grūdų kokybę (Abramson, 1997).

Pagrindiniai veiksniai, darantys įtaką mikroskopinių grybų augimui, yra temperatūra, substrato savybės (vandens aktyvumas, cheminė sudėtis), pH, šviesa, klimato sąlygos (Abramson, 1997).

Daugelio tyrimų duomenimis įrodyta, kad mikromicetų augimui ir toksinų produkavimui įtakoja substrato cheminė sudėtis. Įtakai įrodyti sukurta nemažai sintetinių ir pusiau sintetinių terpių. Labai svarbus terpėje yra anglies (C) ir azoto (N) santykis. Šiuos mikotoksinų produkavimo veiksnius pateikė Hohenheimo universiteto profesorius W. Drochner (1998) (2 lentelė).

2 lentelė. Mikotoksinų produkavimo sąlygos (pagal W. Drochner)

PAGRINDINIAI PRODUCENTAI	LAUKŲ GRYBAI		SANDĖLIŲ GRYBAI	
	Pvz., <i>Fusarium</i> genties <i>F. roseum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. tricinetum</i> , <i>F. moniliforme</i> ir kt.		Pvz., <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> genties <i>A. parasiticus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. viridicatum</i>	
Mikotoksinai	Zearalenonas	Trichotecenai	Aflatoksinai	Ochratoksinai
Optimali toksino produkavimo Emperatūra, °C	25	8- 25	27- 30	16
Optimali sub- strato drėgmė, %	15,5	20	18	17,6
Aktyvuojantys veiksniai:				
angliavandeniai	+	+	++	++
N- kiekis	+	+	++	++

Anksčiau manyta, kad grybai yra aerobai. Pastaruoju metu nustatyta, kad grybai gali augti net anaerobinėmis sąlygomis. Jų augimas priklauso ir nuo aplinkos dujų sudėties.

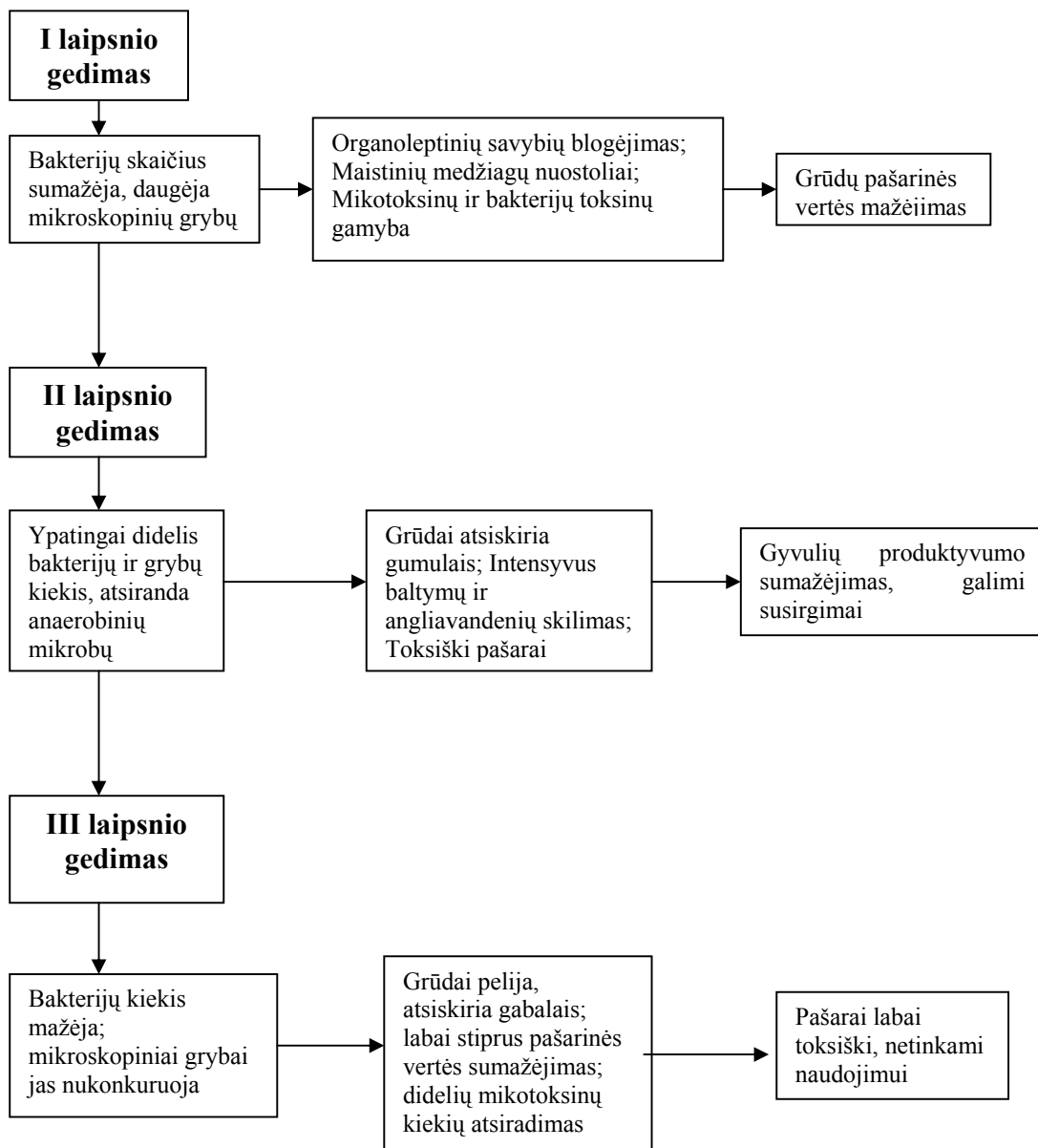
Mikroorganizmų kiekis grūduose priklauso nuo pradinio aruodų užterštumo, deguonies ir anglies dvideginio santykio aruode, konservavimo, džiovavimo, temperatūros, santykinės drėgmės, saugojimo laiko, grūdų ventiliacijos, saugyklos higienos bei grūdų kokybės (1 schema) (Bakutis, 2004).

1 schema. Veiksniai, įtakojantys grūdų gedimą



Grūdų kokybė priklauso ne tik nuo nuėmimo technologijos ir grūdų laikymo būdo, bet ir nuo mikrobiologinių procesų, kurie vyksta pačiame grūde. Grūdų gedimą sutartinai galima skirti tris laipsnius (2 schema) (Bakutis, 2004).

2 **schema.** Grūdų gedimo laipsniai



I laipsnio gedimas. Grūdų paviršiuje atsiranda saprofitiniai kokai ir sporinės bakterijos. Jų kiekis viename pašaro grame neviršija milijono. Mielių nerandama. Dažniausiai aptinkami *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių mikroskopiniai grybai. Intensyviai didėjant mikroskopinių grybų kiekiui, bakterijų mažėja, nes grybai bakterijas veikia toksiškai.

II laipsnio gedimas. Bakterijų ir grybų itin daug. Kartu su saprofitiniais kokais atsiranda anaerobinių mikrobu. Pašarai intensyviai pelija, tarp mikroskopinių grybų vyrauja *Penicillium* ir *Aspergillus* gentys. Jų kiekis viename pašaro grame priartėja iki vieno milijono. Jei grybai smarkiai pažeidžia pašarus, jie tampa nuodingi. Šeriamiems tokiu pašaru gyvuliams pasireiškia anafilaksija ir medžiagų apykaitos sutrikimai, taip pat gali atsirasti hemoraginis sindromas, žinomas kaip Moldy Corn.

III laipsnio gedimas. Pašarų sugedimo laipsnis pasiekia maksimalią ribą. Bakterijų kiekis mažėja. Irstant grūdams susidaro H₂S ir NH₃ dujos. Toks pašaras netinkamas šerti (Baliukonienė, 2005).

Sugedusio pašaro padariniai gali būti labai įvairūs: nuo juslinio pašarų pakitimo iki gyvuliams sukeltų pavojingų susirgimų (3 lentelė) (Baliukonienė, 2005).

3 lentelė. Sugedusio pašaro padariniai

Bendrieji	Poveikis
Pasikeitęs kvapas, skonis, struktūra	Sumažėjęs apetitas
Pašaro medžiagų nuostoliai	Blogiau sunaudojamas pašaras
Pašaro medžiagų cheminės struktūros pokyčiai	Intoksikacijos
Išskirtiniai	
Padidėjęs užkrėtimas:	Sumažėjęs apetitas
kenkėjais (erkėmis, vabalais)	Gleivinės dirginimas
Bakterijomis	Infekcijos, alergijos
mielėmis	Intestinalinė dujų gamyba
Mikroskopiniais grybais	Mikozės, alergijos
Toksinais	Mikotoksikozės
Fermentais	Intoksikacijos; sumažėjusi pašaro konversija

Tolesni neigiami veiksniai, įtakojantys mikroskopinių grybų augimą, yra žemės ūkio kenkėjai. Įvairūs vabzdžiai, pažeisdami grūdus, tarsi atidaro kelią mikroskopinių grybų užterštumui plisti (Muir, 1998).

1.2.3 Mikroskopinių grybų išskyrimas ir identifikavimas

Vienu iš labai aktyvių biocenozė komponentų yra mikroskopiniai grybai, kurie įeina į kiekvienos ekosistemos heterotrofinę bloką, todėl jie plačiai paplitę. Jie lengvai prisitaiko prie kintančių aplinkos sąlygų, kolonizuoja bei asimiliuoja daugel substratų (Lugauskas, 2002).

Kai grūdai būna užteršti mikroskopiniais grybais, ant grūdų matomas micelis ar tamsios dėmės. Labai svarbu nustatyti pašarų arba maisto produktų užterštumą mikroskopiniais grybais, nustatyti jų kiekį, rūšinę sudėtį. Pagal tai galima orientuotis, kokie mikotoksinai galėtų būti randami tiriamajame objekte. Tai palengvina brangiai kainuojančią mikotoksinų nustatymo diagnostiką (Eriksen, 1998).

Tradicinis mikroskopinių grybų išskyrimas ir identifikavimas yra atliekamas auginant išskirtus mikroskopinius grybus ant skirtingų dirbtinių terpių, identifikuojant pagal specifinius morfologinius požymius ir taip pat laukuose aptinkant juos ant augalų. Greičiausiai mikotoksinai nustatomi polimerazine grandinine reakcija (PGR) (Schilling, 1996; Parry ir kt., 1996).

Bendrai nustatant mikroskopinių grybų kolonijų ypatumus, vertinamas jų dydis, išvaizda, paviršiaus lygumas, micelio tankumas, spalva, zoniškumas, kvapas, kolonijos apatinės pusės spalva ir t. t. Mikroskopuojant analizuojama ne tik grybo struktūra, bet pagal hifų bei micelio fragmentus galima spręsti apie grybo rūšį (Lugauskas ir kt., 1997; Samson ir kt., 1988).

Kiekybinį pašarų užsikrėtimą mikroskopiniais grybais galimas nustatyti skiedimo metodu (Курасова, 1971).

Siekiant išaiškinti grūdų paviršiuje esančius mikroskopinius grybus ir nustatyti jų pradų kiekį, naudojamas modifikuotas nuoplovų fiziologiniu tirpalu metodas (Смирнова, 1989).

Pirmi sėklų užsikrėtimo požymiai yra įvairūs pakenkimai ant sėklų paviršiaus, įtakojantys augalų augimo sulėtėjimą ir galiausiai augalų žūtį. Išgyvenus javų daigams, jie būna sulipę, apraizgyti grybų miceliu (ypač *Fusarium*), ant jų vėliau pradeda vystytis dėmėtasis puvinys. Puvinio požymiai yra pakenkimai ant stiebo pagrindo, kuris gali tapti juodas ar negyvas. Šie požymiai yra ne specifiniai rūšims ir gali būti klaidinami *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera teres*, *D. tritici-repentis*, *Pseudocercospora herpotrichoides* (Rossi ir kt., 2000). Ant lapų, jų prisegimo vietose, pastebimos tamsios dėmės (Parry ir kt., 1994). Kai liga progresuoja, lapai tampa tamsūs ir galiausiai žūva (Henriksen ir kt., 2000).

Jeigu mikroskopinių grybų sporos patenka ant javų varpų, grybai gali toliau vystytis. Varpų užsikrėtimą parodo mažos dėmės, kurios susidaro šalia sporų. Tai infekcijos metu varpos lieka tuščios ar grūdai būna maži, raukšlėti (Parry kt., 1994).

Mikroskopiniai grybai yra heterotrofiniai organizmai, kurie skirstomi į saprofitus ir patogenus. Saprofitai mitybai naudoja nesudėtingas organines medžiagas ir gali gyventi be gyvo organizmo. Patogeniniai grybai savo gyvybiniais poreikiais naudoja gyvo organizmo maisto medžiagas. Tačiau toks skirstymas yra sąlyginis. Esant atitinkamoms sąlygoms, kai kurios saprofitų rūšys gali tapti patogeninėmis ir pažeisti gyvą organizmą (Baliukonienė, 2005).

Pagal šiuolaikinę klasifikaciją (Lugauskas ir kt., 2002) dauguma toksiškų ir patogeniškų rūšių grybų priskiriami mitosporiniams grybams (*Deuteromycotina*, *Deuteromyces*, *Fungi imperfecti*, nelytiniu-vegetatyviniu būdu besidauginantys grybai).

1.2.4 Svarbiausios mikotoksinų grupės, jų charakteristika, paplitimas

Šiuo metu yra žinoma virš 400 įvairių mikotoksinų, kurie toksiškai veikia įvairias gyvūnų rūšis. Dėl visuotinio paplitimo jie laikomi vienu iš svarbiausių žmogaus ir gyvulių sveikatos rizikos veiksnių (PSO 1998/1999).

Kadangi mikotoksinų įvairovė didelė, nagrinėjant jų poveikį organizmui išskiriamos pavojingiausių ir labiausiai išplitusių mikotoksinų grupės. Vidurio ir Šiaurės Europos kraštu pašaruose ir maisto produktuose labiausiai paplitę šie mikotoksinai: trichotecenai, zearalenonas, fumozinai, ochratoksinai, aflatoksinai.

Mikotoksinai traktuojami kaip antriniai mikroskopinių grybų medžiagų apykaitos metabolitai. Mikotoksinai trikdo žmonių sveikatą, sukelia gyvulių ligas arba sumažina jų produktyvumą, todėl gyvulininkystė patiria ekonominių nuostolių (Baliukonienė, 2005).

Labai įvairi mikotoksinų cheminė struktūra apsprendžia patologinių procesų įvairiapusiškumą (4 lentelė).

4 lentelė. Pagrindinių mikotoksinų cheminiai junginiai

CHEMINĖ SANDARA	PAVYZDŽIAI
Peptidai	Gliatoksinas, islanditoksinas
Alkaloidai	Klavicepsalkaloidai
Kumarinai	Ochratoksinai, aflatoksinai
12, 13- epoksi- trichotecenai	T- 2 toksinas, diacetokscirpenolas, nivalenolas, deoksinivalenolas

Mikotoksinų poveikis žmonėms ir gyvuliams gali būti tiesioginis ir netiesioginis. Tiesioginis pasireiškia tada, kai mitybos grandinėje dalyvauja produktas, kuriame vyksta mikotoksinų gamyba: sulėtėja augimas, susilpnėja imunitetas, sumažėja atsparumas infekcijai, sumažėja produktyvumas, randasi augliai ir pan. Ūmiu mikotoksikozės atveju, suvartojus didelį mikotoksinų kiekį, gyvuliai ar paukščiai neretai nugaišta.

Netiesioginis mikotoksinų poveikis pasireiškia tada, kai valgoma mikotoksinais užkrėsta maista (pieną, mėsą, kiaušinius). Kitaip tariant, mikotoksinai gaunami per tarpinius organizmus.

Gyvulių jautrumas mikotoksinams priklauso nuo amžiaus, lyties ir mitybos. Įvairūs toksinų kiekiai skirtingai veikia organizmą. Poveikis priklauso nuo daugelio rizikos veiksnių: toksinų kiekio, pašaro laikymo sąlygų, patalpų mikroklimato ir kt. (Pavilionis ir kt., 2000).

Tačiau neįmanoma reikalauti, kad žemės ūkio produktuose visiškai nebūtų mikotoksinų, kadangi žaliavos gali būti užterštos augalams augant, derliaus nuėmimo metu, juos transportuojant. Didelis žemės ūkio žaliavų užterštumas stebimas tose šalyse, kur nėra pakankamai išvystyta augalų auginimo sistema ir derliaus apdorojimo technologijos, kurios apsaugo nuo mikroskopinių grybų augimo ir mikotoksinų gamybos (Smith ir kt., 1994).

Pietų ir Vidurio Europoje išaugintuose grūduose vyrauja *Fusarium* genties produkuojami toksinai. Trichotecenai vyrauja grūduose- kviečiuose, miežiuose, avižose, kukurūzuose. Deoksinivalenolas (DON) yra dažniausiai aptinkamas mikotoksinas pasaulyje. Juo užteršti grūdai (apie 50 %) randami Europoje, Šiaurės ir Pietų Amerikoje, Pietų Afrikoje ir Naujojoje Zelandijoje. Šio toksino kiekis siekia 1- 67000 µg/kg (5 lentelė) (Placinta ir kt., 1999).

5 lentelė. Vidutinis mikotoksinų DON, nivalenolas (NIV), HT- 2, T- 2 kiekis Europoje augintuose javuose per 10 metų (1987- 1997) pagal H. Pettersson

Mikotoksinai	Javai	Mėginių skaičius	Rasta teigiamų	Vidutinė koncentracija, $\mu\text{g/kg}$ arba ppb
DON	Miežiai	3004	54	164
	Avižos	3142	66	201
	Rugiai	185	64	51
	Kviečiai	3371	50	233
NIV	Miežiai	817	20	74
	Avižos	1100	29	260
	Rugiai	110	8	19
	Kviečiai	1632	18	46
HT- 2	Miežiai	589	14	66
	Avižos	966	30	103
	Rugiai	129	2	17
	Kviečiai	1265	2	19
T- 2	Miežiai	736	8	96
	Avižos	1127	22	78
	Rugiai	203	7	34
	Kviečiai	1820	4	70

Iš atliktų tyrimų galima spręsti, kad fuzariotoksinų daugiausia randama Vidurio Europoje išaugintuose javuose. Daugiausia buvo rasta DON, todėl manoma, kad Vidurio Europos sąlygoms pavojingiausias būtent šis fuzariotoksinas.

Mikotoksinai Lietuvoje naudojamuose pašaruose detalai tyrinėti tik paskutinį dešimtmetį. Iki tol neturėta duomenų apie jų išplitimą ir gausą. Dažniausiai aptinkami ochratoksinai ir fuzariotoksinai, ypač dažnai- trichotecenai, zearalenonas. Mūsų šalyje mikotoksinų tyrimai atliekami nustatant jų kiekį paruoštuose pašaruose ir pašarų žaliavose. 2000- 2002 metais tirtas mikotoksinų (DON, zearalenono, aflatoksinų) kiekis kombinuotuose pašaruose, žieminių ir vasarinių kultūrų grūduose- atskirais atvejais (6 lentelė) (Bakutis, 2004).

6 lentelė. 2000- 2002 Lietuvoje tirtų mikotoksinų kiekis pašaruose

	2000 m.	2001 m.	2002 m.
Kombinuotieji pašarai			
Ištirta mėginių	21	70	96
Deoksinivalenolo kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,25	0,10	0,05
Maksimalus	1,50	2,20	3,50
Vidutinis	0,62	0,60	0,56
Zearalenono kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,25	0,05	0,05
Maksimalus	2,20	1,50	4,90
Vidutinis	0,77	0,36	0,61
Aflatoksino kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,0025	0,0020	0,0010
Maksimalus	0,0300	0,0800	0,0800
Vidutinis	0,0090	0,0107	0,0070
Žieminių kultūrų grūdai			
Ištirta mėginių	18	30	27
Deoksinivalenono kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,20	0,10	0,04
Maksimalus	1,37	0,60	0,65
Vidutinis	0,62	0,34	0,27
Zearalenono kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,10	0,05	0,025
Maksimalus	0,40	0,50	0,50
Vidutinis	0,11	0,19	0,16
Aflatoksino kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,0010	0,0015	0,0010
Maksimalus	0,0025	0,0060	0,0080
Vidutinis	0,0019	0,0026	0,0036
Vasarinių kultūrų grūdai			
Ištirta mėginių	10	22	18
Deoksinivalenolo kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,30	0,10	0,15
Maksimalus	1,00	1,50	0,80
Vidutinis	0,56	0,43	0,47
Zearalenono kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0,01	0,05	0,025
Maksimalus	0,40	0,45	0,20
Vidutinis	0,25	0,20	0,12
Aflatoksino kiekis, mg/kg (ppm)			
Minimalus	0	0,0010	0,0010
Maksimalus	0	0,0055	0,0075
Vidutinis	0	0,0029	0,0034

2000 metais kombinuotuose pašaruose vidutinė DON koncentracija buvo 0,44 ppm, ZON- 0,7 ppm ir aflatoksinų- 0,0090 ppm. Žieminių kultūrų grūduose vidutinė DON koncentracija buvo 0,39 ppm, ZON- 0,70 ppm, aflatoksinų- 0,0030 ppm. Vasarinių kultūrų grūduose vidutinė DON koncentracija buvo 0,51 ppm, ZON- 0,10 ppm, aflatoksinų buvo mažiau nustatytos leistinos normos.

2001 metais kombinuotuose pašaruose vidutinė DON koncentracija buvo 0,57 ppm, ZON- 0,34 ppm, aflatoksinų- 0,0091 ppm. Žieminių kultūrų grūduose vidutinė DON koncentracija buvo 0,24 ppm, ZON- 0,17 ppm, aflatoksinų- 0,0091 ppm. Vasarinių kultūrų grūduose vidutinė DON koncentracija buvo 0,37 ppm, ZON- 0,14 ppm, aflatoksinų- 0,0039 ppm.

2002 metais kombinuotuose pašaruose vidutinė DON koncentracija buvo 0,56 ppm, ZON- 0,59 ppm, aflatoksinų- 0,0063 ppm. Žieminių kultūrų grūduose vidutinė DON koncentracija buvo 0,25 ppm, ZON- 0,12 ppm, aflatoksinų- 0,0022 ppm. Vasarinių kultūrų grūduose DON koncentracija buvo 0,46 ppm, ZON- 0,09 ppm, aflatoksinų- 0,0021 ppm.

Jei maksimali aflatoksinų koncentracija 2000- 2002 metais viršijo leistiną normą, tai gana dažnai ypač DON, ZON kiekis viršijo nacionaliniame standarte numatytas ribas. Maksimali ZON koncentracija atskirais metais svyravo nuo 1,50 iki 4,90 ppm. Maksimalus DON kiekis svyravo nuo 1,50 iki 3,50 ppm (Bakutis, 2004).

1.2.4.1 Mikotoksinų poveikis organizmui

Mikotoksinų įvairovė yra labai didelė, todėl, nagrinėjant jų poveikį organizmui, išskiriamos pavojingiausių ir labiausiai išplitusių mikotoksinų grupės. Vidurio ir Šiaurės Europos kraštu pašaruose ir maisto produktuose labiausiai paplitę trichotecenai, zearalenonas, fumozinai, ochratoksinai, aflatoksinai.

Trichotecenai yra labai citotoksiški, veikia aminorūgščių ir baltymų sintezę. Ūmi jų intoksikacija dažniausiai pasireiškia šiais požymiais:

- hemoragijomis, edemomis, odos nekrozėmis;
- vėmimu, viduriavimu;
- pakraujavimais skrandžio, plonųjų žarnų epitelyje;
- hematopoetinės sistemos pažeidimu;

- sumažėjusių leukocitų ir trombocitų skaičiumi kraujyje;
- hemoragijomis meninginiuose dangaluose;
- nerviniais sutrikimais;
- apetito stoka; (Prelusky ir kt., 1994).

Trichotecenai skirstomi į keturias grupes:

1. A (T- 2, HT- 2, DAS, neozolaniolas, T- 2 tetraolas ir kt.);
2. B (DON, nivalenolas, fuzarenonas X);
3. C (krotocinas);
4. D (verukarinas);

DON jautriausios kiaulės, po to seka paukščiai, galvijai. Ilgą laiką šeriant kiaules pašaru, kuriame yra 1,2- 3,6 mg/kg (ppm) DON, kepenyse, širdyje, inkstuose, blužnyje yra nustatoma 23 µg/kg DON (Prelusky ir kt., 1994).

DON patekęs į organizmą, net nedidelėmis dozėmis 0,75- 1,5 mg/kg (ppm), sumažina ir organizmo imuninį atsaką, pablogėja imuniteto prieš patogeninį agentą susidarymo galimybes (Rotter ir kt., 1996).

Net mažos trichotecenų koncentracijos veikia imunosupresyviai. Lesinant viščiukus DON paveiktais lesalais, sukeliama kraujodaros ir imuninės sistemos pažeidimai (Prelusky ir kt., 1987).

T- 2 toksinas slopina proteinų sintezę, DNR ir RNR sintezę, lipidų oksidaciją, veikia ląstelių membranas, stabdo mitochondrijų elektroninę transportavimo sistemą mielėse. T- 2 ir kiti trichotecenai didina interleukinų gamybą makrofaguose ir leukocituose (Pestka ir kt., 1994).

Tačiau iki šiol daugelis laboratorijų nustato tik atskirus trichotecenus, jų kiekio nesumuoja, todėl rekomenduojamos (leisinos) koncentracijos pašaruose nustatomos tik atskiriems mikotoksinams (Porcher ir kt., 1987).

ZON pagrindinis biologinis poveikis- sutrikdo reprodukcinę organizmo veiklą. ZON sukelia estrogenams panašų sindromą, kuris pasireiškia abiejų lyčių pieno liaukų padidėjimu bei vulvos pabrinkimu, vulvovaginitu, progresuojančiu iki makšties iškritimo kiaulaitėms. Kuiliams gali atrofotis sėklidės, pablogėti spermos kokybė ir kiekis (Kupier- Goodman, 1990).

Bandymų metu pastebėta, kad ką tik gimusieji paršeliai susiduria su ZON per motinos pieną, šlapimą, pakratus, paršavedės pašaro likučius. Tiriant ZON įtaką galvijams nustatyta, kad sumažėja karvių apvaisinimas jas dirbtinai sėklinant (Krogh ir kt., 1995).

Paukščiai ZON mažiau jautrūs. Lesinant lesalus, turinčius 300- 800 ppm ZON, po 4 dienų pastebėtas Fabricijaus bursos padidėjimas, kiaušlatakų, kloakos pabrinkimas (Mirocha, 1983).

Pašaro užteršimo fumoziniais klinikiniai požymiai labai įvairūs ir priklauso nuo gyvulio rūšies. Arkliams (ir kitiems kanopiniams) fumozinas FB₁ sukelia encefalomalaciją, kuri pasireiškia neuronų degeneracija. Kiaulėms pagrindinio kontakto su FB₁ požymis yra pleuros edema, dėl kurios sutrinka plaučių ir širdies veikla. Atrajotojams žarnyno mikroflora nesuardo FB₁, tačiau kaip ir kitiems gyvuliams, FB₁ rezorbcija iš žarnyno spindžio yra gana menka (Casteel ir kt., 1994; Frinham ir kt., 1992).

Fumozinai yra navikų aktyvatoriai ir viename tyrime aprašytas jų vidutinis karcinogeniškumas. Jie gali būti dalimi priežasties, sukeliančios žmonėms stemplės vėžį.

Laboratoriniams gyvūnams, įskaitant peles, žiurkes ir triušius, FB₁ turi hepatoksinį ir nefrotoksinį bei kancerogeninį veikimą (Eriksen ir kt., 1998).

Iki šiol geriausiai ištirti ochratoksinai A, B, C, D. Pavojingiausias yra ochratoksinas A. Šiems toksinams jautriausios kiaulės. Galvijai yra atsparūs dėl savo prieskrandžių mikrofloros veiklos.

Nustatyta, kad ochratoksinai išsiskiria nefrotoksiniu, kancerogeniniu, teratogeniniu, imunosupresyvinu poveikiu. Susijungę su kraujo makromolekulėmis, ochratoksinai yra mobilus mikotoksinų rezervas, ilgą laiką galintis veikti įvairius audinius. Nustatyta, kad ochratoksinų kiekis pasiskirsto audiniuose taip: inkstai⇒ kepenys⇒ raumenys⇒ riebalai. Pastebėta, kad ochratoksinai gali pereiti placentos barjerą ir apnuodyti vaisių (Bakutis, 2004).

Tetratogeninis ochratoksino poveikis nustatytas pelėms, žiurkėms, viščiukams. Pažeidimo laipsnis priklauso nuo daugelio veiksnių: dozės, veikimo trukmės, gyvulio amžiaus. Patekus ochratoksinui į organizmą, stebimi pakitimai nervų sistemoje, akių pažeidimai, skeleto vystymosi pakitimai (Krogh ir kt., 1995).

Daugelis tyrimų įrodė, kad ochratoksinas A veikia ląstelinio ir humoralinio imuniteto sistemas. Dozės, kurios sukelia nežymius inkstų pakitimus, sumažina užkrūčio liaukos masę ir sumažina kaulų čiulpų aktyvumą. Taip pat šios mikotoksino dozės mažina makrofagų aktyvumą, kuris nustatomas atmetimo reakcijos sumažėjimu, persodinus organus (Hoehler, 1998).

Aflatoksinai yra plataus poveikio spektro toksiniai junginiai. Jie gali sukelti patologinius pakitimus daugelyje organizmo sistemų.

Aflatoksinai gali būti B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂. Nustatyta, kad kai kuriose Afrikos ir Pietryčių Azijos šalyse aflatoskinų kiekis maisto produktuose gali sukelti kepenų vėžį žmonėms (Pasteyner, 1994).

Toksinis metabolitas M₁ išsiskiria su karvės pienu, o jis yra pagrindinis maisto produktas vaikams, tai labai svarbu atsižvelgti į jo kancerogeniškumą žmonių organizmui (Pittet, 1998).

Pagrindinis kelias aflatoskinams patekti į gyvulių organizmą yra per virškinimo traktą su pašarais. Aflatoskinų pusperiodis organizme yra 12- 15 val. Sušėrus žymėtą aflatoskiną, po 30 min. jis jau aptinkamas kepenyse, po 2- 3 val.- inkstuose, antinksčiuose, blužnyje. Tulžyje randamas jau po 5 minučių.

Pastaraisiais metais dėl griežtos maisto produktų ir pašarų kontrolės retai pasitaiko tokia aflatoskinų koncentracija, kuri žmonėms ar gyvuliams sukeltų ūmią aflatoskikozę (Lugauskas ir kt., 2002).

1.2.5 Leistinos mikotoksinų normos pašaruose

Daugelyje šalių pašarų užterštumas mikotoksinais reglamentuojamas ir kontroliuojamas, nustatomos leistini kiekiai pašaruose (7 lentelė) (Bakutis, 2004).

Pastaraisiais metais Šiaurės Šalių Taryba, Europos Komisija (European Commission, 2001a; European Commission, 2001b) ir JECFA (JECFA, 2001) atliko trichotecenų rizikos įvertinimą. Pagal šias rizikos normas buvo nustatytos maksimalios trichotecenų paros normos: DON- 1 µg/kg (ppb) kūno masės, NIV- 0,7 µg/kg (ppb), T- 2 ir HT- 2 (kartu ar atskirai)- 60- 200 ng/kg (ppt) kūno masės.

ZON reglamentuojamas ne visose Europos valstybėse. Žinant šio mikotoksino poveikį, dažniausiai nustatomos rekomendacinės normos. Reglamentuota ZON koncentracija maisto produktuose:

- Austrijoje- 60 µg/kg (ppb),
- Prancūzijoje- 200 µg/kg (ppb),
- Rusijoje- 1000 µg/kg (ppb) (Bakutis, 2004).

7 lentelė. Leistinas mikotoksinų kiekis pašaruose

GYVULIŲ RŪŠIS	PAŠARAI	MAKSIMALUS KIEKIS, µg/kg
AFLATOKSINAI		
Gyvulių prieauglis, paukščiai	Grūdų ir žemės riešutų produktai	20
Pieniniai gyvuliai	Grūdų ir žemės riešutų produktai	20
Veisliniai penimi galvijai, kiaulės	Grūdų ir žemės riešutų produktai	100
Suaugę paukščiai	Grūdų ir žemės riešutų produktai	100
Penimos kiaulės	Grūdų ir žemės riešutų produktai	200
Penimi galvijai	Grūdų ir žemės riešutų produktai	300
Penimi galvijai, kiaulės, paukščiai	Medvilnės sėklos	300
Visi gyvuliai	Kiti pašarai	20
FUMOZINAI		
Triušiai	Kukurūzai, jų šalutiniai produktai (ne daugiau kaip 20 % per parą sausojoje medžiagoje)	5
Kiaulės ir žuvis	Kukurūzai, jų šalutiniai produktai (ne daugiau kaip 50 % per parą sausojoje medžiagoje)	20
Penimi galvijai, paukščiai, audinės, vištos dedeklės, melžiamos karvės	Kukurūzai, jų šalutiniai produktai (ne daugiau kaip 50 % per parą sausojoje medžiagoje)	30
Galvijai, vyresni kaip 3 mėn., audinės	Kukurūzai, jų šalutiniai produktai (ne daugiau kaip 20 % per parą sausojoje medžiagoje)	60
Mėsiniai paukščiai	Kukurūzai, jų šalutiniai produktai (ne daugiau kaip 50 % per parą sausojoje medžiagoje)	100
Visi kiti naminiai gyvuliai	Kukurūzai, jų šalutiniai produktai (ne daugiau kaip 50 % per parą sausojoje medžiagoje)	10

Lentelės tęsinys 24 psl.

7 lentelės tęsinys

GYVULIŲ RŪŠIS	DEOKSINIVALENONAS	ZEARALENONAS
	MAKSIMALUS KIEKIS, mg/kg	
Veislinės kiaulaitės	1,0	0,05
Veislinės ir penimos kiaulės	1,0	0,25
Galvijai	2,0	0,1
Pieniniai galvijai	5,0	0,5
Penimi galvijai	5,0	-
Broileriai, vištos dedeklės	5,0	-

Ekonominius nuostolius dėl mikotoksinų sudaro derliaus kokybės sumažėjimas, pablogėjusi sveikata, produkcijos sumažėjimas, išlaidos pašarų apdorojimui, profilaktikos, diagnostinėms priemonėms, taip pat išlaidos mikotoksinų nustatymui maisto produktuose ir pašaruose bei jų detoksikavimui.

1.3 BŪDAI IR PRIEMONĖS PAŠARAMS NUO MIKOTOKSINŲ APSAUGOTI

1.3.1 Mikotoksinų produkavimo prevencija lauko sąlygomis ir sandėliuose

Pagrindiniai vadinamieji “lauko” mikroskopiniai grybai yra *Fusarium* ir *Alternaria* genčių atstovai, kurie mūsų klimato sąlygomis sukelia daugiausia problemų. Žalą daro ir produkuojami mikotoksinai (trichotecenai, zearalenonas), todėl šių mikotoksikozijų profilaktiką reikia pradėti jau grūdus sėjant. Labai svarbūs yra tokie veiksniai kaip efektyvių fungicidų panaudojimas, dirvos įdirbimo technologija, tręšimo intensyvumas, kova su augalų kenkėjais, sėjimo tankis ir pan.

Apibūdinant mikotoksikozijų profilaktiką lauko sąlygomis, galima išskirti septynias svarbiausias sąlygas, mažinančias užsikrėtimo riziką:

1. sėjomainų taikymas;
2. efektyvių fungicidų panaudojimas;
3. atsparių grybiniams susirgimams veislių parinkimas;
4. subalansuotas tręšimas;
5. sėjimo tankio reguliavimas;

6. priemonės, mažinančios javų mechaninį pažeidimą (kova su erkėmis, vabzdžiais);
7. tinkamas derliaus nuėmimo laikas.

Nuimtą derlių sandėliuose pasitinka vadinamieji sandėlių mikroskopiniai grybai: *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių atstovai. Grūdai į saugyklas patenka drėgnoki, užteršti piktžolių sėklomis. Jie pradeda kaisti ir susidaro geros sąlygos mikroskopiniams grybams augti ir mikotoksinams produkuoti. Tad grūdus reikia kuo greičiau išvalyti ir konservuoti. Dažniausiai naudojami du grūdų konservavimo būdai:

- ◆ Fizikinis- grūdai greitai išdžiovinami iki 12- 13 % drėgmės;
- ◆ Cheminis- grūdai apdorojami fungistatiniais preparatais (dažniausiai sukurtais propiono rūgšties pagrindu, pvz., šaumazilu).

Cheminio būdo plitimą stabdo trumpi konservavimo terminai, technologijų nelankstumas.

Žinoma ir daugiau grūdų konservavimo būdų: atšaldymas iki tam tikros temperatūros, CO₂ dujų naudojimas. Tačiau šie metodai gana brangūs ir sudėtingi gamybinėmis sąlygomis (Baliukonienė, 2005).

1.3.2 Pašarų detoksikavimo būdai ir priemonės

Svarbiausias uždavinys ūkiuose- kaip detoksikuoti mikroskopiniais grybais ir jų toksiniais užkrėstus pašarus. Reikia atlikti daug įvairių darbų:

1. suardyti, inaktyvuoti arba pašalinti mikotoksinus;
2. panaudojus chemines, fizikines priemones reikia neleisti susidaryti naujiems toksinams;
3. detoksikuoti taip, kad nenukentėtų pašaro vertė;
4. kuo daugiau sunaikinti sporų ir grybų micelio ir sustabdyti galimybę atsinaujinti mikotoksinų producentams;
5. parinkti lengvai įterpiamas, nebrangias ir nekenksmingas aplinkai detoksikavimo priemones (Kybartas, 2005).

Pašarų detoksikavimas gali būti atliekamas fizikiniais, cheminiais, biologiniais metodais.

1.3.2.1 Pašarų detoksikavimo būdai prieš šeriant gyvulius

Literatūros šaltiniuose aprašoma daugybė pašarų detoksikavimo būdų. Pirmiausia pašarus reikia valyti nuo piktžolių sėklų, pažeistų grūdų, įvairių priemaišų, grūdų paviršių valyti specialiais siurbliais, atlikti siojimą, autoklavavimą ir kt.

Nustatyta, kad valant grūdus DON koncentraciją galima sumažinti 7- 23 %. Dažnai padidėjusi mikotoksinų koncentracija gali būti randama grūdo luobelėje, sėlenose, net iki 40 % bendro toksino kiekio. Pašalintas viršutinis grūdų sluoksnis (iki 19 % bendrojo svorio) sumažina ZON, DON kiekį 40- 100 %. Apipelijusiuose kukurūzuose DON sumažėjo 33 %.

Natūraliai užsikrėtusių kukurūzų siojimas per 3 mm sietą, atskiriant smulkias grūdų nuolaužas, fumonizino kiekį sumažino 27- 70 %. Praėjusiose per sietą kukurūzų nuolaužose toksino rasta net 12- 28 mg/kg, tuo tarpu sveikuose grūduose tik 0,8- 1,9 mg/kg (Bakutis, 2004).

Terminis apdorojimas- bene patogiausias ir plačiausiai naudojamas pašarams detoksikuoti. Tačiau daugelis mikroskopinių grybų toksinų yra termostabilūs. Pavyzdžiui, trichotecenai 120- 180 °C temperatūroje yra labai stabilūs ir tik 210 °C temperatūrai veikiant 30- 40 minučių suyra.

Tarp daugybės išbandytų cheminių metodų pirmiausia reikėtų paminėti apdorojimą šarminančiomis medžiagomis. Pašarus veikiant amoniaku, galima ženkliai sumažinti mikotoksinų koncentraciją.

Grūdų drėgnumas turi didelę reikšmę. Tai išryškėjo kukurūzų miltuose detoksikuojant mikotoksiną DAS. Tais pačiais 10 % reagentais miltus reikia veikti 2 val., o 25 % 20 °C temperatūroje tik 15 minučių. DAS kiekis sumažės iki 0,5 mg/kg. Tačiau biologiniais metodais (vištų embrionų ir odos testais) šis mikotoksinas dar buvo aptiktas (Bakutis, 2004).

H. Richter ir kiti mokslininkai užkrėtė kviečius *F. culmorum* kultūra ir DON pasiekė iki 2,85- 4,62 mg/kg. Po to veikė 1 % propiono rūgštimi, 3,5 % natrio šarmu, 1 % natriodisulfitu, 2,25 % šlapalo arba 1 % konservantų mišiniu ir laikė 6 savaites. Pakartotinai ištyrus pašarus konstatuota, kad propiono rūgštis ir konservantai jokios įtakos DON kiekiui neturėjo. Tuo tarpu natrio šarmas, natriodisulfitas ir šlapalas DON koncentracija sumažino iki 80 %. Taip pat buvo lygintas DON užkrėstų ir natriodisulfitu apdorotų kviečių poveikis paršų augimui ir kai kuriems

hematologiniams pakitimams. Išsiskyrė paršų grupė, gavusi užkrėstu DON pašaru be detoksikantų. Tokių paršų kraujyje padidėja segmentuotų neutrofilų, aspartataminų transferazės kiekis, o limfocitų sumažėjo. Svorio skirtumai tarp grupių buvo nepatikimi.

Tyrimus su mikroorganizmų detoksikuotais pašarais 1993 m. atliko J. Ife ir kiti mokslininkai. DON užkrėsti kukurūzai buvo inkubuojami anaerobinėmis sąlygomis, sumaišant su broilerių storųjų žarnų turiniu. DON kiekis sumažėjo per pusę. Tokia mikrobiologiškai modifikuota mase buvo šeriami paršeliai. Bandymai parodė, kad taip galima išvengti žalingo DON poveikio (Bakutis, 2004).

1.3.2.2 Pašarų detoksikavimo būdai šėrimo metu

Absorbcijos principas yra toks: įmaišius į pašarą tam tikrų priedų, fizikiniais ir cheminiais būdais virškinamajame trakte, esant atitinkamai substrato drėgmei, galima sumažinti mikotoksinų biologinį poveikį. Hidratuotas natrio, kalcio ir aliuminio silikatas sėkmingai naudojamas kaip adsorbentas aflatoksinams broilerių ir kalakutų lesaluose mažinti. Ir priešingai- norint sumažinti fuzariotoksinų kiekį tuo pačiu preparatu, poveikis buvo nedidelis (Bakutis, 2004).

S. Dānicke (2000) ir kiti mokslininkai 1999 metais tyrė įvairių DON dozių poveikį broilerių lesaluose įmaišydami komercinės detoksikuojančios medžiagos. Bandymas atliktas su vyriškos lyties viščiukais 1- 35 augimo dieną. Sudarytos kelios bandomosios grupės, kurioms buvo įmaišyta (0 %; 16.5 %; 33 %; 49.5 %; 66 %) lesalų, užkrėstų 21,2 mg/kg DON. Komercinis detoksikuojantis preparatas nuo neigiamo DON poveikio neapsaugojo.

Bandymų metu šeriant kiaules mikotoksinais užkrėstais pašarais, įmaišytas adsorbentas pagerino įvairius rodiklius (Dānicke ir kt., 2000).

Daugelis mokslininkų tyrė įvairių iš dirvožemio, vandens išskirtų mikroorganizmų galimybes detoksikuoti toksiną T- 2 turinčias terpes. Buvo nustatyta, kad keleto bakterijų grupių atstovai detoksikuojančiai veikia žymiai efektyviau negu po vieną .

Tyrėjai S. Swanson (1988) ir kiti 1988 metais nurodė, kad virškinimo trakto mikroorganizmai pasižymi deepoksiduojančiomis savybėmis. Reikėtų aktyvinti virškinimo trakto mikroflorą, panaudojant probiotikus, prebiotikus, organines rūgštis, eterinius aliejus, kad suaktyvėtų mikrobiniai deepoksidacijos procesai.

Enzimai, kaip pašariniai priedai, taip pat daro įtaką mikotoksinams. Iš vienos pusės jie gali tiesiogiai veikti mikotoksinus, kita vertus, bekrakmolius polisacharidus skaldantys enzimai, ypač broileriams, pakeičia fizines ir chemines virškinimo trakto savybes. Tai sąlygoja mikrobinio spektro pakitimą virškinamajame trakte. Kartu pasikeičia virškinimo ir absorbcijos procesai, galintys mažinti mikotoksinų poveikį organizmui. S. Dānicke (2000) ir kiti mokslininkai tyrė bekrakmolius polisacharidus skaldančius enzimus ir jų poveikį fuzariotoksinais užkrėstiems lesalams ir, priklausomai nuo mikotoksinų koncentracijos, pagerino lesalų pasisavinimą.

Šiuolaikinės detoksikavimo priemonės pagrįstos dviem pagrindinėmis strategijomis:

- 1) toksinų eliminacijos pagreitinimu (toksinų rezorbcija adsorbentu, tokiu būdu rezorbcijos į kraują blokavimu);
- 2) toksiškumo mažinimu (biologinė detoksikacija).

Iki šiol atlikti tyrimai, kurių tikslas nustatyti, kaip įvairūs į pašarą dedami adsorbentai (daugiausia aliuminio silikatai) savo paviršiumi adsorbuoja mikotoksinus ir tokiu būdu sutrikdo jų rezorbciją iš virškinimo trakto. Kol kas geri ir moksliskai pagrįsti rezultatai gauti inaktyvuojant aflatoksinus. Kitų mikotoksinų (pvz., DON) adsorbcija šiais preparatais buvo menka arba nulinė (pvz., trichotecenų).

Lietuvoje mikotoksinais užterštiems pašarams detoksikuoti pastaruoju metu beveik be išimties naudojami komerciniai preparatai. Pirmasis Lietuvoje registruotas komercinis preparatas adsorbentas- "Mycobond". Jis gerai veikė aflatoksinus, bet beveik nedarė poveikio fuzariotoksinams (Bakutis, 2004).

Kadangi daugelis mikotoksinų pažeidžia kepenų funkciją, silpnina imuninę sistemą, tai į naujos kartos detoksikantus pridedama komponentų, kompensuojančių šiuos pažeidimus.

1.3.2.3 Kiti būdai ir priemonės, mažinančios mikotoksinų poveikį

Daugelio mokslininkų ir praktikų pastebėta, kad ne visi žemės ūkio gyvuliai ir paukščiai vienodai jautrūs įvairioms mikotoksinų koncentracijoms. Žinoma, kad jautriausias yra kiaulių prieauglis. Galvijų prieauglis, kol nefunkcionuoja prieskrandis, irgi jautrūs mikotoksinams.

Mikotoksinų poveikį gyvam organizmui labai sustiprina zoohigieninių sąlygų nesilaikymas. Taigi, visa tai įvertinus, galima išvengti kai kurių gyvulių ir paukščių apsinuodijimo mikotoksinais atvejų.

Kad sumažėtų mikotoksinų poveikis, naudojamas užkrėstų pašarų metodas. Tai gana pažangus ir šiuolaikiškas metodas, tačiau ir turi trūkumų. Pirmiausia mikotoksikologijos laboratorijose ištiriami svarbiausi kombinuotųjų pašarų komponentai. Tada, pasitelkus kompiuterines programas, sukomponuojami "saugūs" mikotoksinų atžvilgiu racionali. Tačiau tai reikalauja išsamesnių mokslinių bei praktinių tyrimų (Bakutis, 2004).

1.4 MIKOTOKSINŲ NUSTATYMO METODAI

Mikotoksinų tyrimams naudojami įvairūs analitiniai metodai: imunoanalizė, imunocheminė analizė, plonasluoksnė ir skysčių chromatografija. Metodai tobulinami, ieškoma optimalių mėginio ekstrakcijos ir valymo sąlygų (Wilkes ir kt., 1998).

Mikotoksinų analizė maisto produktuose, pašaruose ir grūduose susideda iš penkių pagrindinių etapų: MĖGINIŲ ATRINKIMAS⇒ MĖGINIŲ PARUOŠIMAS⇒ EKSTRAKCIJA⇒ VALYMAS⇒ MIKOTOKSINŲ NUSTATYMAS.

Nustatant mikotoksinų kiekį grūduose būtina paimti mėginį pagal aiškiai apibrėžtą atrinkimo planą. Nuo paėmimo priklauso analizės rezultatai (Whitaker ir kt., 2000).

Paruošiant standartinį mėginį analizei, tiriamasis mėginys yra sumalamas, sumaišomas taip, kad toksino koncentracija paskutinėje tiriamojoje porcijoje būtų tokia pati kaip ir visuose grūduose. Dažniausiai naudojama kietafazė ekstrakcija su acetoniitrilo ir vandens mišiniu valymas imuninėje ar silikagelio kolonėle (Langseth ir kt., 1998). Pastaraisiais metais pagamintos valymo kolonėlės atskiriems toksinams DON ir T- 2, išsaugančios toksinų savybes po valymo. Be to, kolonėlės yra pritaikytos atskiriems toksinams, o toksinai išgaunami dar nepakankamai (Scott, 1997).

Dėl jautrumo, specifiškumo ir tikslumo chromatografiniai metodai taikomi plačiausiai. Plonasluoksnė chromatografija (TLC) buvo pirmas analitinis metodas, taikomas atskiriems trichotecenamams javuose nustatyti (Kamimura ir kt., 1981). Be to, TLC metodai stokoja jautrumo

ir specifiškumo. TLC dažniausiai naudojamas trichotecenų išplitimo užterštuose javuose analizei (Fernandez ir kt., 1994).

Aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodas (HPLC) su UV detekcija naudojamas B tipo trichotecenų nustatymui javuose, net jei nustatymo ribos yra žymiai aukštesnės (Langseth ir kt., 1998). A trichotecenų nustatymui nėra tinkama UV detekcija, kadangi ši grupė trichotecenų parodoma tik absorbcijos pabaigoje. Pastaraisiais metais skystinė chromatografija su masių spektrometru (MS) sėkmingai taikoma A ir B trichotecenų kiekio nustatymui javų mėginiuose (Berger ir kt., 1999; Razzazi- Fazeli ir kt., 1999).

Dabar dažniausiai taikoma kapiliarinė dujinė chromatografija (GC) su vienu iš dviejų- elektroniniu detektoriumi (ECD) arba masių spektrometru (MC) trichotecenams išskirti ir nustatyti (Langseth ir kt., 1998).

Nors chromatografijos analizės metodai dažniausiai taikomi nustatyti ir įvertinti užterštumo trichotecenais lygį, jie reikalauja specialaus pasiruošimo ir brangios įrangos.

Pastaruoju metu kaip alternatyva brangiems cheminiams metodams paplito imunocheminiai ir biologiniai. Imunofermentinio (IFA) metodo pagrindas antikūno- antigeno reakcija, antikūnų naudojimas prieš beveik visus pagrindinius mikotoksinus. IFA metodas taikomas mikotoksinų paplitimo analizei. Imuninė analizė paremta jautrumu, greičiu ir tikslumu mikotoksinų monitoringe ir taikoma dideliame mėginių kiekiui vienu metu (Trucksess ir kt., 1995; Park ir kt., 1996).

Paprasčiausiai mikotoksinai nustatomi biologiniais metodais, *in vitro* panaudojus ląstelių kultūras. Literatūros duomenimis, daugelis ląstelių kultūrų, naudojamų toksiškumo analizei, turi būti labai jautrios mikotoksinų koncentracijoms $\mu\text{g/ml}$.

Labai svarbu nustatyti užsikrėtusių pašarų arba maisto produktų mikroskopinių grybų kiekį, rūšinę sudėtį. Pagal tai galima spręsti, kokius mikotoksinus galima rasti tiriamame objekte (mėginyje). Tai palengvina brangiai kainuojančią mikotoksinų diagnostiką.

Kiekybinį pašarų užkratą mikroskopiniais grybais galima išaiškinti dviem metodais: nustatyti sporų kiekį grame pašaro ir nustatyti procentą grūdų, užsikrėtusių gyvybinių grybų miceliu (Bakutis, 2004).

1.5 MIKROBIOLOGINIO IR MIKOTOKSIKOLOGINIO GRŪDŲ UŽTERŠTUMO PROFILAKTIKA

Mikotoksikozijų ir bakterinio užterštumo profilaktikos priemonės turėtų būti taikomos visuose etapuose. Javus reikia tinkamai užauginti, konservuoti nuimtą derlių, įvertinti mikotoksikologiniu ir sanitariniu požiūriu, jei reikia- nukenksminti.

Grūdų mikologinio ir bakterinio užterštumo prevencijos priemonės galima suskirstyti į du etapus: priemonės iki derliaus nuėmimo ir priemonės po derliaus nuėmimo. Mikroskopinių grybų sporos, kai kurie mikroorganizmai laikosi dirvoje. Javai apsikrečia jais vegetacijos metu. Šiame etape prevencijai siūlomos agrocheminės priemonės (sėjomainos, tinkamas dirvos įdirbimas ir kt.).

Grūdų saugyklose reikia sudaryti tinkamas sandėliavimo sąlygas (temperatūra ir kt.) (Bakutis ir kt., 2000).

Skirtingi fizikiniai, cheminiai ir biologiniai metodai naudojami mikotoksinų toksiškumo sumažinimui užterštuose javuose ir pašaruose. Taikomi tokie fizikiniai metodai: valymas ir plovimas, lukštenimas, malimas, atskyrimas užterštų grūdų nuo neužterštų ir įvairios kaitinimo formos. Be to, šių metodų efektyvumas priklauso nuo užterštumo ir mikotoksino išplitimo laipsnio. Po kviečių pramoninio apdirbimo DON sumažėjo 40 % (Kupier- Goodman, 1994).

Cheminiai būdai detoksikuojant cheminiais reagentais- rūgštimis yra paremti oksidiniu, redukavimu, chloravimu (dezinfekavimu). Daugelis chemikalų pasižymi nedideliu poveikiu ar neturi jokio poveikio trichotecenų koncentracijoms. Be to, cheminis poveikis mažina grūdų maistines medžiagas. Pastaraisiais metais toksinų biologinė detoksikacija pasiekė teigiamų rezultatų (Shima ir kt., 1997; Karlovsky, 1999). Esant skirtingiems mikotoksinų šaltiniams su skirtingomis cheminėmis charakteristikomis, sunku rasti kiekvienam toksinui dekontaminacijos būdą grūduose.

2. DARBO ATLIKIMO VIETA IR METODIKA

Tiriamasis darbas atliktas 2003- 2004 metais Lietuvos veterinarijos akademijos Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedroje, Mikotoksikologijos laboratorijoje.

Tyrimų metu buvo nustatytas koncentruotųjų pašarų (miežių, kviečių grūdų, kombinuotojo pašaro) mėginių kiekybinis užterštumas, panaudojus ir nepanaudojus konservantą CALPRONA NC, taip pat nustatytas mikotoksinų kiekis tirtuose koncentruotuose pašaruose (miežių, kviečių grūduose, kombinuotame pašare), panaudojus ir nepanaudojus minėtąjį konservantą. Taip pat buvo ištirtas mikotoksinų paplitimas koncentruotuose pašaruose 2003- 2004 metais.

Kiekybinis užterštumas (ksv- kolonijas sudarančių vienetų skaičius viename grame pašaro) nustatytas skiedimo būdu, panaudojus Čapeko agarą (Czapec Dox agar) (Купцова, 1971).

Mikotoksinų kiekis nustatytas imunofermentinės analizės metodu (IFA), panaudojus komercinius rinkinius VERATOX®DON 5/5, T- 2 Toxin, Zearalenone rinkinius pagal gamintojo metodikas.

Mikotoksinų kiekis nustatytas ir plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu, panaudojus silicio gelio chromatografines plokšteles pagal Romer Laboratory pateiktas metodikas. Pradžioje paruošiamas tipingas (reprezentatyvinis) mėginys. Jis sumalamas Romerio malūnu. Sumaišoma ir atsveriamas 25 g mėginio į mikserio indą.

Ekstrakcija:

- pridama 100 ml 84/16 (84 ml/16 ml) acetonitrilo/vandens mišinio;
- mikseriu maišoma 3 minutes ar purtoma 30 minučių (nustatant DON toksiną); mikseriu maišoma 2 minutes ar purtoma apie valandą (nustatant aflatoksinus ir ZON toksiną);
- perfiltruojama per popierinį filtrą.

Išgryninimas (nustatant DON):

- per MultiSep® 216 kolonėlę perleidžiama 5 ml 9/1 (9 ml/1 ml) acetonitrilo/vandens mišinio;
- 7 ml mėginio ekstrakto perkeliama į mėgintuvėlį ir perleidžiama per MycoSep® 227 Tich+ kolonėlę;
- 4 ml išvalyto ekstrakto perleidžiama per sudrėkintą MultiSep® 216 kolonėlę;

- MultiSep® 216 kolonėlę praplauname 2 kartus 4,5 ml 9/1 (9 ml/1 ml) acetonitrilo/vandens mišiniu;
- 13 ml surenkame į mėgintuvėlį (4 ml išvalyto ekstrakto + 2x4,5 ml 9/1 acetonitrilo/vandens mišinio);
- 13 ml išgariname panaudojant Romer® Evap sistemą;
- išgarintas turinys ištirpinamas 400 µl 2/1 (1 ml/0,5 ml) acetono/metanolo mišinyje. Į mėgintuvėlį su išgarintu turiniu įpilame 400 µl 2/1 (1 ml/0,5 ml) acetono/metanolo mišinio, užkemšame kamšteliu ir 30 sekundžių maišome.

Išgryninimas (nustatant aflatoksinus ir ZON):

- 9 ml mėginio ekstrakto perkeliama į mėgintuvėlį ir įdedama 90 µl acto rūgšties ir 10 sekundžių maišoma;
- 3 ml mėginio ekstrakto perleidžiama per MycoSep® 226 kolonėlę ar MycoSep® 224 kolonėlę, priklausomai nuo mėginio tipo;
- 2 ml gryno mėginio ekstrakto perkeliama į mėgintuvėlį ir išgarinama panaudojant Romer® Evap sistemą;
- išgarintas turinys ištirpinamas 300 µl 97/3 (97 ml/3 ml) toluolo/acetonitrilo mišinyje. Į mėgintuvėlį su išgarintu turiniu įpilama 300 µl 97/3 (97 ml/3 ml) toluolo/acetonitrilo mišinio, užkemšama kamšteliu ir 30 sekundžių maišoma.

Nustatymas:

- įjungiamas aparatas Romer® autospotter, kad pasiektų 60° C temperatūrą;
- į specialius mikrošvirktelius pritraukiama 10; 20; 40; 60; 80 µl mikotoksinų standartų ir 80 µl tiriamo mėginio;
- ant chromatografinės plokštelės užnešame 10; 20; 40; 60; 80 µl toksinų standartų su specialiais mikrošvirkštais ir 80 µl tiriamo mėginio;
- plokštelė įmerkama į vonelę, nustatant DON, su 10 ml/20 ml toluolo/acetono mišiniu, nustatant aflatoksinus ir ZON, su 18 ml/2 ml chloroformo/acetono mišiniu (reagentai sumaišomi prieš pat įmerkimą). Laikoma, kol skystis pakyla iki 1 cm plokštelės viršaus. Po to plokštelė išdžiovinama ore;

- plokštelė apipurškiama 15 proc. aliuminio chloridu metanolyje. Plokštelė išdžiovinama ore;
- toksinų koncentracijos įvertinamos UV spindulių fone (360 nm);
- DON švyti mėlynai, kai $R_f \approx 0,5$, ZON švyti žaliai, kai $R_f \approx 0,9$, aflatoksinas B₁ švyti mėlynai, kai $R_f \approx 0,45$;

DON kiekio apskaičiavimas ppm (mg/kg):

$$\frac{\text{ng ant plokštelės} \times 1 \text{ ppm}}{0,2 \text{ g mėginio ekvivalento} \times 1000 \text{ ppb}} = \frac{\text{toksino kiekis}}{\text{ppm mėginyje}}$$

Aflatoksinų ir ZON toksino kiekio apskaičiavimas ppb (µg/kg):

$$\frac{\text{ng ant plokštelės}}{0,15 \text{ g mėginio ekvivalento}} = \frac{\text{toksino kiekis}}{\text{ppb mėginyje}}$$

Mikotoksinų kiekių nustatymams naudoti reagentai:

- √ MycoSep® 227 Trich+ kolonėlė;
- √ MycoSep® 226 ar MycoSep® 224 kolonėlė;
- √ MultiSep® 216 kolonėlė;
- √ popierinis filtras;
- √ Biopure toksinų standartai.

Mikotoksinų paplitimas koncentruotuose pašaruose 2003- 2004 metais buvo nustatytas 2003 m. ir 2004 m. duomenų analizės ir tyrimų rezultatų apdorojimo metodu, panaudojus "R" statistinį paketą.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

Atliktų tyrimų metu buvo vertintas kviečių ir miežių kiekybinis užterštumas mikroskopiniais grybais. Buvo paimti koncentruotųjų pašarų mėginiai konservuoti ir nekonservuoti iš X kiaulininkystės komplekso.

Koncentruotųjų pašarų konservavimui panaudotas CALPRONA NC konservantas, skirtas pašarams ir pašarinėms žaliavoms, apsaugant juos nuo mikroskopinių grybų ir bakterinio užterštumo.

Konservanto sudėtis:

- propano rūgšties (91 proc.) ir amonio druskos kompleksas,
- aktyvioji medžiaga.

Forma:

skystis.

Spalva:

geltona.

Aprašymas:

pasižymi stipriu poveikiu mikroskopiniams grybams pašaruose ir pašarinėse žaliavose.

Technologija:

skysčio gamybos technologija leidžia propano rūgščiai veikti mikroorganizmus, esant santykiui 4:1 propano rūgščiai ir amonio druskai.

Galiojimo laikas:

2 metai nuo pagaminimo datos.

Gyvūnų rūšys:

skirta visų gyvūnų rūšių pašarams ir pašarinėms žaliavoms.

Dozė:

0,5- 5 kg/1000 kg pašaro ar pašarinių žaliavų, priklausomai nuo drėgmės kiekio pašare ar pašarinėse žaliavose ir nuo aplinkos sąlygų (A ir B lentelės).

A lentelė. Dozės kg/tonai grūdų

Drėgmės % grūduose	SAUGOJIMO LAIKAS			
	Iki 1 mėn.	Iki 3 mėn.	Iki 6 mėn.	Iki 12 mėn.
Iki 16	0,30	0,35	0,45	0,50
16-18	0,40	0,50	0,55	0,70
18-20	0,45	0,55	0,65	0,75
20-22	0,55	0,70	0,80	0,85

B lentelė. Dozės kg/tonai pašaro

Drėgmės % pašare	SAUGOJIMO LAIKAS			
	Iki 1 mėn.	Iki 3 mėn.	Iki 6 mėn.	Iki 12 mėn.
Iki 16	0,35	0,45	0,55	0,60
16-18	0,40	0,55	0,60	0,75
18-20	0,50	0,75	0,75	0,95
20-22	0,60	0,90	0,95	1,10

Pakuotė:

po 25 l, 200 l, 1000 l.

Savybės:

- energetinė vertė 4250 kcal/g;
- tankumas- 1,05 kg/l;
- klampumas- 10-15 cP esant 20° C temperatūros.

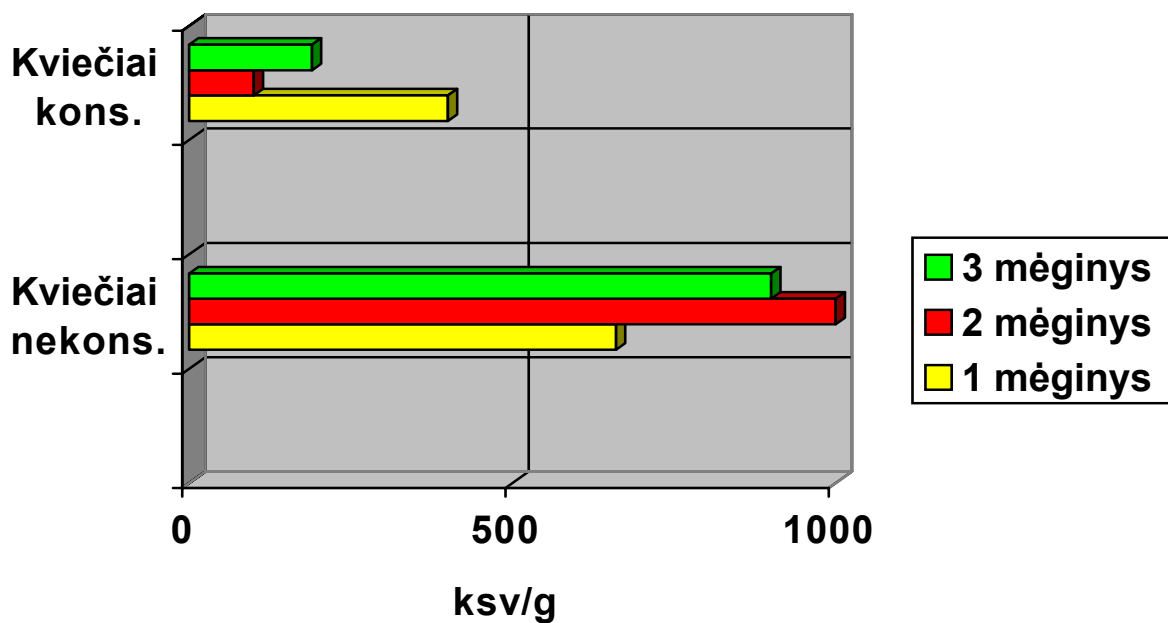
Sertifikavimas:

akredituotas ISO 9002.

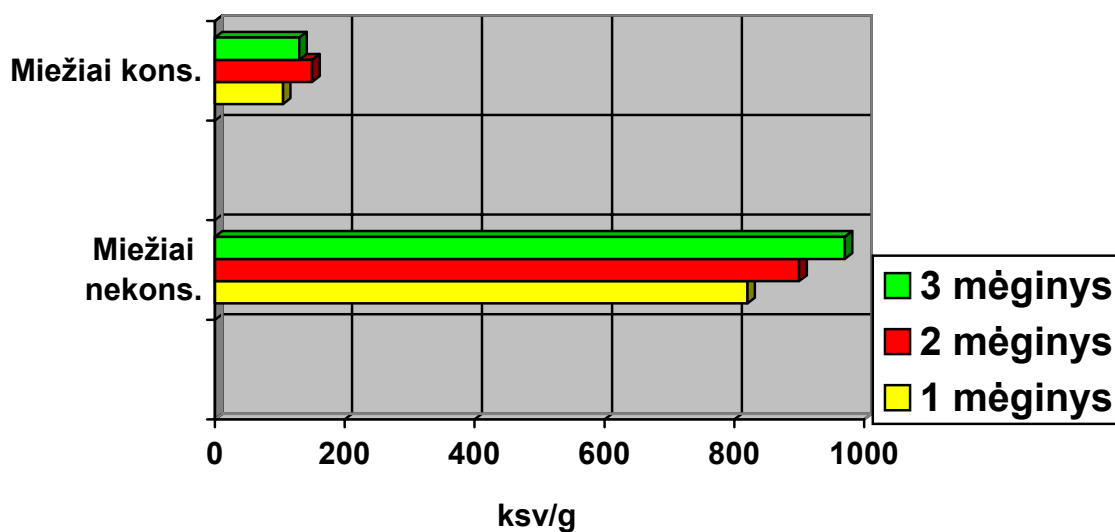
Mikologiniams tyrimams buvo paimti konservuoti konservantu CALPRONA NC ir nekonservuoti kviečių ir miežių mėginiai.

Mėginių sandėliavimo trukmė, laikymo ir kitos sąlygos konservuotų ir nekonservuotų mėginių buvo vienodos.

Mikologiniai kviečių ir miežių tyrimai pateikti 1 ir 2 paveiksluose.



1 pav. Kviečių mikologinis tyrimas



2 pav. Miežių mikologinis tyrimas

Iš pateiktų duomenų matyti, kad koncentruotuose pašaruose, panaudojus konservantą CALPRONA NC, ženkliai sumažėja kiekybinis grūdų užterštumas. Nekonservuotuose miežiuose ir kviečiuose mikroskopinių grybų pradų skaičius (kolonijas sudarančių vienetų skaičius viename grame pašaro) siekia 1000, o konservuotuose šis skaičius sumažėja iki 100. Daroma išvada, kad konservanto naudojimas mikroskopinių grybų pradų skaičių sumažina 10 kartų. Tad galima teigti, kad komercinio konservanto CALPRONA NC fungistatinis poveikis yra labai stiprus. Nesant galimybės grūdus greitai ir efektyviai išdžiovinti (fizikiniais metodais) po derliaus nuėmimo, juos rekomenduojama konservuoti cheminiais konservantais (pvz., CALPRONA NC).

Mūsų atliktų tyrimų duomenimis nustatyta, kad mikotoksinų kiekiai koncentruotuose pašaruose, lyginant 2003 metus ir 2004 metus, mažai yra pakitę. Nustatytas nepatikimas skirtumas ($p < 0,5$). O tai reiškia, kad 2003 metų ir 2004 metų klimatinės sąlygos buvo panašios,

koncentruotųjų pašarų laikymo sąlygos taipogi, grūdai buvo gerai išdžiovinti, tad buvo užkirstas kelias tolimesniam mikotoksinų plitimui.

Iš 8 lentelės duomenų matyti, kad koncentruotuose pašaruose didžiausi kiekiai (mg/kg arba ppm) yra randami deoksinivalenono (DON) mikotoksino, lyginant su zearalenono (ZON) ir aflatoksino B₁ kiekiais koncentruotuose pašaruose.

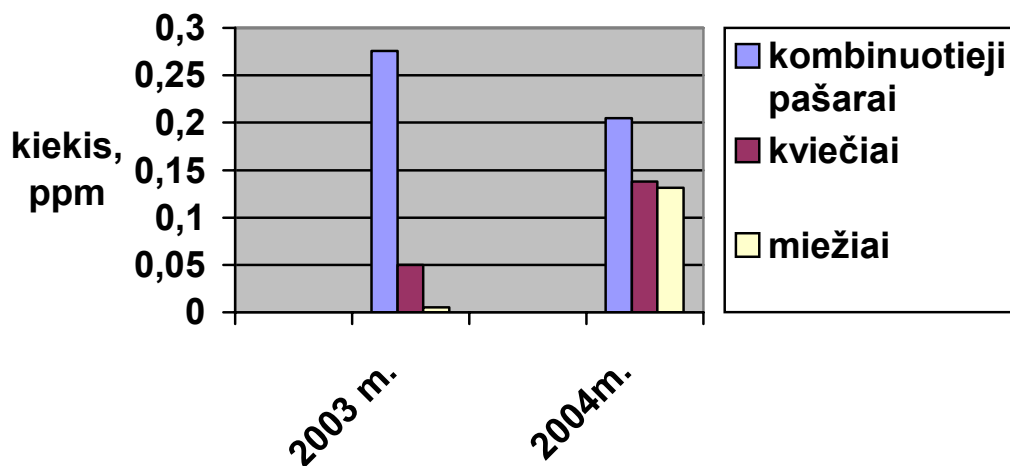
8 lentelė. Mikotoksinų paplitimas koncentruotuose pašaruose 2003- 2004 metais

	PAŠARAI					
	Kombinuotieji pašarai		Kviečiai		Miežiai	
	2003m.	2004m.	2003m.	2004m.	2003m.	2004m.
Viso ištirta mėginių	50	42	13	11	8	12
Zearalenono kiekis, ppm						
Nustatytas minimalus kiekis	0	0	0	0	0	0
Nustatytas maksimalus kiekis	1	0,55	0,2	0,26	0,1	0,333
<i>Vidutiniškai</i>	<i>0,276</i>	<i>0,205</i>	<i>0,05</i>	<i>0,138</i>	<i>0,05</i>	<i>0,131</i>
Vidutinis kvadratinis nuokrypis	0,0321	0,174	0,073	0,095	0,037	0,145
Aritmetinio vidurkio paklaida	0,046	0,027	0,021	0,030	0,014	0,044
Patikimumo kriterijus- td	0,186		-0,272		-0,236	
Aflatoksino B₁ kiekis, ppm						
Nustatytas minimalus kiekis	0	0	0	0	0	0
Nustatytas maksimalus kiekis	0,01	0,001	0,008	0,003	0,005	0,004
<i>Vidutiniškai</i>	<i>0,004</i>	<i>0,003</i>	<i>0,001</i>	<i>0,001</i>	<i>0,002</i>	<i>0,001</i>
Vidutinis kvadratinis nuokrypis	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,001
Aritmetinio vidurkio paklaida	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Patikimumo kriterijus- td	0,023		0,009		0,011	
Deoksinivalenolo kiekis, ppm						
Nustatytas minimalus kiekis	0,05	0,003	0	0,1	0,1	0,1
Nustatytas maksimalus kiekis	2,5	1	0,15	1,25	1,1	0,5
<i>Vidutiniškai</i>	<i>0,378</i>	<i>0,327</i>	<i>0,15</i>	<i>0,46</i>	<i>0,323</i>	<i>0,25</i>
Vidutinis kvadratinis nuokrypis	0,408	0,239	0,119	0,436	0,294	0,151
Aritmetinio vidurkio paklaida	0,058	0,036	0,034	0,137	0,093	0,045
Patikimumo kriterijus- td	0,117		-0,527		0,138	

Iš 8 lentelės duomenų matyti, kad didžiausias mikotoksino DON kiekis nustatytas kviečių grūduose 2004 metais (0,46 ppm), tačiau jis neviršija gyvuliams nustatyto kiekio pašaruose. Mažiausi kiekiai rasti aflatoksino B₁ toksino miežių ir kviečių grūduose 2004 metais (0,001 ppm).

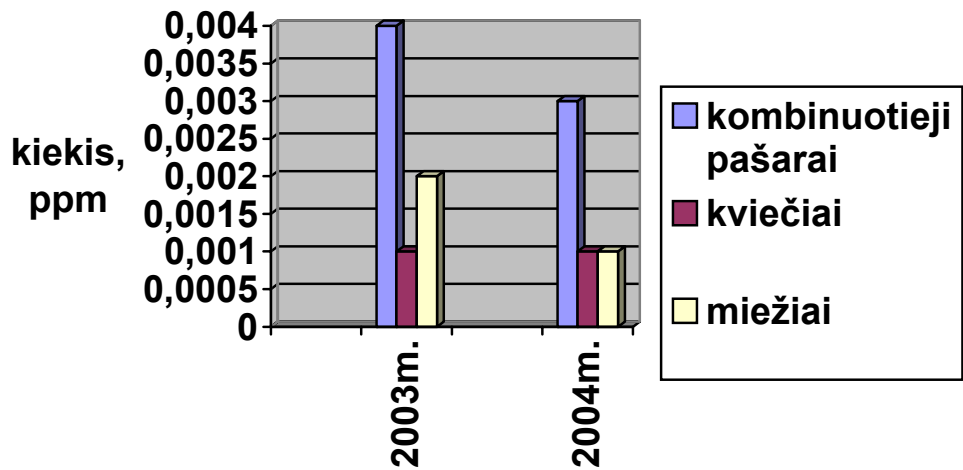
Lyginant 2003- 2004 metus, pastebime, kad koncentruotuose pašaruose mikotoksinų kiekis 2004 metais sumažėjo, išskyrus DON kiekį kviečių grūduose ir zearalenono kiekį miežių ir kviečių grūduose, nes juose mikotoksinų kiekis yra didesnis 2004 metais negu 2003 metais (3, 4, 5 pav.).

Zearalenono kiekis pašaruose



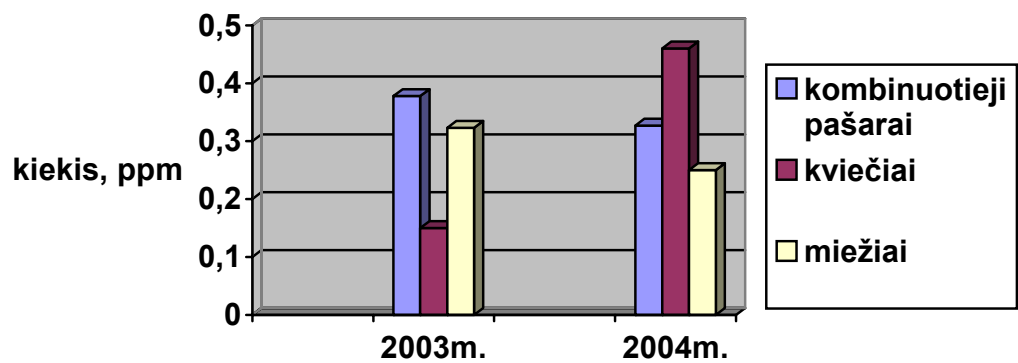
3 pav. Zearalenono kiekis pašaruose 2003- 2004 m.

Aflatoksino B₁ kiekis pašaruose



4 pav. Aflatoksino B₁ kiekis pašaruose 2003- 2004 m.

Deoksinivalenolo kiekis pašaruose



5 pav. Deoksinivalenolo kiekis pašaruose 2003- 2004 m.

Iš 3, 4, 5 paveikslų pastebime, kad kombinuotuose pašaruose kaupiasi daugiau mikotoksinų nei miežiuose ar kviečiuose. Pavyzdžiui, toksino zearalenono kombinuotuose pašaruose 2003 m. rasta 0,276 ppm, o miežiuose ir kviečiuose- tik 0,05 ppm.

Mūsų atliktų tyrimų duomenimis nustatyta, kad didžiausias užterštumas mikroskopinių grybų produkuojančiais mikotoksinais, lyginant konservuotų ir nekonservuotų miežių grūdų mėginius su nekonservuotais ir konservuotais kviečių grūdais, paimtais iš X kiaulininkystės komplekso ir panaudojus konservavimui jau minėtą CALPRONA NC konservantą, yra konservuotų miežių grūdų (9 lentelė).

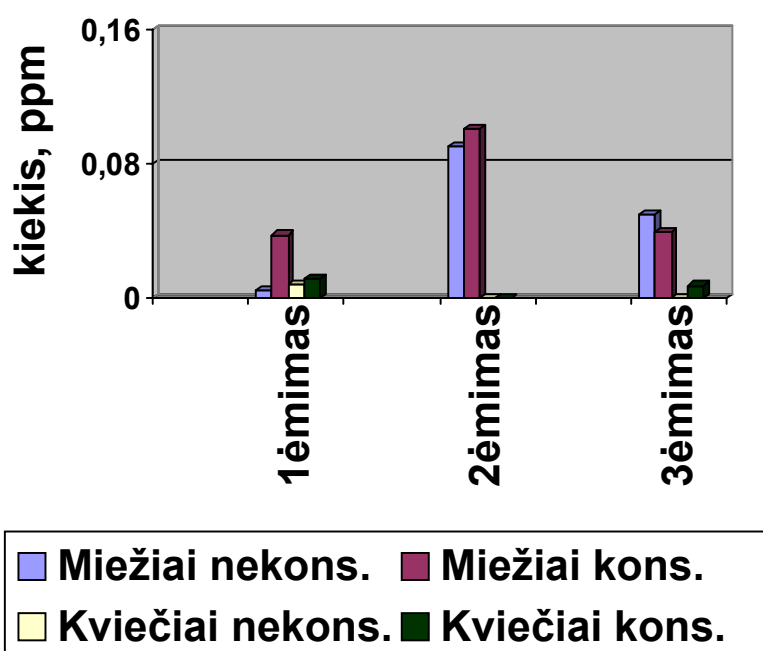
9 lentelė. Mikotoksinų kiekiai koncentruotuose konservuotuose ir nekonservuotuose pašaruose (mg/kg pašaro arba ppm)

	<i>Zearalenono kiekis</i>	<i>Deoksinivalenolo kiekis</i>	<i>T- 2 toksinas</i>
Miežiai (nekonservuoti)	0,048	0,084	0,001
Miežiai (konservuoti)	0,060	0,095	0,001
Kviečiai (nekonservuoti)	0,007	0,087	0,011
Kviečiai (konservuoti)	0,003	0,054	0,011

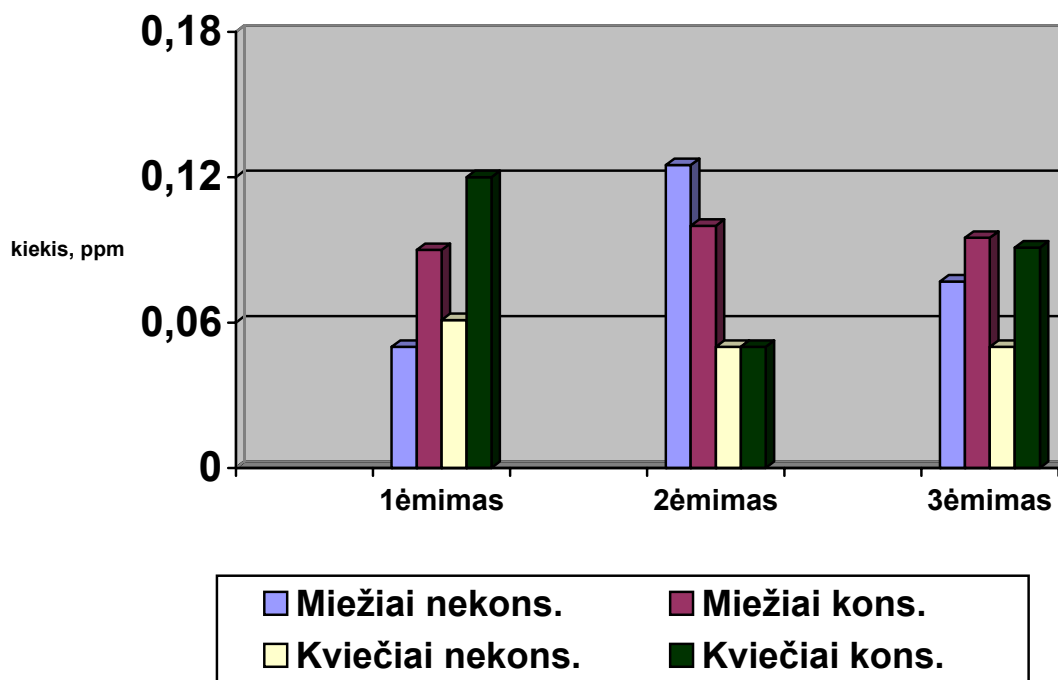
Iš 9 lentelės duomenų matyti, kad konservuotuose koncentruotuose pašaruose (kviečiuose ir miežiuose) yra susikaupę mažiau mikroskopinių grybų mikotoksinų nei nekonservuotuose pašaruose arba mikotoksinų kiekiai išliko nepakitę. Iš 9 lentelės duomenų pastebime, kad, pavyzdžiui, T- 2 toksino kiekis tiek konservuotuose, tiek nekonservuotuose miežiuose yra 0,001 ppm, o kviečiuose- atitinkamai 0,011 ppm. Tačiau nustatyti mikotoksinų kiekiai nėra dideli, o tai rodo, kad pašarų užterštumas mikroskopiniais grybais yra mažas.

Siekiant įvertinti tikslų koncentruotųjų pašarų užterštumą mikotoksinais, miežių ir kviečių mėginiai buvo imti tris kartus (kas 31 dieną), t. y. spalio mėnesio trisdešimt pirmąją dieną, gruodžio mėnesio pirmąją dieną, sausio mėnesio pirmąją dieną.

I- ojo, II- ojo, III- ojo ėmimo mėginių užterštumas mikotoksinais pavaizduoti 6, 7 ir 8 paveiksluose. Juose pavaizduota, kaip kinta koncentruotuose pašaruose esančių mikotoksinų kiekis nuo laikymo trukmės, sandėliavimo ir kitų laikymo sąlygų.

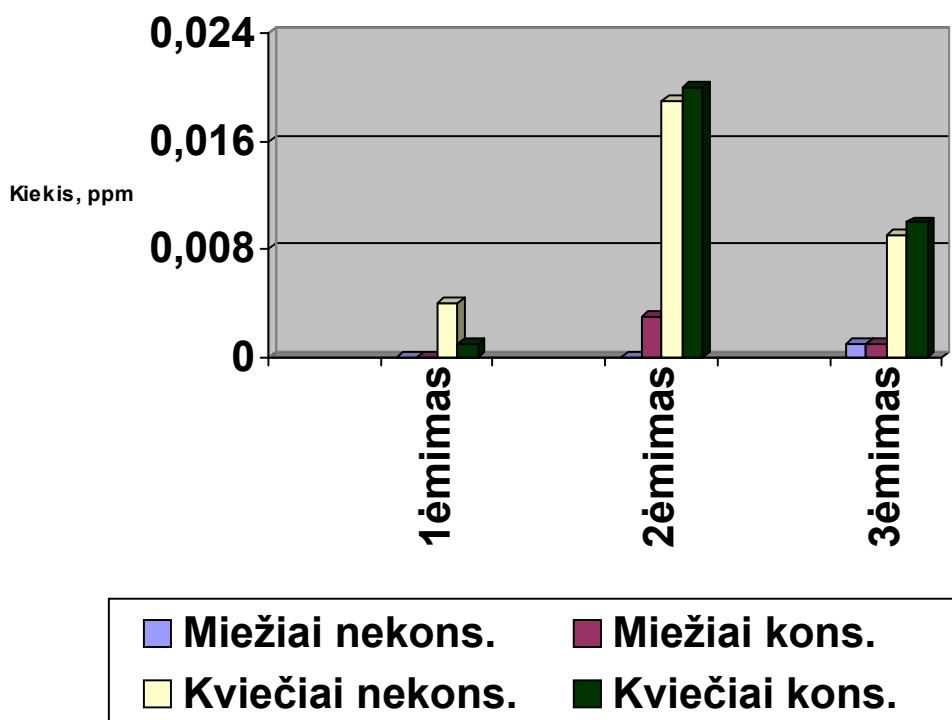


6 pav. Zearalenono kiekis (ppm) pašaruose



7 pav. Deoksinivalenolo kiekis (ppm) paėaruose

Pastebime, kad naudotas konservantas CALPRONA NC neturi įtakos mikotoksinų kiekių kitimui tiriamuoju laikotarpiu. Iš pateiktų paveikslų matome, kad pavyzdžiui, T- 2 toksino kiekiai nekonservuotuose mieėiuose ir kvieėiuose beveik nesiskiria nuo konservuotų grūdų. Trečiojo ėmimo metu konservuotuose kvieėiuose šio toksino rasta 0,009 ppm, o nekonservuotuose kvieėiuose toksino rasta daugiau tik 0,001 ppm, o mieėiuose toksino kiekis liko stabilus ir panaudojus konservantą (0,001 ppm). DON toksino kiekis antrojo ėmimo metu kvieėiuose irgi nepakito ir panaudojus konservantą- 0,05 ppm, o mieėiuose konservantas CALPRONA NC toksino kiekį sumažino 0,025 ppm arba 20 proc. Zearalenono toksino kiekis trečiojo ėmimo metu mieėiuose, po konservanto panaudojimo, išliko beveik nepakitęs (0,05 ppm ir 0,04 ppm).



8 pav. T- 2 toksino kiekis (ppm) pašaruose

6 paveikslo duomenimis pastebime, kad didžiausias zearalenono kiekis (ppm) rastas konservuotuose ir nekonservuotuose miežiuose (atitinkamai 0,101 ppm ir 0,09 ppm) antrojo mėginių ėmimo metu, t. y. gruodžio mėnesio pirmąją dieną.

7 paveikslo duomenimis pastebime, kad didžiausias DON kiekis (ppm) nustatytas konservuotuose ir nekonservuotuose miežiuose (atitinkamai 0,1 ppm ir 0,125 ppm) antrojo mėginių ėmimo metu, t. y. gruodžio mėnesio pirmąją dieną.

8 paveikslo duomenimis pastebime, kad T- 2 toksino daugiausia rasta konservuotuose ir nekonservuotuose kviečiuose (atitinkamai 0,019 ppm ir 0,02 ppm) antrojo ėmimo metu, t. y. gruodžio mėnesį pirmąją dieną.

Nustatyta, kad konservantas CALPRONA NC neįtakoja mikotoksinų kiekių kitimui tiriamuoju laikotarpiu, kadangi toksinų kiekiai išlieka stabilūs arba mažai pakitę po konservanto CALPRONA NC panaudojimo.

4. IŠVADOS IR PASIŪLYMAI

1. Tirti koncentruotieji pašarai yra užteršti mikroskopiniais grybais ir jų produkuojamais mikotoksinais: deoksinivalenolu (DON), zearalenonu, T-2 toksinu ir aflatoksinu B₁.
2. Koncentruotuose pašaruose didžiausi kiekiai (mg/kg arba ppm) yra randami deoksinivalenolo (DON) mikotoksino (0,095 ppm), lyginant su zearalenono (ZON) ir aflatoksino B₁ kiekiais koncentruotuose pašaruose (0,003 ppm ir 0,001 ppm).
3. Kombinuotuose pašaruose kaupiasi daugiau mikotoksinų nei miežiuose ar kviečiuose-zearalenono 62, 6 proc., aflatoksino B₁ 71, 4 proc., deoksinivalenolo 14, 3 proc. daugiau.
4. Mikotoksinų kiekiai koncentruotuose pašaruose, lyginant 2003 metus ir 2004 metus, mažai yra pakitę. Nustatytas nepatikimas skirtumas ($p < 0,5$).
5. Mikroskopinių grybų pradų skaičius (kolonijas sudarančių vienetų skaičius viename grame pašaro) kviečiuose ir miežiuose, panaudojus konservantą CALPRONA NC, sumažėja 10 kartų.
6. Konservantas CALPRONA NC neturi didelės įtakos mikotoksinų kiekių kitimui koncentruotuose pašaruose tiriamuoju laikotarpiu.

Norint detaliau išnagrinėti mikrobiologinį, mikologinį ir mikotoksikologinį koncentruotųjų pašarų užterštumą, būtina atlikti tyrimus javams dar augant, bręstant bei derliaus nuėmimo metu. Suvežus grūdus, kaip galima greičiau nustatyti veiksnius, kurie skatina koncentruotųjų pašarų užterštumą. Kuo greičiau atlikti fizikinį arba cheminį konservavimą. Nesant galimybės efektyviai atlikti fizikinio konservavimo, rekomenduojama naudoti cheminį konservavimo būdą, pvz., su preparatu CALPRONA NC.

SUMMARY

ANALYSIS OF MYCOTOXINS ACCUMULATION IN CONCENTRATED FODDER

Master work was accomplished in period of 2003 09 24 – 2005 03 15 in the Lithuanian Veterinary Academy, dep. of Food Safety and Animal Hygiene, laboratory of mycotoxins.

Work's volume: 54 pages. There are 9 tables, 2 charts and 8 pictures in the thesis.

Aim of study. The purpose was to investigate and analyse mycotoxicological contamination of concentrated fodder during 2 years and to evaluate the use of chemical conserving CALPRONA NC.

Main tasks:

- 1) To investigate the amounts of aflatoxin B₁, zearalenone, T₂ and deoxivalenol (DON) mycotoxins in fodder using immunofluorescence analysis and chromatography (TLC) method's.
- 2) To determine minimum and maximum levels of mycotoxins in fodder and compare with the formative's.
- 3) Compare levels of mycotoxins in fodder during period of two years.
- 4) Investigate the influence of chemical conserving CALPRONA NC mycostatical effect on the grain after the harvest.

Material and methods:

Conserved (CALPRONA NC) and non conserved samples were taken from experimental farm.

Quantitative contamination of fungi (cfu – colony forming units) was determined using dilution method and Czapek Dox agar (Kypacova, 1971).

Level of mycotoxins was determined using IFA (immunofluorescence analyses) method with commercial set VERATOX@DON, T- 2 toxin, Zearalenone. Also the TLC method was applied using silicon gel plates (methodology of Romer Lab.)

Diffusion of mycotoxins in fodder during year 2003- 2004 was determined using processing of facts with "R" statistical pack.

Results and discussion:

- 1) Probe fodder is contaminated with fungi and their toxins: DON, zearalenone, T- 2 and aflatoxin B₁.
- 2) Highest levels of mycotoxins in concentrated fodder (mg/kg or ppm) are DON (0.095 ppm), comparing to zearalenone (ZON) and aflatoxin B₁ (0.003 ppm and 0.001 ppm).
- 3) The level of mycotoxins is higher in concentrates than in barley or wheat – zearalenone 62.6 %, aflatoxin B₁ 71.4 %, deoxivalenol 14.3 %.
- 4) Comparing results of years 2003- 2005 it can be concluded that the level was more less at the same level (insecure difference $p < 0.5$).
- 5) CFU (colony forming units) in one gram of fodder decreased 10 times after applying conserving CALPRONA NC.

On purpose to have more detailed view of mycotoxicological contamination there is a need to do the investigations when cereal is growing, aging and also during the harvesting. Also after the transportation to the store place to determine the main factor's which affect's the contamination of fodder. If there is no possibility to do the physical conservation, it is recommended to do the chemical conservation (for example with the preparation CALPRONA NC).

5. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bakutis B. Mikotoksinai gyvulių pašaruose. LR žemės ūkio ministerija. 2004. P. 8- 87.
2. Bakutis B., Rutkoviienė V. Ekologinė gyvulininkystė. Kaunas. 2000. P. 68- 73.
3. [Lugauskas A. Mikrobiologiniai medžiagų pažeidimai. Vilnius. 1997. P. 35- 390.](#)
4. [Lugauskas A., Paškevičius A., Repečkienė I. Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje. Vilnius. 2002. P. 7- 398.](#)
5. [Pavilionis A., Lavinskaitė A., Čerkašina I., Vaičiuvėnas V., Akromas L. Medicinos mikrobiologijos pagrindai. Kaunas, KMU. 2000. P. 342- 345.](#)
6. Sakalauskas V. Statistika su *Statistica*. Vilnius: Margi raštai. 1998. P. 16- 125.

Literatūra anglų kalba:

1. Abramson D. Toxicans of genus *Penicilliu*. Handbook of plant and fungal toxicans. CRS Press. Boca Raton. FL. 1997. P. 303- 317.
2. Agrios G. Plant pathology. Academic Press. San Diego. 1997. P. 45- 87.
3. BATERMAN G., MURRAY G., GUTTERIDGE R., COSCUN H. Effects Of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot in continuous winter wheat. Ann Appl Biol. 1993. P. 35- 47.
4. Berger U., Oehme M., Kuhn F. Quantitative determination and structure elucidation of type A and B trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. Journal of agriculture and food chemistry, 47. 1999. P. 4240- 4245.
5. Casteel S., Turk J. and Rottinghaus G. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. Fundament. Appl. Toxicol. 23. 1994. P. 518- 524.
6. Dänicke S. et al. Riskofaktoren für die *Fusarium* toxinbildung in Futtermitteln und Vermeidungstrategien bei der Futtermittelerzeugung und Füttererung. Landbauforschung Völkenrode, Sonderheft 216. 2000. P. 138.
7. Dill- Macky R., Jones R. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. Plant Disease. 2000. N. 84. P. 71- 76.
8. Drochner W. Mycotoxine- die unisichtbare Gefahr! Top Agrar 10. 1998. P. 8- 9.
9. Eriksen G., Aleksander J. *Fusarium* toxins in cereals- a risk assessment. Tema Nord 1998:502. Nordic Council of Ministers. Copenhagen. 1998. P. 10- 165.

10. [Fernandez C., Stack M. E., Musser S. M. Determination of deoxynivalenol in 1991 U. S. winter and spring wheat by high- performance thin- layer chromatography. Journal of AOAC international. 1994. P. 628- 630.](#)
11. [Fitt B., McCartney H., Walklate P. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. Annu Rev Phytopathol. 1989. P. 241- 270.](#)
12. [Frincham J., Marasas W., Taljaard J. Atherogenic effects in a non- primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. Atherosclerosis. 1992. P. 13- 25.](#)
13. [Hall R., Sutton J. Relation of weather, crop and soil variables to the prevalence, incidence and severity of basal infections of winter wheat in Ontario. Plant Pathol.1998. N. 20. P. 69- 80.](#)
14. [Harazim J., Marecek E., Pavelek L., Suchy P., Herzig I. Efficiency testing of coomercial fungistatic agents in pilot study. 49th Annual Meeting of European Assoc. for Animal Production. Warsa. 1998. P. 68- 71.](#)
15. [Henriksen B. Factors affecting *Fusarium* infection and mycotoxin content in cereal grains. Doctor Scientarium Theses 1999:4. Agricultural University of Norway. 1999.](#)
16. [Henriksen B., Langseth W., Sundheim L. Factors affecting *Fusarium* ifection and mycotoxin content in Norwegian cereal grains. 6th European *Fusarium* seminar and third COST 835 workshop of agriculturally important toxigenic fungi. Berlin. 2000. P. 108- 109.](#)
17. [Hoehler D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. 1989. P. 2- 12.](#)
18. [Hörberg H., Lindqvist P. Different sources of *Fusarium* inoculum and use of fungisides- how does this affect development of fungus? The BCPC Coference- Pests and diseases. The British Crop Protection Council. Page Bros. 2000. P. 499- 502.](#)
19. [Jenkinson P., Parry D. Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. Mycol Res98. 1994. P. 506- 510.](#)
20. [Jennings P., Turner J. Overview of fusarium ear blight in the UK- effect of fungicide treatment on disease control and mycotoxin production. The BCPC Conference- Pests and Diseases. The British Crop Protection Council. Page Bros. 2000. P. 707- 712.](#)
21. [Kamimura H., Nishijima M., Yasuda K., Saito K., Ibe A., Nagayama T., Ushiyama H.,](#)
22. [Naoi Y. Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals. Grains and foodstuffs. Journal of the association of official analytical chemists. 1981. P. 1067- 1073.](#)

22. [Karlovsky P. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. 1999. P. 1- 23.](#)
23. [Kemp G., Pretorius Z., Wingfield M. *Fusarium* glume spot of wheat: a newly recorded mite-associated disease in South Africa. Plant Disease. 1996. P. 48- 51.](#)
24. [Krogh P., Hald B., Pederson E. Occurance of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. Acta Pathol. Microbiol. 1995. P.689- 695.](#)
25. [Kupier- Goodman T. Prevetion of human mycotoxicoses throught risk assessment and risk management. Eagan Press. USA. 1994. P 439- 469.](#)
26. [Kupier- Goodman T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal- derivated food products. Vet. Hum. Toxicol. 1990. P.6- 14.](#)
27. [Langseth W., Elen C. Differences between berley, oats and wheat in the occurrence of deoxynivalenol and other trichotecenes in Norwegian grain. Journal of Phytopathology. Berlin. 1996. P. 113- 118.](#)
28. [Langseth W., Runberget T. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. Journal of chromatography A815. 1998. P. 103- 121.](#)
29. [Miller J., Culley J., Fraser K., Hubbard S., Meloche F. Effect of tillage practices on *Fusarium* head blight of wheat. Plant Pathol.N. 20. 1998. P. 95- 103.](#)
30. [Mirocha C. J., Pawlosky R.A., Chatterjee K., Watson S., Hayes W. Analyses for *Fusarium* toxins in various samples implicated in biological wafare in Southeast Asia. Journal of the association of analytical chemists. 1983. P. 99.](#)
31. [Muir W., Kalan I. Storage mites in foodstuffs. Journal Pest and Crops. 1998. P. 38- 44.](#)
32. [Park J. J., Samalley E. B., Chu F. S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. Applied and environmental microbiology. 1996. P. 1642- 1648.](#)
33. [Parry D., Jekinson P., McCleod L. *Fusarium* ear blight in small grain cereals- a review. Plant pathol. N. 44. 1995. P. 207- 238.](#)
34. [Parry D., Nicholson P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. Plan Pathol. N. 45. 1996. P. 207- 238.](#)
35. [Parry D., Pettitt T., Jenkinson P., Lees A. The cereal *Fusarium* complex. Ecology of Plant Pathogens. CAB international. Wallingford. UK. 1994. P. 301- 320.](#)

- [36. Pasteyner S. Mycotozins in animal husbandry. 1994. P. 12- 230.](#)
- [37. Pedersen E., Morrall R., McCartney H., Fitt B. Dispersal of conidia of *Ascochyta fabae* f. sp. Lentis from infected plants by simulated wind and rain. Plant Pathol. N 43. 1994. P. 50- 55.](#)
- [38. Perlusky D. B., Hamilton R. M., Foster B. C., Trenholm H., L., Thomson B. K. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. Journal of the association of official analytical chemists. 1987. P. 1049- 1055.](#)
- [39. Perlusky D. B., Rotter B. A., Rotter R. G. Toxicology of mycotoxins. Eagan Press. St. Paul. USA. 1994. P. 359- 403.](#)
- [40. Pestka J. J., Bondy G. S. Immunotoxic effects of mycotoxins. Eagan Press. St. Paul. USA. 1994. P. 339- 358.](#)
- [41. Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in food and feed- an updated review. Revue Med. Vet. 1998. P. 479- 483.](#)
- [42. Placinta C., D'Mello J., McDonald D. A review of worldwide contamination of cereal grains and animals feed with *Fusarium* mycotoxins. Animal feed Sci. Tech. 1999. P. 21- 37.](#)
- [43. Polley R., Turner J. Surveys of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Scotland and Wales. Ann Appl. Biol. 1995. P. 45- 58.](#)
- [44. Porcher J. M., Lafarge C., Nurie A., Melcion D., Molard D. Determination of cytotoxic trichothecenes in corn by cell culture toxicity assay. Journal of the association of official analytical chemists. 1987. P. 844- 849.](#)
- [45. Razzazi- Fazeli E., Bohm J., Luf W. Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using chromatography- mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. Journal of chromatography A854. 1999. P. 45- 55.](#)
- [46. Rossi V., Patteri E., Languasco L., Giosue. Dispersal of *Fusarium* species causing head blight of wheat under field conditions. 6th European *Fusarium* seminar and third COST 835 workshop of agriculturally important toxigenic fungi. Berlin. 2000. P. 45- 46.](#)
- [47. Rotter B. A., Perlusky D. B., Pestka J. J. Toxicology of deoxynivalenol. Journal of toxicology and environmental health. 1996. P. 1- 34.](#)
- [48. Samson A. and other. Introduction to food- borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. BAARN. 1988. P. 5- 272.](#)

49. Schiling A., Geiger H. Polymerase chain reaction- based assay for species- specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*. Plant Pathol. N. 86. 1996. P. 515- 522.
50. Scott P. M. Multi- year monitoring of Canadian grains and grain- based foods for trichotecenes and zearalenone. Food additives and contaminants. 1997. P. 333- 339.
51. Shima J., Takase S., Takahashi Y., Iwai Y. and other. Novel detoxification of the trichotecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. Applied and environmental microbiology. 1997. P. 3825- 3830.
52. Smith J., Henderson R. Mycotoxins and animal foods. CRS press. Bosca Raton. Boston. 1994. P. 58- 62.
53. Swanson S., Helaszek C., Buck W., Rood Jr. H & Haschek W. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. Food and chemical toxicology. 1988. N. 26. P. 823- 829.
54. Trucksess M. W. and other. Determination of deoxynivalenol in white flour and bran by solid- phase extraction/liquid chromatography: interlaboratory study. Journal of AOAC international. 1998. P. 880- 886.
55. Trucksess M. W. and other. Survey of deoxynivalenol in U. K. 1993 wheat and barley crops by enzyme- linked immunosorbent assay. Journal of AOAC international. 1995. P. 631- 636.
56. Whitaker T. B., Hagler W. M., Giesbrecht F. G., Johansson A. S. Sampling, sample preparation and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol. Journal of AOAC international. 2000. P. 1285- 1292.
57. Wilkes J. G., Sutherland J. B. Sample preparation and high- resolution separation of mycotoxins possessing carboxyl groups. Journal of chromatography B. N. 717. 1998. P. 135- 156.
58. Zinkernagel V., Adolf B., Habermeyer J. The spread of *Fusarium* spp. from the above ground level to the ears of wheat. Cereal Res Commun. 1997. P. 677- 679.

Literatūra rusų kalba:

1. Курасова В., Костин В., Малиновская Л. Методы исследование в ветеринарной микологии. Москва. 1971. P 16- 138.
2. Смирнова А., Кострова О. Микробиология зерна и продуктов его переработки. Москва. 1989. P. 6- 35.

Kiti šaltiniai:

1. Baliukonienė V. 2005. Konsultacija grūdų užterštumo ir kitais klausimais.
2. Kybartas E. 2005. Konsultacija grūdų detoksikavimo ir konservavimo tema.

Interneto medžiaga:

1. [JECFA. 2001.](#)
<http://www.who.int/pcs/jesfa/summary56.pgf>. Prieiga prie interneto 2004m. spalio 12 d.
2. European Commission. Brussels. Belgium. 2001a.
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44-en.pdf>. Prieiga prie interneto 2003m. gruodžio mėn.15d.
3. European Commission. Brussels. Belgium. 2001b.
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44-en.pdf>. Prieiga prie interneto 2003m. gruodžio mėn.15d.
4. [www. r-project.org](http://www.r-project.org) Prieiga prie interneto 2005m. sausio 3d.